Transiente Auswärtsströme der Herzzellmembran und ihre pharmakologische Modulation

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf vorgelegt von Tanja Maria Weis aus Duisburg Düsseldorf 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof.Dr.Dr.Borchard 1. Koreferent: Prof.Dr.Riesner 2 Koreferent: Prof.Dr.Thurm Tag der mündlichen Prüfung: 27.6.2001



Save the wonderful manatees

Inhaltsverzeichnis

A.	Zusammenfassung6
В. 1. 2.	Einleitung
c.	Material und Methoden
1.	Versuchstiere
2.	Prinzip der Zellisolation16
3.	Das Calcium- Paradox
4.	Präparation Ca ²⁺ - toleranter Myozyten21
5.	Protokoll der Zellisolation23
6.	Herstellung der Mikroelektroden26
7.	Versuchsbäder26
8.	Lösungstransport27
9.	Elektrophysiologische Experimente28
10.	Registrierung und Auswertung der Meßwerte
D.	Ergebnisse
1.	Zwei transiente Auswärtsströme im Rattenventrikel32
2.	Spannungsabhängigkeit der transienten34
	Auswärtsströme
2.1	Spannungsabhängige Inaktivierung34
2.2	Spannungsabhängige Aktivierung37
3.	Unterschiede in der Ausprägung der transienten41
	Auswärtsströme
4.	Pharmakologische Modulation der transienten43
	Auswärtsströme
5.	Temperaturabhängigkeit der transienten47
	Auswärtsströme
6.	Ionale Natur der transienten Auswärtsströme55
6.1	Gleichgewichtspotential des ito, f- Stroms57

6.2	Gleichgewichtspotential des ito,s- Stroms59
7.	Effekte transienten Auswärtsströme auf61
	das Aktionspotential
8.	Temperaturabhängigkeit der transienten63
	Auswärtsströme und ihre Auswirkung auf
	das Aktionspotential
Е.	Diskussion
1.	Schnell inaktivierender transienter Auswärtsstrom65
2.	Langsam inaktivierender transienter Auswärtsstrom68
3.	Unterschiedliche Expression der transienten71
	Auswärtsströme
4.	Pharmakologische Modulation der transienten72
	Auswärtsströme
5.	Kinetik der transienten Auswärtsströme
6.	Temperaturabhängigkeit der transienten
	Auswärtsströme
7.	Gleichgewichtspotentiale und ionale Natur der77
	transienten Auswärtsströme
8.	Einfluß der transienten Auswärtsströme auf das79
	Aktionspotential
F.	Abbildungen
G.	Literatur

A. Zusammenfassung

1. Aus dem Ventrikelmyokard männlicher Wistar- Ratten wurden einzelne Zellen mittels der Langendorff- Perfusionstechnik enzymatisch isoliert. Transmembranäre Ionenströme der Einzelzellen wurden mit der "whole-cell"-Spannungsklemmtechnik gemessen.

2. Es wurden zwei transiente Auswärtsströme charakterisiert, die sich in ihren elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften deutlich unterschieden: der bereits bekannte, schnell inaktivierende (τ : 20-40ms bei Zimmertemperatur) transiente Auswärtsstrom, der hier als $i_{to,f}$ bezeichnet wird sowie ein bislang unbekannter, langsam inaktivierender (τ : 1-2s bei Zimmertemperatur) transienter Auswärtsstrom, der als $i_{to,s}$ bezeichnet wurde.

3. Beide transiente Ströme unterlagen einer spannungsabhängigen Inaktivierung, wobei der $i_{to,f}$ - Strom im Mittel bei -58mV und der $i_{to,s}$ - Strom bei ca. -87mV halbmaximal inaktiviert waren. Eine spannungsabhängige Aktivierung durch ein virtuelles Aktivierungstor konnte nur beim ito,s klar nachgewiesen werden, wobei das Potential der halbmaximalen Aktivierung durch Analyse der $i_{to,s}$ - Tail-Ströme im Mittel zu -13.5mV errechnet wurde.

4. Die beiden transienten Auswärtsströme unterschieden sich signifikant in ihren pharmakologischen Profilen. Vom $i_{to,f}$ -Strom war bekannt, daß er durch 4-Aminopyridin (4-AP) im Konzentrationsbereich einiger 10µmol/l bis zu mehreren mmol/l blockierbar war. Der $i_{to,s}$ - Strom hingegen war resistent gegen 4-AP. Als "selektiver" Inhibitor des $i_{to,s}$ - Stroms konnte das Tedisamil- Derivat Bertosamil identifiziert werden, das den $i_{to,s}$ - Strom konzentrationsabhängig (0.3-3µmol/l) blockierte. Die EC₅₀ wurde zu 0.63µmol/l ermittelt.

Neben Bertosamil inhibierte auch 4,4'diisothiocyanatostilben-2,2'- disulfonsäure (DIDS) den i_{to,s}-Strom in konzentrationsabhängiger Weise, wobei 100µmol/l DIDS eine Amplitudenreduktion auf ca. die Hälfte und 200µmol/l eine Reduktion auf etwa ein Drittel der Kontrolle bewirkten.

5. Die Kinetik und die Amplituden beider transienter Ströme waren extrem temperaturabhängig. Bei 20°C betrug die Aktivierungszeitkonstante des $i_{to,f}$ im Mittel etwa $\tau = 5ms$, die der Inaktivierung $\tau = 40ms$. Mit steigender Temperatur nahm die Geschwindigkeit der Aktivierung und Inaktivierung exponentiell zu. Die Aktivierung des $i_{to,s}$ - Stroms war ebenfalls schnell, die Zeitkonstante betrug bei 20°C $\tau = 9ms$, die der Inaktivierung war ca. $\tau = 1360ms$.

Neben der Kinetik wurden auch die Amplitunden der beiden transienten Ströme massiv durch die Temperatur beeinflußt, wobei diejenige des $i_{to,f}$ - Stroms bei etwa 10°C ein Maximum besaß und mit steigender Temperatur abnahm. Bei \geq 35°C war der $i_{to,f}$ nicht mehr nachweisbar. Die Amplitude des $i_{to,s}$ - Stroms verhielt sich invers, d.h. sie nahm von einem Maximum bei \geq 35°C zu niedrigeren Temperaturen hin ab und konnte bei ca. 10°C nicht mehr aufgelöst werden.

6. Die langsame Deaktivierungskinetik des $i_{to,f}$ bei niedriger Temperatur und die des $i_{to,s}$ bereits bei Zimmertemperatur wurde zur Bestimmung der Gleichgewichtspotentiale ausgenutzt, wobei jeweils die "Tail" Ströme ausgewertet wurden. Bei einer Temperatur von 10°C wurde das Gleichgewichtspotential des $i_{to,f}$ - Stroms im Mittel zu -73mV bei physiologischen Kaliumkonzentrationen gemessen. Das Gleichgewichtspotential des $i_{to,s}$ wurde bei Zimmertemperatur ermittelt und errechnete sich als Mittelwert zu etwa 75mV. Nach Korrektur um das Diffusionspotential ergaben sich um 4mV negativere Werte. Diese Werte lagen nahe bei den nach Nernst kalkulierten K-

gleichgewichtspotentialen und belegen, daß es sich bei den transienten Strömen um nahezu reine K- Ströme handelt.

7. Aufgrund der schnellen Aktivierungskinetik beeinflußten beide Stomkomponenten das Aktionspotential des Rattenventrikels bei Zimmertemperatur. Der $i_{to,f}$ - Strom beeinflußte wegen der schnellen Inaktivierung nur die frühe Repolarisationsphase, wohingegen der $i_{to,s}$ - Strom alle Phasen der Repolarisation verlängerte. Bei Körpertemperatur war der $i_{to,f}$ - Strom inaktiv und die Repolarisation wurde maßgeblich durch den $i_{to,s}$ - Strom kontrolliert.

B. Einleitung

1. Allgemeine Einführung

In den letzten Jahrzehnten ist die Anzahl kardiovaskulärer Erkrankungen besonders in den westlichen Industrieländern stark angestiegen. Ein großer Teil der Patienten ist primär oder als Folge anderer Herzerkrankungen (z.B. Myokardinfarkt, Infektionen) von Herzrhythmusstörungen betroffen. Derartige Arrhythmien können subjektive Beschwerden auslösen und weisen bei Patienten mit begleitender Myokardinsuffizienz ein hohes Mortalitätsrisiko auf. Daher ist die Entwicklung potenter und nebenwirkungsarmer Pharmaka Therapie zur von Rhythmusstörungen von großer Bedeutung. Seit längerer Zeit stehen Antiarrhythmika mit verschiedenen Angriffspunkten zur Alle antiarrhythmisch wirksamen Verfügung. Substanzen modulieren direkt oder indirekt Ionenströme des Herzens. Nach einem Vorschlag von Vaughan-Williams (Vaughan- Williams, 1975) hat sich die Einteilung der Antiarrhythmika in vier Klassen international durchgesetzt.

I Natrium- Kanal- Blocker

- II ß-Rezeptorenblocker
- III Kalium- Kanal- Blocker
- IV Calcium- Kanal-Blocker

Die Antiarrhythmika der Klassen I, II und IV sind z.T. schon seit mehreren Jahrzehnten im klinischen Gebrauch. Sie haben teilweise starke kardiale und auch extrakardiale Nebenwirkungen. Häufig wird die antiarrhythmische Wirksamkeit jedoch von proarrhythmischen Zusatzeffekten begleitet. Dies trifft besonders auf die Gruppe der Na- Kanal- Inhibitoren zu. In einer großen, kontrollierten internationalen Studie

wurde gezeigt, daß die untersuchten Na- Kanal-Blocker trotz deutlicher Unterdrückung der Postinfarkt- Arrhythmien einen signifikanten Anstieg der Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkten (CAST- Studie, CAST II- Studie). Das heißt, daß in diesem Falle die unerwünschten Wirkungen die antiarrhythmischen Effekte in Bezug auf die Sterblichkeit sogar überkompensierten.

Insgesamt gesehen sind die verfügbaren Antiarrhythmika weit entfernt von einem therapeutischen Optimum. Es fehlt an wirksamen, selektiven Pharmaka mit geringen Nebenwirkungen.

Die Klasse III - Antiarrhythmika (K-Kanal-Blocker) stellen einen verhältnismäßig neuen Ansatz in der Pharmakotherapie bestimmter Formen kardialer Rhythmusstörungen dar: im Myokard aller Vertebraten sind die K-Ströme diejenigen Ionenströme, die die Repolarisation und damit die Dauer des kardialen Aktionspotentials maßgeblich bestimmen. Das Auftreten bestimmter Arrhythmien ist von der Refraktärzeit des betroffenen Herzgewebes abhängig, welche wiederum mit der Aktionspotentialdauer korreliert (Rensma et al., 1988; Roden und Hoffman, 1985). Dementsprechend ist eine Modulation dieser Stromsysteme hervorragend geeignet, die Aktionspotentialdauer zu verändern und so eine potentiell antiarrhythmische Wirkung zu erreichen. Da sich die Gruppe der K-Kanal-Blocker erst seit einigen Jahren in der Entwicklung befindet, gibt es z.Zt. nur zwei klinisch verfügbare Substanzen, von denen die eine, Sotalol, nicht selektiv für K- Kanäle ist (Berger et al., 1989b) und die Amiodaron, starke Nebenwirkungen andere, und eine problematische Pharmakokinetik aufweist.

Voraussetzung für die Entwicklung und Testung von neuen Klasse III- Antiarrhythmika ist die detaillierte Kenntnis der transmembranären K-Ströme im humanen Myokard. Des weiteren ist die Entwicklung und Etablierung geeigneter Modellsysteme

zur Prüfung neuer Substanzen notwendig. Diese Modellsysteme sollten dem humanen Myokard im Hinblick auf die Population der transmembranären Ionenströme möglichst ähnlich sein.

Nachdem es der Arbeitsgruppe um Hamill und Neher (Hamill et al., 1981) gelungen war, einzelne Zellen bzw. die Aktivität einzelner Ionenkanäle mit Hilfe der Spannungsklemmtechnik zu untersuchen, ist das ventrikuläre Myokard des Meerschweinchens als Standardmodell für elektrophysiologische Untersuchungen herangezogen worden. Man wußte bereits von intrazellulären konventionellen Ableitungen aus multizellulären Präparaten, daß das Aktionspotential des Meerschweinchenventrikels dem des menschlichen Ventrikels sehr ähnlich ist. Daraus schloß man voreiligerweise auf eine weitgehende Ähnlichkeit der maßgeblichen Stromsysteme. Nachdem jedoch in den letzten Jahren auch Myozyten aus dem untersucht menschlichen Herzen isoliert und wurden ("Abfallmaterial" von Herzklappenoperationen, Herztransplantationen, Biopsien; Wettwer et al., 1994; Peeters et al, 1995; Varro et al., 1993), stellte sich heraus, daß die Verteilung der Ionenströme im menschlichen Herzen erheblich von der des Meerschweinchensherzens abweicht. Sowohl der humane Ventrikel als auch der Vorhof weisen starke transiente Auswärtsströme auf (Escande et al., 1985; Fermini et al., 1992; al.,1993; Wettwer et al.,1994), die beim Varro et Meerschweinchen sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel fehlen (Vorhof: eigene unveröffentlichte Untersuchungen, Ventrikel: pers. Mitteilung von F. Berger). Die Repolarisation der ventrikulären Meerschweinchenmyozyte wird hauptsächlich von einem langsam aktivierenden K-Strom getragen, der in der Literatur als "delayed outward rectifier" oder i_K bezeichnet wird (Hume et al., 1990; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1991; Tohse,1990). In den letzten Jahren stellte sich heraus, daß die vorwiegende Repolarisation des Aktionspotentials durch den i_K-Strom eine Besonderheit des Meerschweinchens zu sein

scheint, wohingegen transiente Auswärtsströme nahezu finden sind. ubiquitär zu Daher ist der Meerschweinchenventrikel zumindest aus elektrophysiologischer Sicht ein nur bedingt verwendbares Modellsystem zur Untersuchung von Klasse III - Antiarrhythmika. Es wurde also ein Versuchstier bzw. Versuchspräparat gesucht, daß, wie auch humane Myokard, einen ausgeprägten transienten das Auswärtsstrom aufweist.

Unter den verfügbaren kardialen Präparaten erschien das ventrikuläre Myokard der Ratte optimal geeignet zu sein, da bereits längere Zeit bekannt war, daß ein transienter Auswärtsstrom im Rattenventrikel existiert (Josephson et al., 1984). Die Ratte war als Versuchstier gut etabliert, wenn auch in der Elektrophysiologie kaum verbreitet. In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst ein zuverlässiges Präparationsverfahren zur Gewinnung isolierter ventrikulärer Myozyten erarbeitet werden. Daneben sollten weitere Daten zur elektrophysiologischen Charakterisierung des transienten Auswärtsstroms im Rattenventrikel erhoben werden.

Auswärtsströme mit transientem Zeitverlauf wurden schon früh in der kardialen Elektrophysiologie bei Purkinje- Fasern des Schafs beschrieben (Deck und Trautwein, 1964; Dudel et al., 1967). Wenn das Membranpotential der (multizellulären) Präparate, ausgehend von negativen Haltepotentialen (ca. -80mV), zu positiven Werten geklemmt wurde, wurde ein schnell aktivierender Auswärtsstrom beobachtet, der jedoch trotz Fortdauer des aktivierenden Testpulses inaktivierte. In der Absicht, die ionale Natur des Stroms zu ergründen, substituierte Dudel (Dudel et al., 1967) das extrazelluläre Cl, woraufhin der transiente Auswärtsstrom verschwand. Dies war Anlaß, den Strom zunächst als Chloridstrom anzusehen. In der Literatur firmierte der Strom daher lange Zeit als "dynamic chloride current". Erstaunlicherweise wurden die

Ergebnisse von Dudel niemals in der Literatur reproduziert und bestätigt. Erst später ergaben sich mit Hilfe radioktiver K-Isotope indirekte Hinweise, daß der transiente Auswärtsstrom möglicherweise ein K-Strom ist bzw. eine starke K- Komponente besitzen könnte (Carmeliet und Ramon, 1980). Transiente Auswärtströme wurden inzwischen in nahezu allen untersuchten kardialen Geweben gefunden: in den Vorhöfen von Ratte, Kaninchen, Mensch und Seelefant (Ng et al., 1987; Giles 1988; Escande et al.,1985; Imaizumi, Maylie und und Morad, 1984); Ventrikel von Ratte, Maus, Kaninchen, Katze, Frettchen, Hund und Mensch (Josephson et al., 1984; Benndorf et al., 1987; Hiraoka und Kawano, 1989; Furukawa et al., 1990; Bouron et al., 1991; Simurda et al., 1988; Wettwer et al., 1994). Außerdem wurden transiente Auswärtsströme in kardialen Purkinje- Fasern von Hund, Kuh bzw. Kalb und Schaf gefunden (Nakayama und Fozzard, 1988; Callewaert et al., 1986; Siegelbaum und Tsien,1980; Berger et al.,1989b). Auch Schrittmachergewebe wie Sinus- und AV- Knoten besitzen transiente Auswärtsströme (Giles und Van Ginneken, 1985; Nakayama und Irisawa, 1985).

2. Modellvorstellung von potentialgesteuerten Ionenkanälen

In den fünfziger Jahren erarbeiteten Hodgkin und Huxley (1952), basierend auf ersten Spannungsklemmexperimenten an Tintenfischaxonen, grundlegende Theorien zur Funktion von spannungsgesteuerten Ionenströmen. Angereichert mit dem zusätzlichen Wissen aus Einzelkanalableitungen, haben diese theoretischen Grundlagen noch heute Gültigkeit. Hodgkin und Huxley definierten damals "Steuerelemente", die in Form von virtuellen "Toren" einen transmembranären Ionenstrom in Abhängigkeit ihres jeweiligen Öffnungszustandes regulieren sollten. Der Öffnungszustand der "Tore" wurde unter anderem durch das Membranpotential bestimmt. Abb.**1** zeigt schematisch

einen Ionenkanal mit zwei virtuellen "Toren". Dieses Modell wird als gültig angesehen für zeitabhängige Ionenströme, also auch für die in dieser Arbeit beschriebenen transienten Auswärtsströme. Ein Stromfluß ist nur möglich, wenn sowohl das Aktivierungstor (A) wie auch das Inaktivierungstor (I) offen sind. Im Ruhezustand (1), der etwa dem Ruhepotential ist das Aktivierungstor geschlossen, entspricht, das Inaktivierungstor jedoch offen. Bei einer Depolarisation $(1\rightarrow 2)$ der Zellmembran auf positive Potentiale wird das Aktivierungstor geöffnet und ein Ionenfluß kann stattfinden. Hält die Depolarisation an, so bleibt das Aktivierungstor offen, das Inaktivierungstor jedoch schließt sich spontan mit Geschwindigkeit die einer bestimmten (2), vom Membranpotential abhängen kann und extrem temperaturabhängig ist (s.Kap.D.5). Die Schließung des Inaktivierungstores wird "Inaktivierung" genannt. Nach der spontanen, zeitabhängigen Inaktivierungstores ist der Schließung des Ionenfluß blockiert (3). Eine Rückkehr in den Ruhezustand erfolgt erst nach Repolarisation der Membran, wodurch das Aktivierungstor geschlossen ("Deaktivierung") und das Inaktivierungstor wieder geöffnet wird ("recovery from inactivation", 4). Die Möglichkeit, Signale von einzelnen Ionenkanälen abzuleiten, Verbindung hat in mit neuen Erkenntnissen der Molekularbiologie die (ursprünglich theoretischen) Vorstellungen von Hodgkin und Huxley in den letzten Jahren mit plastischen Vorstellungen zur Topologie von Ionenkanälen ergänzt. Man hat inzwischen die molekularen Strukturen identifiziert, die sich hinter den "Toren" verbergen. Beispielsweise wurde für die zeit- bzw. potentialabhängige Inaktivierung von (transienten) Ionenströmen das N- terminale Ende der Aminosäurensequenz des Kanalproteins identifiziert. Es ragt in Form eines "Pfropfens" am Ende einer kurzen Aminosäurekette ins Cytosol und verschließt potential- und zeitabhängig von der Innenseite her den Ionenkanal (Catterall, 1988; Pongs, 1992; Aldrich, 2001). Der

Spannungssensor, der für die potentialabhängige Aktivierung verantwortlich ist, scheint nach neuesten Befunden im Bereich der vierten transmembranären Domäne des Kanalproteins (S4) lokalisiert zu sein. Bei Depolarisation der Membran soll dieses Segment eine translatorische oder translatorischrotatorische Bewegung nach extern zu vollziehen, die über eine Konformationsänderung des Kanalproteins die Permeation von Kaliumionen ermöglicht (Cha et al., 1999; Glauner et al., 1999; Abott et al., 2001). Die Ergebnisse von Einzelkanalableitungen zeigten, daß für den individuellen Ionenkanal das "offen oder zu- Gesetz" gilt. Das heißt, entweder ist der Kanal völlig offen, oder völlig geschlossen. Trotz vieler schwer interpretierbarer Ergebnisse von Einzelkanalableitungen, die hier nicht näher diskutiert können, sind bislang keine Beweise für ein werden kontinuierliches Öffnungsverhalten eines Einzelkanals erbracht worden. Dies bedeutet, daß die sigmoiden Strom-Spannungsverläufe, die aus whole-cell-Spannungsklemmuntersuchungen qewonnen werden, als Häufigkeitsverteilung der Spannungsabhängigkeiten aller im jeweiligen Experiment untersuchten Einzelkanäle interpretiert werden müssen, da jeder individuelle Ionenkanal bei einer charakteristischen transmembranären Spannung öffnet bzw. schließt.

C. Material und Methoden

C.1 Versuchstiere

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar- Laborratten von ca. 140 g Körpergewicht verwendet. Bei erheblich abweichendem Körpergewicht und damit Alter der Tiere ergaben sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Ausbeute und Qualität

der Zellisolation. Die Tiere entstammten sämtlich der Zucht der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf.

C.2. Prinzip der Zellisolation

Die Aufgabe der Präparation ist die Gewinnung isolierter Einzelzellen aus dem ventrikulären Myokard der Rattenherzen. Im intakten Herzen sind die Zellen in ein mechanisches Stützgerüst eingebettet, das aus einer Matrix fester, aber elastisch beanspruchbarer Proteine (Collagen, Elastin u.a.) besteht. Darüber hinaus werden benachbarte Zellen durch Desmosomen ("tight junctions") mechanisch zusammengehalten. Neben der mechanischen Verbindung sind die Zellen untereinander durch elektrische Synapsen ("gap junctions") verbunden. Diese ermöglichen die notwendige schnelle Fortleitung der Erregungsfront während der Kontraktion des Herzmuskels. Eine Erregungsleitung innerhalb des Herzens mittels chemischer Synapsen wäre viel zu langsam, um innerhalb einiger Millisekunden die Erregung auf viele Millionen Zellen zu übertragen.

Das Öffnungsverhalten und damit die Leitfähigkeit der gap junctions unterliegt vielfältigen modulatorischen Einflüssen: u.a. dem pH-Wert, dem Phosphorylierungsgrad oder, was für die Isolation von erheblicher Bedeutung ist, der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration (Spray et al.,1985; Sugiura et al.,1990; White et al., 1990).

Die Dissoziation eines multizellulären kardialen Gewebes in isolierte Zellen beinhaltet daher mehrere Voraussetzungen. Zum einen müssen die "gap junctions" geschlossen werden und in diesem Zustand bleiben. Werden nämlich Zellen des Ventrikelmyokards voneinander getrennt, während die "gap junctions" offen sind, so führt dies augenblicklich zur Zerstörung der Zelle: extrazelluläre Lösung strömt

unkontrolliert ein, wobei das in die Zelle gelangende Calcium eine irreversible "Hyperkontraktion" des kontraktilen Apparates bewirkt. Morphologisch ändert die Zelle ihre Form von der charakteristischen, langgestreckten "rod-shaped"-Form zu einem strukturlosen, "kartoffelähnlichen" Gebilde (siehe auch Abb.4, unten)

Die zweite Voraussetzung für die Zellisolation ist die Entfernung der interzellulären Matrix. Bei dieser Prozedur soll selektiv das interzelluläre Stützgerüst entfernt werden, ohne jedoch Oberflächenstrukturen wie Rezeptoren oder Ionenkanäle zu schädigen oder zu zerstören. Darüber hinaus müssen die Desmosomen voneinander abdissoziieren. Ohne diesen Vorgang ist eine mechanische Trennung der Zellen nicht möglich.

Eine häufig verwendete Isolationstechnik für Herzzellen bedient sich der Perfusion nach Langendorff, der zum ersten Mal die Funktion von kompletten, isolierten Frosch- und künstlicher Warmblüterherzen unter Koronarperfusion untersuchte (Langendorff, 1885). Das Prinzip dieser Technik ist eine retrograde Perfusion des vollständigen Herzens, wobei das komplett explantierte Herz über die Aorta kanüliert und mit definierten Lösungen perfundiert wird. Sofern die Aortenklappen unbeschädigt sind, strömt das Perfusat über die Koronararterien ins Myokard. Nach der Gewebspassage wird der größte Teil (ca.60%) im Sinus coronarius gesammelt. Von dort gelangt das Perfusat in den rechten Vorhof, den rechten Ventrikel und schließlich über den Truncus pulmonalis ins Wenn der Truncus pulmonalis versehentlich ligiert Freie. wurde, ist die Koronarperfusion blockiert bzw. stark behindert. Ein nicht unbeträchtlicher Anteil des koronaren Perfusats scheint auch über die sogenannten Thebesius- Gefäße direkt in den Ventrikelraum zu gelangen. Abb.2 zeigt ein Schema des Versuchsaufbaus zur Isolation von Herzzellen mit Hilfe der Langendorff- Technik.

Der erste Schritt einer Zellisolation ist eine Perfusion des Herzens mit einer physiologischen Lösung, der jedoch kein Calcium zugesetzt wurde (nominell Ca-freie Lsg.: s.Lsg.1, S.25). Die Entfernung des extrazellulären Calciums bewirkt eine Abdissoziation der Desmosomen voneinander, wodurch die Zellen mechanisch voneinander gelöst werden. Außerdem schließen sich die "gap junctions" unter diesen Bedingungen. Nach der Ausspülung des extrazellulären Calciums wird das Herz mit einer Enzymlösung perfundiert. Das Enzym - mitunter werden auch Kombinationen verschiedener Enzyme eingesetzt lysiert die interzelluläre Matrix. Am häufigsten werden verschiedene Collagenasen verwendet (Boyle und Nerbonne, 1991; Xu und Best, 1991; Zhang et al., 1994). Die Konzentrationsbereiche liegen in der Regel bei 0.5-1mg/ml, ungeachtet der unter Umständen stark differierenden Enzymaktivitäten! Teilweise werden auch verschiedene Enzyme kombiniert, meist Collagenasen mit Hyaluronidasen (Ng et al., 1987; Castle, 1990), Proteasen (Fermini et al., 1992; Escande et al., 1987), Elastasen (Shibata et al., 1989) oder Trypsin (Ogbaghebriel und Shrier, 1994). Die Einwirkzeiten der Enzyme schwanken zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden, liegen sie jedoch bei 10-30 min. Nach der meist Enzymbehandlung hängen die Zellen nur noch locker zusammen können durch vorsichtiges Rühren oder Schütteln und herausgelöst werden.

C.3. Das Calcium Paradox

Der unphysiologisch niedrige extrazelluläre Calciumspiegel während der Isolation hat zusätzlich die unerwünschte Wirkung einer starken, unspezifischen Erhöhung der Membranpermeabilität (Isenberg und Klöckner, 1982). Dies kann zwei zellschädigende Wirkungen nach sich ziehen: zum einen kann die Zellmembran depolarisieren, da infolge der hohen

Membranpermeabilität die ionalen Konzentrationsgradienten (u.a. der K-Gradient) abnehmen.

Ein zweites, in der Regel zur Zerstörung der Zelle führendes Phänomen ist das sogenannte "Calcium- Paradox". Nach der $Ca^{2+}-$ Isolation der Zellen soll die extrazelluläre Konzentration wieder auf ein physiologisches Niveau (ca.1-2mmol/l) angehoben werden. Dabei ist zu beobachten, daß viele Zellen, mitunter die gesamte Population, innerhalb weniger Sekunden spontan und rhythmisch zu kontrahieren beginnen. Diese rhythmischen Kontraktionen sind überlagert von einer "langsamen", tonischen Kontraktur. Während der zunehmenden tonischen Kontraktur steigt die Frequenz der rhythmischen Zuckungen an, wobei verschiedene Bereiche der Zelle mit unterschiedlicher Frequenz kontrahieren können. Mitunter laufen auch wellenartige, langsame Kontraktionen durch die Myozyte, die von verschiedenen Stellen innerhalb der Zelle ausgehen können. Wird das Membranpotential derartig spontan kontrahierender Zellen mit Mikroelektroden (s.u.) abgeleitet, die SO zeiqt sich, daß Kontraktionen nicht durch Aktionspotentiale ausgelöst werden, sondern wahrscheinlich rhythmische Schwankungen des intrazellulären Ca²⁺- Niveaus widerspiegeln. Wahrscheinlich ist das sarkoplasmatische Retikulum derartiger Zellen extrem mit Ca²⁺ be- bzw. überladen, so daß spontane Ca²⁺- Freisetzungen auftreten, die sich kettenreaktionsartig über die Zelle ausbreiten. Das Endstadium dieses eindrucksvollen Vorgangs ist die sog. "Hyperkontraktion", eine irreversible Kontraktur des kontraktilen Apparates, die die Zelle zu einem unförmigen, kartoffelähnlichen Gebilde verformt. Meist wird bei der Hyperkontraktion auch die Zellmembran beschädigt oder zerstört, d.h. das Membranpotential bricht zusammen. Mitunter lassen sich aber auch bei Zellen, die während einer Ableitung hyperkontrahiert sind, noch (mehr oder weniger artefizielle) Ionenströme und ein (meist depolarisiertes) Membranpotential registrieren. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte

folgende sein: während der Perfusion des Herzens mit "Ca²⁺freier Lösung" steigt, wie oben bereits erwähnt, die Membranleitfähigkeit unspezifisch stark an. Obwohl die "Ca²⁺freie Lösung" nominell Ca²⁺- frei ist (d.h. ihr wurde kein Ca²⁺ zugesetzt), kann sie dennoch mitunter Calcium in der Größenordnung von mehr als 10 µmol/l enthalten. Dieses Ca²⁺ wird in Form von Verunreinigungen verschiedener Salze eingeschleppt. Die Ca^{2+} - Kontamination ist zwar erheblich niedriger als die normale extrazelluläre Ca²⁺- Konzentration, übersteigt jedoch die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration (10⁻⁸) bis 10⁻⁷mol/l) um ein Vielfaches (Leblanc und Hume, 1990). Es kann also auch bei extrazellulärer "Ca²⁺- freier"- Lösung immer noch ein Nettoinflux von Calcium auftreten. Das einströmende Ca²⁺ wird schließlich in intrazellulären Speicherkompartimenten (z.B. im sarkoplasmatischen Retikulum) akkumuliert. In extremen Fällen werden auch die Mitochondrien mit Ca²⁺ be- bzw. überladen. Dies zeigt sich schon lichtmikroskopisch durch eine Granulierung der Zelle, die sonst eine charakteristische Querstreifung aufweist. (Siehe Abb.4 unten). Wenn die extrazelluläre Ca²⁺- Konzentration wieder normalisiert wird, so ist die Membran noch im Zustand erhöhter Leitfähigkeit und der Ca²⁺-Einstrom steigt drastisch an. Da die Ca²⁺-speichernden Kompartimente schon stark mit Ca²⁺ überladen sind, kann das einströmende Ca nicht mehr aus dem Cytosol entfernt werden. Es wird auch diskutiert, daß der Ca²⁺- Einstrom trotz des extrem hohen intrazellulären Ca²⁺-Spiegels wie beim normalen Erregungsvorgang die Freisetzung von zusätzlichem Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum triggert. Bedingt durch die hohe Membranleitfähigkeit kommt es zu einem verstärkten Na⁺- Einstrom, der eine reduzierte Aktivität des Na-Ca- Austauschers und damit zusätzlichen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ bewirkt. Insgesamt steigt der intrazelluläre Ca²⁺- Spiegel derart an, daß eine irreversible "Hyperkontraktur" der Zelle auftritt.

Die Calcium- Intoleranz isolierter cardialer Myozyten ist eines der Hauptprobleme bei der elektrophysiologischen Analyse cardialer Myocyten. Oft müssen die Präparationen ergebnislos verworfen werden oder die Zellen tolerieren im Experiment nur sehr kurzfristig normale Ca²⁺- Konzentrationen. Dies reduziert naturgemäß die experimentelle Ausbeute, weil viele Zellen dann artefizielle Reaktionen zeigen oder aber ihre Lebensdauer im Experiment stark reduziert ist. In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze, die Ca²⁺-Toleranz der Zellen wiederherzustellen oder zumindest zu verbessern. Ziel dieser Ansätze war es, den vermeintlich desolaten Energiehaushalt der Zellen zu normalisieren. Isenberg (1982) inkubierte die Zellen nach der Isolation in einer Lösung ("Kraftbrühe"), die energiereiche Stoffe wie ATP und Pyruvat sowie diverse Aminosäuren enthielt, die, wie er mutmaßte, der Zelle zur Normalisierung ihres Energiehaushalts fehlten. Eine Verbesserung der Stoffwechsellage sollte über

und Pyruvat sowie diverse Aminosäuren enthielt, die, wie er mutmaßte, der Zelle zur Normalisierung ihres Energiehaushalts fehlten. Eine Verbesserung der Stoffwechsellage sollte über eine Aktivierung von Ionenpumpen und Austauschern (Na-K-ATPase, Ca-ATPasen, Na-Ca- Austauscher) das intrazelluläre Milieu normalisieren. Eigene Versuche mit dieser Methode ergaben jedoch keine erkennbare Verbesserung der Ca²⁺-Toleranz und successives Weglassen aller Zusätze brachte andererseits auch keine Verschlechterung der Situation.

C.4. Präparation Ca²⁺- toleranter Myozyten

Es wurden daher Versuche durchgeführt mit dem Ziel, eine Präparationstechnik zu entwickeln, die Ca²⁺-tolerante Zellen hervorbringt. Ausgehend von den obigen Betrachtungen zum Ca²⁺-Paradox stellt sich der Status einer "konventionell" präparierten Myozyte folgendermaßen dar: nach der Perfusion mit Lösung I (s.S.25)ist das Cytosol der Zelle verarmt an K⁺ jedoch überladen mit Ca²⁺ und Na⁺. Die intrazellulären Speicher sind ebenfalls mit Ca²⁺ überladen. Um die Zelle

wieder in einen physiologischen Zustand zu bringen, muß das intrazelluläre Ionenmilieu wieder normalisiert werden, d.h. die cytosolische K⁺- Konzentration muß erhöht werden, während die Ca²⁺- und Na⁺- Konzentrationen verringert werden müssen. Wie das Ca²⁺- Paradox beweist, sind die Zellen anscheinend nicht in der Lage, aus eigener Kraft in der zur Verfügung stehenden Zeit normale Ionenverhältnisse wiederherzustellen. Eine Aktivierung von zellulären Transportmechanismen durch Zusatz energiereicher Substrate (s.o.) ist anscheinend nicht möglich oder nicht ausreichend. Daher schien es sinnvoll, passive Ionenflüsse zu erzwingen, die die Normalisierung der intrazellulären Ionenkonzentrationen unterstützen.

Nach vielen Versuchen wurde schließlich eine Lösung (Lösung III, s.S.25) gefunden, die einen passiven Nettoinflux von K⁺ sowie einen Nettoefflux von Ca²⁺ und Na⁺ ermöglicht. Um überhaupt einen passiven Ausstrom von ${\rm Ca}^{2+}$ und ${\rm Na}^+$ (bei Ruhepotentialen zwischen -85 und ca. -40mV) zu erzwingen, mußten die externen Na^+ - bzw. Ca^{2+} - Konzentrationen deutlich unter den cytosolischen liegen. Da dies beim Ca^{2+} durch alleiniges Weglassen von Ca²⁺- Salzen nicht möglich war (s.o.), mußte die freie Ca²⁺- Konzentration von Lösung IV (s.S.25), durch Zugabe eines spezifischen Chelatbildners (EGTA) eingestellt werden. Die externe Na⁺- Konzentration wurde auf 5mmol/l eingestellt, was etwa dem physiologichen cytosolischen Ruhewert entspricht. Durch die auswärts gerichteten Gradienten für Ca²⁺ und Na⁺ kann die Überladung des Cytosols und der zellulären Ca- Speicher rückgängig gemacht werden. Die hohe K-Konzentration der Lösung III (125mmol/l) bewirkt einen passiven K-Influx. Dadurch wird der intrazelluläre K⁺-Spiegel und damit das Membranruhepotential wieder normalisiert.

Im folgenden wird die Prozedur der Zellisolation beschrieben.

C.5 Protokoll der Zellisolation

Versuchstier mit Äther Zunächst wurde das bis 7.11m Atemstillstand (ca.90-120 sec.) narkotisiert. Danach wurde es durch Genickbruch und Durchschneiden der Arteriae carotides getötet. Durch einen flachen, medianen Längsschnitt beginnend etwa 6cm unterhalb des Sternums hinauf bis in Höhe der Claviculae wurden Abdomen bzw. Thorax unter Durchtrennung der eröffnet. Der Thoraxraum wurde durch laterale Rippen Einschnitte unterhalb der Rippenbögen und Einschneiden des Zwerchfells gut zugänglich gemacht. Nach vorsichtiger Öffnung des Herzbeutels wurde das komplette Herz mit einem mindestens langen Stück Aorta herauspräpariert. Eventuell 5mm im Aortenstumpf befindliche Gerinnsel wurden vorsichtig entfernt, da diese die Perfusion be- oder verhindert hätten. In einer mit Lösung I (s.S.25) gefüllten Petrischale wurde die Aorta mit einer passend gekürzten Pipettenspitze (Standartips 100µl, Eppendorf, Hamburg, FRG) kanüliert. Dabei wurde die Aorta zunächst mit einer kleinen Bulldogklemme, danach zur Abdichtung zusätzlich mit feinem Bindfaden fixiert. Die Pipettenspitze mit dem kanülierten Herzen wurde an die Langendorff- Apparatur angeschlossen Abb.2A). Der erste Perfusionsschritt bestand in einer Spülung des Herzens mit 50ml nominell Ca- freier Lösung (Lös.I), die in der Regel bei ungehinderter Perfusion nach ca. 5min durchgelaufen waren (Flußgeschwindigkeit ca.10ml/min). Alle Perfusionslösungen wurden mit O_2 durchströmt und auf $37^{\circ}C$ temperiert. Der Perfusionsdruck betrug etwa 115hPa.

In einem zweiten Schritt wurde für 10min mit Enzymlösung (Lös.II, s.S.25) perfundiert. Die zunehmende Lyse der extrazellulären Matrix zeigte sich in einer fortschreitenden Aufblähung des Herzens und einer zum Ende der Enzymbehandlung ansteigenden Flußgeschwindigkeit des Perfusats. Da die 50ml Enzymlösung normalerweise in weniger als 10min. durchliefen, wurde das Perfusat aufgefangen und in den Kreislauf

zurückgeführt. Abschließend wurde das Herz für ca. 3min. mit Lösung III (s.S.25) perfundiert. Zum einen wurde so die Enzymlösung aus dem Gewebe gespült, zum anderen wurde das Myokard bereits mit der Inkubationslösung (Lös.III, s.S.25) in Kontakt gebracht.

Das Herz wurde von der Langendorff- Apparatur abgenommen und in einer Petrischale, die mit Lös.III gefüllt war, wurde das supraventrikuläre Gewebe abgeschnitten und verworfen. Die verbleibenden Ventrikel wurden mit einer feinen Schere in Stücke von ca. 2mm Kantenlänge zerschnitten. Der Überstand wurde dekantiert und die Ventrikelstückchen wurden in ein Gläschen mit frischer Lös.III überführt. Nachdem die Ventrikelstücke sedimentiert waren, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und mit Lös.III aufgefüllt. Durch leichtes Schwenken des Gläschens wurden isolierte Zellen aus dem Gewebe gelöst. Nach etwa 1-2 Minuten hatten sich gröberer Detritus und undissoziierte Gewebereste abgesetzt, so daß die Zellsuspension behutsam abgetrennt werden konnte. Diese Reinigungsprozedur erbrachte eine für die nachfolgenden elektrophysiologischen Untersuchungen hinreichende Sauberkeit der Zellsuspension. Auf Zentrifugationsschritte, die häufig Zellisolationen eingesetzt werden, wurde bewußt. bei verzichtet. Eigene Beobachtungen ergaben nämlich, daß die Zellen, die durch die Zentrifugation in ein Pellet gepreßt werden, nach der Resuspension oft schwer geschädigt und für die Experimente unbrauchbar waren. Möglicherweise werden die durch die Zentrifugation mechanisch geschädigt. Zellen Denkbar ist aber auch eine Schädigung durch Hypoxie oder Anoxie der pelletierten Zellen.

Nach der Isolation verblieben die Zellen in Lösung III (s.S.25), wobei eine Inkubationsdauer von ca. 60 min nicht unterschritten werden durfte. Erfahrungsgemäß war bei kürzeren Inkubationszeiten die Calcium- Toleranz der Zellen noch nicht ausreichend. Ein längeres Verbleiben der Zellen in Lösung III für den jeweiligen Versuchstag (6-10h, 22-24°C)

war unproblematisch. Für die elektrophysiologischen Experimente wurden die Zellen direkt aus der Lösung III entnommen. Abb.4 (oben) zeigt intakte isolierte Zellen mit der charakteristischen Querstreifung.

Verwendete Lösungen (mmol/l)

Lösung I (nominell Ca²⁺ - frei)

KCl: 4.7, NaCl: 120, MgCl₂: 2, Na- Pyruvat: 5, N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES): 10, Glucose: 20, Taurin: 20, der pH- Wert wurde mit NaOH auf 7.4 eingestellt.

Lösung II (Enzymlösung):

entsprach Lösung I, jedoch wurden 0.5mg/ml Collagenase (Typ Ia, C-9891, Sigma Chemie, Deisenhofen, FRG) und 0.5mg/ml Albumin (Bovine, A-6003, Sigma- Chemie) zugegeben.

Lösung III (Inkubationslösung):

KCl: 115, CaCl₂: 1; MgCl₂: 2, K₂HPO₄: 5, Na- Pyruvat: 5, Glucose: 20, Taurin: 20, EGTA ([Bis-(aminoethyl)-glycoläther-N-N-N',N'-tetraessigsäure; 3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure]): 2.1, Taurin: 20, Glucose: 20, HEPES: 10, der pH wurde auf 7.4 mit KOH eingestellt.

Lösung IV (Standardbadlösung):

KCl: 4.7, NaCl: 120, MgCl₂: 2, CaCl₂: 1.8, Na- Pyruvat: 5, HEPES: 10, Glucose: 20

Lösung V

(Pipettenlösung): KCl: 140, NaCl: 10, MgCl₂: 2, HEPES: 10, EGTA: 2.1, CaCl₂: 1, der pH-Wert wurde mit KOH auf 7.2 eingestellt.

C.6. Herstellung der Mikroelektroden

Die zur Ableitung verwendeten Mikroelektroden wurden aus Borosilikat- Glasrohr mit eingezogenem Filament (1.5x0.3mm; Hilgenberg, Malsfeld, FRG) hergestellt. Aus etwa 50mm langen Abschnitten des Glasrohrs wurden mittels eines zweistufigen Elektrodenziehgerätes (H. Ochotzki, Homburg, FRG) jeweils zwei Mikroelektroden hergestellt. Nach dem Ziehen wurden die Spitzen der Mikroelektroden durch vorsichtiges Glühen (Micro-Forge MF79, Narishige, Tokyo, Japan) geglättet. Der Spitzendurchmesser der fertigen Mikroelektroden betrug ca. 0.5-1µm. Danach wurden die Mikroelektroden mit Pipettenlösung gefüllt. Durch das in (Lös.IV, s.S.25) der Elektrode befindliche Filament füllten sich auch die Elektrodenspitzen problemlos und blasenfrei. Der Widerstand der gefüllten Mikroelektroden betrug 2-5M Ω . Ein chlorierter Silberdraht (0.3mmØ) stellte den Kontakt zwischen Pipettenlösung und dem Elektrodenhalter her. Das Schema der Registrierung und Aufzeichnung der Signale zeigt Abb.5. Die Referenzelektrode bestand aus einem 0.4mm starken chlorierten Silberdraht, der am inneren Rand des Versuchsbades angebracht wurde.

C.7 Versuchsbäder

Die meisten Versuche wurden bei Zimmertemperatur in einem Plexiglasbad von ca. 400µl Volumen durchgeführt. Bereits zu Beginn der Experimente für die vorliegende Arbeit wurde mit der Entwicklung und dem Bau eines neuartigen Versuchsbades begonnen, das eine Untersuchung der Membranströme unter definierten Temperaturverhältnissen ermöglichte, da erste Versuche eine extreme Temperaturabhängigkeit der untersuchten Ströme ergaben. Die Anlage ermöglichte aufgrund minimierter thermischer Zeitkonstanten hoher und Leistung des Peltierelementes (25/50W) sehr schnelle Temperaturänderungen

(1°C/s) bei hoher Genauigkeit (≤0.1°C) und Temperaturkonstanz (≤0.05°C) über den gesamten Temperaturbereich von 10-60°C. leicht eingeschränkter Genauigkeit Mit konnten auch Temperaturen bis nahe an den Gefrierpunkt erreicht werden. Die Temperatur wurde von einem Mikrotemperatursensor (Siemens K18 bzw. K29) im Bad gemessen und die voreingestellte Temperatur wurde über einen Regelverstärker (Eigenbau) und ein Peltierelement konstant gehalten. Da sowohl das Superfusat wie das Versuchsbad selbst von dem gleichen Element temperiert wurden, war die Temperaturkonstanz unabhängig von der Temperatur und der Flußgeschwindigkeit des Perfusats. Auf eine detaillierte Beschreibung der Badkonstruktion und des zugehörigen Regelverstärkers muß hier aus Platzgründen verzichtet werden.

C.8. Lösungstransport

Die untersuchten Zellen mußten ständig mit frischer Nährlösung und Sauerstoff versorgt werden. Darüber hinaus sollte der Einfluß Pharmaka oder von Lösungen mit verschiedenen Ionenkonzentrationen untersucht werden. Daher war es notwendig, einen möglichst schnellen Wechsel des Perfusats innerhalb eines individuellen Experiments zu ermöglichen.

experimentellen Die in vielen Bereichen benutzten Peristaltikpumpen schieden zum Lösungstransport wegen der Pulsatilität der Strömung aus. Die extremen starken Zellen regelrecht von Druckschwankungen rissen die der Mikroelektrode ab. Auch das im Vergleich zur notwendigen geringen Perfusionsgeschwindigkeit (ca.0.5ml/min) sehr hohe Lösungsvolumen erwies sich als nachteilig. Daher wurden die mit Lösungen zunächst motorisch angetriebenen Perfusorspritzen (50ml Volumen) zugeführt, wie sie auch in der Klinik für Infusionen verwendet werden. Dieses Verfahren

äußerst umständlich, da ein war jedoch schneller Lösungswechsel nicht möglich war und für jede Lösung eine eigene Spritze gefüllt werden mußte. Zudem entstanden beim Wechsel der Spritzen immer Zeiten, in denen die Zellen nicht superfundiert wurden. Darüber hinaus erschütterten die beim unvermeidlich großen Wechsel ins System gelangenden Luftblasen das Superfusat oft derart, daß die Zellen von der Elektrode abrissen. Sonstige handelsübliche Pumpen Funktionsprinzipien schieden verschiedenster entweder aufgrund übergroßer Totvolumina, viel zu großer Fördermengen oder sonstiger Probleme (hauptsächlich Pulsatilität) aus. Daher wurde eine spezielle Mikro-Superfusionspumpe selbst entwickelt und gebaut, die konstruktionsbedingt arbeitet und pulsationsfrei aufgrund ihres minimierten Totvolumens (ca.200µl mit Zuleitungen) sehr schnelle und problemlose Lösungswechsel ermöglicht. Eine detaillierte Beschreibung der Pumpe soll hier aus Platzgründen nicht vorgenommen werden.

C.9 Elektrophysiologische Experimente

folgenden sei der prinzipielle Im Ablauf der elektrophysiologischen Experimente geschildert: Etwa 200µl der Zellsuspension wurden in die Versuchskammer übertragen. Die Versuchskammer war auf dem Kreuztisch eines invertierten Mikroskops (Nikon Diaphot TMD, Nikon, Tokio, Japan) montiert. Intakte Myozyten sedimentierten in der Regel innerhalb weniger Minuten und adhärierten leicht am Glasboden der Versuchskammer. Nach erfolgter Adhäsion wurden die Zellen mit physiologischer Badlösung (Lös.IV, s.S.25) superfundiert. Die Flußgeschwindigkeit betrug in der Regel ca. 0.5ml/min. Durch die Superfusion wurden nicht adhärierte Zellen sowie Zelltrümmer und sonstiger Detritus aus der Versuchskammer entfernt. Die Dauer dieses Spülvorgangs betrug mindestens 10

min, in denen die Zellen sich außerdem an das neue extrazelluläre Milieu gewöhnen konnten.

die mit gefüllte Danach wurde Pipettenlösung (s.u.) Mikroelektrode in die Badlösung eingetaucht. Die Mikroelektrode wurde mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (Narishige, Japan) unmittelbar über der Zelle positioniert. Eventuell vorhandene Diffusionsund Spitzenpotentiale wurden abgeglichen. Beim Eintauchen der Mikroelektrode in die intrazelluläre Lösung (Lös.V) wurde im Vergleich zur Badlösung ein Diffusionspotential von -4mV gemessen. Dieser geringe Fehler wurde nicht korrigiert, so daß alle angegebenen Potentiale 4mV negativer sind als angegeben. Die Elektrode wurde vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt und soweit vorgeschoben, bis die Membran sichtbar leicht eingedrückt wurde. Durch einen leichten qanz Unterdruck in der Mikroelektrode wurde eine hochohmige Verbindung (>1G Ω , "gigaseal") zwischen der Spitze der Mikroelektrode und der Zellmembran herbeigeführt. Um nun einen niederohmigen Zugang zum Zellinneren zu erreichen, wurde meist weiterhin ein zunehmender Unterdruck in der Mikroelektrode aufgebaut, mit dem Ziel, die unter der Mikroelektrodenspitze liegende Zellmembran ("patch") aufzureißen. Dieses Verfahren führte aber oft nicht zum denn entweder konnte der "patch" auch Erfolq, bei höchstmöglichem Unterdruck nicht aufgerissen werden, oder aber mit dem Aufreißen des "patchs" wurde auch die Verbindung Mikroelektrode- Membran niederohmig. Darum wurde folgendes Verfahren angewandt: dem unter der Mikroelektrode liegenden Membranbereich ("patch") wurden repetitive Strompulse (5ms Dauer, 50Hz) von der Amplitude aufgeprägt, die eine Spannung 200mV (Aussteuerungsgrenze des EPC-7) hervorriefen. von Zusätzlich wurde während der Stromapplikation der Unterdruck in der Mikroelektrode gesteigert. Diese Kombination von Strombelastung des "patches" und Unterdruck erwies sich als optimal, um den "patch" unter der Elektrodenspitze

niederohmig zu machen. Darauf wurde zunächst das Membranpotential der Zelle gemessen (Stromklemme). Lag dies im Bereich physiologischer Werte (negativ zu -70mV), so wurde die Erregbarkeit der Zelle überprüft. Mit Strompulsen von zunächst 0.5-1ms Dauer wurde von null beginnend mit steigender Stromamplitude die Schwellenreizstärke zur Auslösung eines Aktionspotentials ermittelt. Bei intakten Zellen betrug diese 0.4-1.5nA. Blieb ein Aktionspotential bei serieller Reizung aus, so wurde die Reizdauer erhöht. War bei 4-5ms noch immer keine Erregung zu beobachten, so wurde die Zelle verworfen. Um die Stabilität der Zelle bzw. der Ableitung vorab zu überprüfen, wurden in der Regel für einige Minuten Aktionspotentiale mit einer Frequenz von 2-3Hz und etwa 120% der Schwellenreizstärke ausgelöst. Anhand des Zeitverlaufs der Aktionspotentiale konnte schon grob die Aktivität der repolarisierenden Ströme abgeschätzt werden. Die elektrische Reizung der Zellen war in den ersten Minuten in nahezu allen Fällen von entsprechenden Kontraktionen begleitet. Die Stärke der Kontraktionen ließ aber meist nach einigen Minuten deutlich nach, um schließlich ganz zu sistieren. Dieses Phänomen läßt sich folgendermaßen erklären: nachdem ein niederohmiger Zugang zur Zelle geschaffen worden besteht ein Flüssigkeitsaustausch ist, zwischen Pipettenlösung und Cytosol. Da in der Pipettenlösung (s.o.) die Ca²⁺- Konzentration mit EGTA auf ca. 10-8 mol/l eingestellt und gepuffert ist, wird auch die cytosolische Ca²⁺- Konzentration nach einer Zeit der Äquilibrierung auf diesen Wert gepuffert. Eine Ca^{2+} - Konzentration von 10^{-8} mol/l entspricht etwa der Ruhekonzentration der Zelle. Während des Aktionspotentials strömt Ca²⁺ in die Zelle und die intrazelluläre Ca²⁺- Konzentration steigt in Abwesenheit von EGTA kurzfristig auf Werte von ca. 10^{-6} mmol/l an (Leblanc und Hume, 1990; Lipp et al., 1992; Rüegg, 1988), wodurch der kontraktile Apparat aktiviert wird. Eine Pufferung des cytosolischen Calciums auf 10^{-8} mmol/l verhindert einen durch

das Aktionspotential getriggerten starken Ca²⁺- Anstieg über den gepufferten Wert und damit auch die Kontraktion der Zelle. Der Zeitraum vom ersten niederohmigen Zellkontakt bis zum Ausbleiben der Kontraktion unter Reizung entspricht daher dem Einwaschen der Pipettenlösung in die Zelle.

C.10. Registrierung und Auswertung der Meßwerte

Wie oben bereits erwähnt, wurde zur Messung von Membranpotentialen und -strömen ein List EPC-7 Spannungsklemmverstärker eingesetzt. Die Kommandosignale erhielt der EPC-7 über einen PC. Bei einigen Experimenten wurde auch ein analoger Signalgenerator eingesetzt. Der PC war ausgerüstet mit einem Steuerprogramm zur Generierung von Signalmustern, die über einen nachgeschalteten 8-bit D-A-Spannungsklemmverstärker Wandler den ansteuerten. Aktionspotentiale wurden in der Regel in Intervallen von 50-100µs abgetastet, die Kommandosignale und die Membranströme je nach Bedarf zwischen 100µs und 1ms. Die Signalmuster und die entsprechenden Membranströme wurden auf einem Oszilloskop beobachtet und parallel über einen 12-bit A-D- Wandler dem Rechner zugeführt und auf der Festplatte gespeichert. Die Auswertung der Signale erfolgte off-line über ein spezielles Auswerteprogramm. Die Hardund Software für die Registrierung und Auswertung wurden von F.J.Katterbach und G.Chini erstellt.

D. Ergebnisse

1. Zwei transiente Auswärtsströme im Rattenventrikel

Wenn das Membranpotential einer ventrikulären Rattenmyozyte bei Zimmertemperatur von einem negativen Haltepotential, beispielsweise vom Ruhepotential (ca.-80mV) auf Testpotentiale positiv zu OmV geklemmt wurde, so war zunächst schnell aktivierender Auswärtsstrom zu beoachten ein (Abb.6A). Nach Erreichen eines initialen "peaks" inaktivierte der Strom zeitabhängig ungeachtet des fortdauernden depolarisierenden Testpulses. Die Inaktivierung konnte sehr mit einer monoexponentiell abfallenden Funktion qut wobei die Zeitkonstante bei beschrieben werden, Zimmertemperatur 20-40ms betrug. Im Beispiel in Abb.6A hatte sie einen Wert von τ =34ms. Dieser zeitabhängige oder "transiente" Strom ist in der Literatur als "transienter Auswärtstrom" oder "ito" (neben vielen anderen Bezeichnungen) bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Strom als "schnell inaktivierender transienter Auswärtsstrom" oder "ito,f" bezeichnet. Nach Ablauf 4 von Inaktivierungszeitkonstanten (4 τ_{f} bzw. 80-160ms bei Zimmertemperatur) hätten eigentlich bei fortdauernder Depolarisation nur noch zeitunabhängige ("instantane") Stromkomponenten auftreten dürfen, da der ito, f- Strom auf a= $1/e^4$ oder ca.1.8% des Maximalwertes (a), also auf eine vernachlässigbare Amplitude abgesunken war. Stattdessen zeigte sich ein zweiter, sehr langsam inaktivierender transienter Auswärtsstrom, dessen Inaktivierungsprozeß ebenfalls durch eine monoexponentiell abfallende Funktion mit Zeitkonstanten von τ = 1-2s beschrieben werden konnte. Im Beispiel (Abb.6A) betrug sie τ =1.6s. Aufgrund der langsamen Inaktivierung wurde diese Stromkomponente als "langsam inaktivierender transienter Auswärtsstrom" oder "ito,s" bezeichnet.

Um eine vollständige, zeitabhängige Inaktivierung des ito,s zu beobachten, reichten Testpulse von 1 Sekunde wie in Abb.6A gezeigt, naturgemäß nicht aus. Daher wurde in einigen Experimenten die Dauer der Testpulse auf 10s verlängert Ausgehend von einem hyperpolarisierenden (Abb.6B). Konditionierungspotential von -120mV wurde ein Testpuls (40mV) von 10s Dauer appliziert, innerhalb dessen nach der schnellen Inaktivierung des ito,f-Stroms auch die vollständige zeitabhängige Inaktivierung des ito,s- Stroms zu beobachten war. Nach einem Konditionierungspotential positiv zu ca. -40mv (-38mV in Abb.6B) konnten überhaupt keine transienten Ströme mehr beobachtet werden, d.h. beide Stromkomponenten unterlagen einer spannungsabhängigen Inaktivierung. Die Originalregistrierungen in Abb.6B verdeutlichen auch, daß der zeitabhängig inaktivierende ito,s- Strom identisch war mit dem spannungsabhängig inaktivierbaren da unabhängig ito,s/ vom Konditionierungspotential die Auswärtsströme am Ende des 10s-Testpulses identisch waren.

Eine repetitive Aktivierung mit 10s dauernden Testpulsen bedeutete einen erheblichen Stress für die untersuchten Zellen, die unter diesen Bedingungen mit instabilen Ableitungen reagierten. Um reproduzierbare Membranströme mit solch langen Testpulsen zu erhalten, mußten zwischen aufeinanderfolgenden Aktivierungen jeweils Pausen von 2min -80mV bei einem physiologischen Haltepotential von eingeschaltet werden. Dies hätte die experimentelle Ausbeute außerordentlich reduziert und viele aufwendige Experimente mit komplizierten Klemmustern wären gänzlich unmöglich gewesen. Daher wurden die transienten Auswärtsströme in der Regel mit 1- sekündigen Testpulsen aktiviert. Dies war wie oben gezeigt, der zeitabhängig möglich, da, inaktivierende ito,s-Strom identisch war mit dem spannungsabhängig inaktivierbaren ito,s - Strom. (Die exakte

Beschreibung der quantitativen Auswertung der beiden transienten Auswärtsströme folgt in Kapitel D.2). Wurde innerhalb der Inaktivierungsphase des itors auf ein Potential von ca. -30mV geklemmt, so konnten ebenfalls langsam inaktivierende, sogenannte Tail- Ströme abgeleitet werden (Abb.6A). Diese Tail- Ströme waren eng mit der Aktivität des i_{to,s}- Stromes korreliert und stets proportional zu dessen Amplitude: nach vollständiger zeitabhängiger Inaktivierung des i_{to.s}- Stromes (6-10s) konnte kein Tail- Strom mehr registriert werden. Dies zeigt Abbildung 6B, wo nach dem 10s Testpuls und vollständiger zeitabhängiger Inaktivierung des ito,s kein Tail- Strom registriert wurde. Dies traf auch zu, wenn der ito,s- Strom spannungsabhängig inaktiviert war (Konditionierungspotential -38mV, s.Abb.6B). Nur wenn innerhalb der Inaktivierungsphase des ito,s- Stroms, auf Potentiale von ca. -30mV geklemmt wurde, konnte ein Tail- Strom registriert werden (Abb.6C). Nach spannungsabhängiger Inaktivierung des ito,s- Stroms durch ein Konditionierungspotential von -38mV war nach einem kurzen Testpuls (1s Dauer) kein Tail-Strom zu beobachten.

2. Spannungsabhängigkeit der transienten Auswärtsströme

2.1. Spannungsabhängige Inaktivierung

schon Für den ito,f- Strom im Rattenventrikel wurde frühzeitig (Josephson et al., 1984) eine Spannungsabhängigkeit Aktivierung bzw. Inaktivierung beschrieben. der Die Originalregistrierungen in Abb.6B,C bestätigen die spannungsabhängige Inaktivierung des ito,f- Stroms und zeigen darüber hinaus, daß auch der ito.s-Strom einer spannungsabhängigen Inaktivierung unterliegt. Zur Analyse der spannungsabhängigen Inaktivierung wurden die transienten Auswärtsströme bei einem konstanten Testpotential

aktivert, wobei die vorhergehenden Konditionierungspotentiale variiert wurden. Originalregistrierungen eines typischen Experiments sind in Abb.7A zu sehen: die transienten Ströme wurden bei einem Testpotential von 46mV aktiviert, wobei jeweils Konditionierungspotentiale zwischen -26 und -138mV vorangingen. Tail- Ströme des ito,s-Stroms wurden -28mV anschließend bei aufgenommen. Bei einem Konditionierungspotential von -125mV waren beide transienten Auswärtsströme und ebenso der Tail- Strom noch maximal aktivierbar. Bei -83mV war der i_{to,f}- Strom noch voll auslösbar, während der ito,s- Strom und dessen Tail- Strom bereits nur noch etwa halbmaximal waren. Bei -55mV war der ito,f- Strom etwa halbmaximal auslösbar, während der ito,s-Strom und der Tail- Strom bereits vollständig inaktiviert war. Ein Konditionierungspotential von -40mV bewirkte eine komplette Inaktivierung beider transienter Auswärtsströme.

Die Auswertung der transienten Auswärtsströme ist schematisch in Abb.7B dargestellt. Der $i_{to,f}$ - Strom wurde hier, im Unterschund zu dem in der Literatur vorherrschenden Verfahren, das den peak- Auswärtsstrom als Meßwert heranzieht, als zeitabhängig inaktivierender Strom ausgewertet. Hierzu wurde von dem peak- Auswärtsstrom der Auswärtsstrom zum Zeitpunkt 4 τ_f (80-160ms bei Zimmertemperatur) subtrahiert, zu dem der $i_{to,f}$ - Strom vollständig inaktiviert war. Die Vorteile dieses Auswerteverfahrens werden ausführlich in der Diskussion erläutert.

Der langsam inaktivierende transiente Auswärtsstrom wurde nach Inaktivierung des $i_{to,f}$ - Stroms bestimmt, indem ebenfalls der Auswärtsstrom zum Zeitpunkt $4\tau_f$ bestimmt wurde und von diesem Strom der nach spannungsabhängiger Inaktivierung noch verbleibende Rest- Auswärtsstrom abgezogen wurde (Referenzstrom). Als Referenzstrom wurde die Stromspur mit dem negativsten Konditionierungspotential herangezogen, bei der gerade kein transienter Auswärtsstrom mehr

aktivierbar war. Dies war in der Regel bei einem Konditionierungspotential von etwa -30 bis -40mV der Fall, im Beispiel (Abb.7A) bei einem gezeigten Konditionierungspotential von -40mV. Der Zeitpunkt $4\tau_{f}$ war gewissermaßen der frühestmögliche sichere Auswertepunkt für ito.s. Es ist möglich, die Auswertung zu späteren den Zeitpunkten innerhalb der Inaktivierungsphase des ito,s (6-10s) vorzunehmen. Dies führt zu identischen Kurven für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, jedoch ist die Amplitude des $i_{to,s}$ bei $4\tau_f$ aufgrund der langsamen Inaktivierung noch nahezu maximal und daher die Amplitudenmessung am genauesten.

Bei Klemmschritten von ca. 40mV auf ca. -30mV (-28mV im Beispiel der Abb.7) wurden die Tail- Ströme ebenfalls in Abhängigkeit vom Konditionierungspotential untersucht. Als Referenzstrom diente jeweils die Stromspur mit dem gleichen Konditionierungspotential wie bei der Bestimmung des $i_{to,s}$ -Stroms.

Für beide transienten Auswärtsströme wurden steady- state-Inaktivierungskurven ermittelt, indem die jeweiligen Stromamplituden (Ordinate) nach Normierung auf den jeweiligen Maximalwert gegen das Konditionierungspotential (Abszisse) aufgetragen wurden. Die Strom- Spannungswerte wurden durch eine Boltzmann- Verteilung beschrieben und auf kleinste Fehlerquadrate angepaßt. In der Gleichung i/imax=1/(1+exp(Vm-V_h)/k)) bedeuten i_{max} den maximalen Strom, V_m das Testpotential, V_h das Potential halbmaximaler Inaktivierung bzw. Aktivierung und k den Steigungsfaktor. Abb.7C zeigt Inaktivierungskurven, die aus den Meßwerten der Abb.7A errechnet wurden. Die Inaktivierungskurve des ito,f- Stroms war charakterisiert durch eine halbmaximale Inaktivierung bei -60.5mV und einen Steigungsfaktor von 4.5mV. Aus 10 Experimenten ergab sich ein Mittelwert von -58 \pm 5mV für V_h und 5.4 \pm 1mV für den k- Faktor. Der "Steuerungsbereich" des virtuellen ito,f- Inaktivierungstores erstreckte sich
demgemäß über ca. 40mV (ca.-80 bis -40mV). Die Inaktivierungskurven des $i_{to,s}$ - Stroms bzw. der zugehörigen Tail- Ströme waren quasi identisch, unterschieden sich jedoch signifikant von der Inaktivierungskurve des $i_{to,f}$ - Stroms. Die halbmaximale Inaktivierung betrug im Beispiel der Abb.7 -86.7 bzw. -85.9mV, die k- Faktoren 9.8 bzw. 10.6mV. In Übereinstimmung mit dem hohen Steigungsfaktor reguliert das virtuelle $i_{to,s}$ - Inaktivierungstor den $i_{to,s}$ - Strom über einen großen Potentialbereich von ca. -120 bis ca. -60mV. Die Mittelwerte aus 9 Experimenten ergaben Werte für V_h=-87 ± 4.2mV bzw. 88.5 ± 3.8mV und für k=10.3 ± 2.6mV bzw. 9.9 ± 2.4mV.

2.2 Spannungsabhängige Aktivierung

Aktivierung des ito,f- Stroms

im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wurde die Wie Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bestimmt, indem die Öffnung des virtuellen Inaktivierungstores in Abhängigkeit vom Konditionierungspotential untersucht wurde. Dabei war das Testpotential konstant und lag in einem Bereich, wo das virtuelle Aktivierungstor zumindest teilweise geöffnet war. Analog dazu wurde die spannungsabhängige Öffnung des virtuellen Aktivierungstores bei variablen Testpotentialen und konstantem Konditionierungspotential durchgeführt. Dabei mußte letzteres so gewählt werden, daß das virtuelle Inaktivierungstor nicht geschlossen war. Um eine möglichst große Stromamplitude messen zu können, wurden für die Experimente, ausgehend von den Inaktivierungskurven aus Abb.7C, Konditionierungspotentiale für den ito,f- Strom von -50 bis -60mV verwendet, bei denen der ito,s- Strom nahezu vollständig inaktiviert, der ito,f- Strom aber noch etwa

halbmaximal war. Für die Aktivierung des $i_{to,s}$ - Stroms wurden Konditionierungspotentiale von etwa -120mV benutzt, die eine vollständige "recovery of inactivation" garantierten. Da der $i_{to,s}$ - Strom nach zeitabhängiger Inaktivierung des $i_{to,f}$ -Stroms (4 τ f) gemessen wurde, war mit letzterem trotz seiner Aktivierung keine Interferenz zu befürchten.

8A zeigt Originalregistrierungen Abbildung von ito,f-Strömen, die, ausgehend von einem Konditionierungspotential von -58mV, bei verschiedenen Testpotentialen zwischen -39 und 43mV aktiviert wurden. Wie bereits erläutert, war der ito,s-Strom bei -58mV inaktiviert. Die Aktivierungskurve des ito,f-Stroms wurde ermittelt, indem die den ito,f- Strömen zugrunde liegenden Leitfähigkeiten (Ordinate) gegen das Testpotential (Abszisse) aufgetragen wurden. Die Leitfähigkeiten g wurden nach der Formel $q = i/(V_m - V_{ion})$ errechnet, wobei i den V_m das Membranpotential und Membranstrom, Vion das Gleichgewichtspotential des Stroms bedeutet (Abb.8B). Die Auswertung des ito,f- Stroms erfolgte entsprechend der zuvor (s.Abb.7B) beschriebenen Methode: der "peak"- Auswärtsstrom wurde gemessen und der Auswärtsstrom zum Zeitpunkt 4τf subtrahiert. Die "Aktivierungskurve" des ito,f- Stroms verläuft nicht sigmoid, wie es bei Annahme von zwei Steuerungstoren zu erwarten wäre, sondern innerhalb des untersuchten Potentialbereichs quasi linear, ohne Andeutung von Sättigung im positiven Potentialbereich. Aufgrund dieser Strom- Spannungsabhängigkeit war es naturgemäß nicht möglich, die Kurve durch eine Boltzmann- Verteilung zu beschreiben. Dementsprechend konnten auch keine Kenndaten wie halbmaximale Aktivierung und Steigungsfaktor ermittelt werden. Auf dieses Phänomen wird in der Diskussion (Kap.E1) noch ausführlich eingegangen. Es konnte lediglich ein Schwellenpotential der Aktivierung ermittelt werden, das im dargestellten Experiment, wie auch in anderen Experimenten, (n=8) bei etwa -40mV lag.

Aktivierung des ito,s- Stroms

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des i_{to,s} – Stroms zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Wege beschritten.

Zunächst wurde, nach einem Konditionierungspotential von -54mV nur der ito,f- Strom bei verschiedenen Testpotentialen aktiviert (Abb.9A). Dann wurden bei derselben Zelle und nach Konditionierung bei einem Membranpotential von -108mV beide transienten Auswärtsströme registriert (Abb.9B). Um nun "reine" ito,s - Ströme zu erhalten, wurden die Kurven, die nur den ito, f enthielten (Abb.9A, Konditionierungspotential -54mV) von den Stromspuren subtrahiert, die beide transienten Auswärtsströme enthielten (Abb.9B, Konditionierungspotential -108mV). Die Differenzkurven (Abb.9C) zeigten langsam inaktivierende (τ =1.5-2s), aber schnell aktivierende i_{to,s}-Ströme ($\tau \leq 10$ ms). Auf die Kinetik der transienten Auswärtsströme wird später (Abschnitt D.5) noch ausführlich eingegangen. Aus den Daten der Differenzkurven wurde die Aktivierungskurve rechnerisch ermittelt (Abb.9D). Da der ito,f- Strom spannungsabhängig ausgeschaltet war und durch die Differenzbildung alle weiteren, die Auswertung störenden Ströme eliminiert wurden, konnte die Auswertung als "peak"-Auswärtsstrom erfolgen. Im Gegensatz zu der Strom-Spannungskurve der ito,f- Aktivierung ergab die des ito,s-Stroms einen sigmoidalen Verlauf, so daß eine Boltzmann-Verteilung angepaßt werden konnte (Abb.9D). Die halbmaximale Aktivierung betrug V_h = -15.7mV, der Steigungsfaktor betrug k = 7.6 mV.

Als zweiter methodischer Ansatz zur Bestimmung der spannungsabhängigen Aktivierung des $i_{to,s}$ - Stroms wurden die $i_{to,s}$ - Tail- Ströme untersucht. Diese waren stets proportional zur Amplitude des $i_{to,s}$ und spiegeln die Schließung des virtuellen Aktivierungstores wider ("Deaktivierung", s.Abb.1). Ein typisches Experiment ist in

Abb.10 beschrieben. Der ito,s - Strom wurde, ausgehend von einem festen Konditionierungspotential (im Beispiel -120mV) bei verschiedenen Testpotentialen zwischen -45 und 52mV aktiviert, wobei die resultierenden Ströme zum einen den jeweiligen Öffnungszustand des virtuellen ito,s Aktivierungstores widerspiegeln, zum anderen aber auch von dem sich mit dem Testpotential ändernden elektrochemischen Gradienten ("treibende Kraft") abhängen. Wenn nun die ito,s-Ströme bei einem gemeinsamen Testpotential abgeleitet wurden, so war es möglich, unmittelbar nach Umschalten auf das konstante "Tail- Potential" (im Beispiel -29mV) alle itors bei identischem elektrochemischen Gradienten Ströme ("treibende Kraft") zu registrieren. Dementsprechend sind die unterschiedlichen Amplituden der Tail- Ströme ein direktes den jeweiligen Öffnungszustand Maß für des ito,s-Aktivierungstores. In Abb.10B sind die normierten Tail-(Ordinate) gegen das Testpotential (Abszisse) Ströme aufgetragen. Die Auswertung von Tail- Strömen ist grundsätzlich umso genauer möglich, je langsamer die Kinetik des untersuchten Stromes ist. Daher wurden bislang auch keine Tail- Ströme vom schnellen ito,f- Strom publiziert. Die ito,s-Tail- Ströme aus dem Beispiel in Abb.10A sind in Abb.10B als normierte Werte (i/imax, Ordinate) gegen das Testpotential (Abszisse) aufgetragen. Der Verlauf der Aktivierungskurve ist rechnerische sigmoidal. Die Anpassung erqab eine -14.2mV halbmaximale Aktivierung bei und einen Steigungsfaktor von -11.8mV. Aus 6 Experimenten resultierten folgende Mittelwerte: V_h =13.5 \pm 1.8mV und k =9.2 \pm 1.5mV.

3. Unterschiede in der Ausprägung der transienten Auswärtsströme

In der überwiegenden Zahl der Experimente konnten beide transienten Ströme abgeleitet werden. Es wurden jedoch immer wieder Zellen, gefunden, bei denen die Ausprägung der beiden Stromkomponenten Unterschiede aufwies. Im Extremfall konnte ausschließlich einer der beiden transienten Auswärtsströme registriert werden. Diese Zellen zeigten keine signifikanten Abweichungen in Bezug auf das Ruhepotential, die Morphologie oder sonstige Stromkomponenten. Diese Zellen waren geeignet, zusätzliche bzw. bestätigende Informationen über die Zeitabhängigkeit der Spannungsund transienten gewinnen. Derartige Zellen Auswärtsströme zu mit ausschließlicher Ausprägung eines der beiden transienten Auswärtsströme traten im Durchschnitt etwa mit einer Häufigkeit von etwa 1% auf.

Aus den Differenzkurven (Abb.9) wurde bereits die Information gewonnen, daß der ito,s- Strom zwar sehr langsam inaktiviert, aber offensichtlich schnell, mit Aktivierungszeitkonstanten unter 10ms aktiviert. Zellen, die nur den ito.s- Strom aufwiesen, ergaben eine weitere Bestätigung für den schnellen Aktivierungsprozeß dieses Stroms. Originalregistrierungen einer derartigen Zelle (Abb.11A) dokumentieren von ausschließlich schnell aktivierende ($\tau \leq$ 10ms) und langsam inaktivierende (im Beispiel: τ = 1.3-1.5s) Ströme. Auch die Tail-Ströme vorhanden. typischen waren Die Konditionierungspotentiale wurden im Bereich von -148 bis -40mV bei einem konstanten Testpotential von 49mV variiert. Aus den Ableitungen wurden Inaktivierungskurven konstruiert. hier der schnelle ito,f- Strom fehlte, konnte der Da Auswertezeitpunkt für den i_{to,s}- Strom nicht, wie in Abb.7 dargestellt, auf $4\tau f$ gelegt werden. Hier wurde der Maximalwert der jeweiligen Stromspuren gegen den Strom in der Referenzstromspur gemessen (s.auch oben). Als

Referenzstromspur wurde die Stromspur mit einem Konditionierungspotential von -40mV definiert. In bekannter Weise wurden Inaktivierungskurven des ito,s- Stroms und der ito,s- Tail- Ströme ermittelt (Abb.11B). Der Kurvenverlauf ergab die charakteristischen Werte für den ito.s- Strom bzw. die Tail- Ströme: die halbmaximale Inaktivierung (Vh) für den ito,s und die Tail- Ströme betrugen -91.6mV bzw. -91.9mV, die zugehörigen Steigungsfaktoren betrugen 11.6mV und 12.2mV. Mittelwerte aus Experimenten mit 4 derartigen Zellen ergaben Werte für V_h= 89.6 \pm 3.6mV bzw. 90.1 \pm 4.2mV und für k= 10.8 2.3mV bzw. 11.5 ± 3.3mV. Die Übereinstimmung der ± Inaktivierungskurven für den ito,s- Strom und die Tail-Ströme läßt sich anhand der normierten Inaktivierungskurven verdeutlichen, wobei die einzelnen Stromwerte in Bezug zu dem jeweiligen Maximalwert normiert wurden. Bei Zellen mit offensichtlicher Abwesenheit des ito,f- Stroms blieb ein Hemmstoff des ito, f- Stroms (z.B. 4-AP, s. Kapitel D.4) ohne Wirkung.

Abb.12A zeigt demgegenüber Registrierungen einer Zelle, die auch bei sehr negativen Konditionierungspotentialen ausschließlich den ito,f- Strom zeigte. Über den gesamten abgeleiteten Potentialbereich (-108 bis -22mV) war nur die schnell inaktivierende ito,f- Komponente zu erkennen. Nach Inaktivierung des schnellen ito,f - Stroms lagen alle Auswärtsströme, unabhängig vom vorhergegangenen Konditionierungspotential, auf identischem Niveau. Die Inaktivierungskurve (Abb.12B) war charakteristisch für den ito,f- Strom mit einer halbmaximalen Inaktivierung von -61mV und einem Steigungsfaktor von 5.8mV. Die Mittelwerte der ausgewerteten Experimente ergaben V_h= -59.4 \pm 2.3mV bzw. $k = 4.7 \pm 1.3 mV.$

4. Pharmakologische Modulation der transienten Auswärtsströme

Die pharmakologische Modulation von Ionenkanälen ist ein wichtiges Werkzeug in der modernen Therapie und bei der Analyse und Identifizierung von Ionenkanälen. Es wurden viele Substanzen, häufig tierische oder pflanzliche Gifte, als Ionenkanalmodulatoren identifiziert. Es werden aber auch große Anstrengungen unternommen, synthetische Substanzen zu entwickeln, die gezielt in definierter Weise und möglichst selektiv, bestimmte Ionenkanäle modulieren. Es sind viele Modulatoren des ito,f- Stroms beschrieben worden, die jedoch nahezu alle nicht selektiv sind. Unter ihnen finden sich viele therapeutisch verwendete Substanzen wie Anaesthetika, Antiarrhythmika, Psychopharmaka, Calciumantagonisten oder einige Rezeptorenblocker (Kenyon und Gibbons, 1979; Castle, 1991; Castle 1990b; Imaizumi und Giles, 1987), Ca-Antagonisten (Berger et al.; 1989a, Coulombe et al., 1989; Ravens et. al, 1989; Fedida et al., 1990; Lefevre et al., 1991; Delpon et al., 1992; Duan et al, 1993; Zhang et al., 1994; Le Grand et al., 1995). Als einziger weitgehend Inhibitor wurde 4-Aminopyridin selektiver (4-AP) identifiziert, daß in Konzentrationen von etwa 10 µmol/l bis etwa 1-3mmol/l den i_{to,f}- Strom in den kardialen Geweben inhibierte (Kenyon und Gibbons, 1979; Thompson, 1982; Benndorf et al., 1987; Simurda et al., 1988; Castle und Slawsky, 1992; Berger et al., 1995).

In einer Serie von Experimenten wurde geprüft, ob 4– Aminopyridin ebenfalls den langsam inaktivierenden ito,s-Strom beeinflußt. Abbildung 13 zeigt ein Experiment, in dem zunächst unter Kontrollbedingungen beide transienten Auswärtsströme aktiviert wurden (Abb.13A, Konditionierungspotential -123mV). Zur Abschätzung der ito.s-Amplitude wurde zusätzlich der Referenzstrom bei einem Konditionierungspotential von -25mV registriert. Danach wurde 4-AP in einer Konzentration von 1mmol/l appliziert. Nach

wenigen Minuten verschwand der schnelle ito,f - Strom, während der ito,s - Strom auch nach längerer 4-AP- Einwirkung (bis zu ca.45min) unverändert persistierte (Abb.13B). Wie bereits zuvor gezeigt (s.Abschnitt C2.2), bestätigte sich nach Ausschaltung des i_{to,f} - Stroms die schnelle Aktivierungskinetik des ito,s - Stroms. Die Abb.13C zeigt den 4-AP- sensitiven Strom, der dem ito, f - Strom entspricht. Der Aktivierungsprozeß des 4-AP- sensitiven Stroms konnte durch eine monoexponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante von τ = 1.1ms angepaßt werden. Der unter 4-AP persistierende Strom ist als reiner ito,s- Strom anzusehen. Seine Aktivierung wurde mit einer Exponentialfunktion angepaßt, deren Zeitkonstante τ =3.2ms betrug (Abb.13D).

Da der $i_{to,s}$ - Strom bis 1993 (Weis et al., 1993b, Weis et 1995) nicht beschrieben wurde, existierten al., dementsprechend auch keine Untersuchungen über mögliche pharmakologische Modulatoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem das Tedisamil- Derivat Bertosamil in seiner Wirkung auf die transienten Auswärtsströme untersucht. Es waren bereits Daten zur Wirkung von Tedisamil auf den ito,f-Strom bekannt (Dukes und Morad, 1989), wobei allerdings unklar war, welcher Anteil der Tedisamil- Effekte einer Inhibition des (nicht einkalkulierten) ito,s - Stroms zuzuschreiben war. Meine Untersuchungen zeigten, daß Bertosamil konzentrationsabhängig den ito,s-Strom inhibierte, während der ito,f- Strom praktisch unverändert blieb. Abbildung 14 zeigt ein Experiment, in dem der Einfluß von 1 und 3 µmol/l Bertosamil auf die beiden transienten Auswärtsströme gemessen wurde. Im Vergleich zu 4-AP, das in wenigen Minuten seine maximale Wirkung entfaltete, dauerte die Einstellung eines neuen Gleichgewichts unter Bertosamil erheblich länger (ca.15min). Bei 1µmol/l Bertosamil wurde der ito,s- Strom etwa halbmaximal, bei 3µmol/l dagegen völlig inhibiert. Auch die Tail- Ströme wurden durch Bertosamil in gleichem Ausmaß reduziert (Abb.14A). Durch zusätzliche

Registrierung der Referenzstromspuren (spannungsabhängie Aktivierung von ito, f und ito, s) konnten die Amplitudeneffekte quantifiziert werden (Abb.14B). Die Referenzstromspuren wurden durch Bertosamil nicht beeinflußt. Um die Potentialabhängigkeit der Wirkung von Bertosamil auf die transienten Auswärtsströme zu untersuchen, wurden Inaktivierungskurven unter Kontrollbedingungen und unter 1 und 3µmol/l Bertosamil erstellt. Im gesamten untersuchten Spannungsbereich zeigte Bertosamil keinen Einfluß auf den ito,f- Strom (Abb.14C). Die Vh- Werte lagen bei -58.6, -59.3 und -59.5mV (0,1 und 3µmol/l Bertosamil). Die starke, konzentrationsabhängige Inhibition des ito,s- Stroms ist aus Inaktivierungskurven in Abb.14D erkennbar. Die den Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung blieb jedoch unverändert. Die halbmaximale ito,s- Inaktivierung lag unter Kontrollbedingungen bei -86mV und unter dem Einfluß von lumol/l Bertosamil bei -89mV. Die entsprechenden Steigungsfaktoren betrugen -10.3 und -12.3mV.

Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Wirkung von Bertosamil auf die Amplitude der beiden transienten Auswärtsströme wurden jeweils 3-7 Experimente bei fünf Bertosamil- Konzentrationen (0-10µmol/1) durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Form einer Konzentrations- Wirkungskurve dargestellt (Abb.15), wobei die Amplituden in Prozent des Kontrollwertes berechnet wurden. Der ito,f-Strom blieb im untersuchten Konzentrationsbereich unbeeinflußt, wohingegen der ito,skonzentrationsabhängig inhibiert wurde. Die Strom halbmaximale Inhibition des ito,s- Stroms wurde bei einer Bertosamil-Konzentration von 0.63µmol/l errechnet. Wie schon in den Originalregistrierungen (Abb.14) erkennbar, wurde der ito.s - Strom bei Bertosamil- Konzentrationen ≥3µmol/l völlig inhibiert. Die Schwellenkonzentration der Wirkung lag bei etwa 0.1µmol/l. Demnach steht mit Bertosamil eine Substanz zur Verfügung, die den ito,s- Strom selektiv inhibiert. Es

wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, daß die Wirkung von Bertosamil auf den im Rattenventrikel vorkommenden i_{k1}- Strom sowie auf den langsamen Calcium- Strom (L-Typ) erst in höheren Konzentrationsbereichen (\geq 10µmol/l) auftritt (Weis et al., 1993a).

Ferner wurde untersucht, ob "klassische" Inhibitoren des Calcium- Stroms und des Natrium- Stroms Einfluß auf die transienten Auswärtsströme haben. In der Literatur wurde Cd²⁺vielfach beschrieben, daß Ionen im Konzentrationsbereich von 200-300µmol/1 den langsamen Calcium- Strom (L-Typ) inhibieren (Apkon und Nerbonne, 1988; Kilborn und Fedida, 1990) bzw. daß Tetrodotoxin (TTX), das Gift aus den Gonaden des Kugelfischs, in geringen Konzentrationen (1-10µmol/l) den kardialen Natrium- Strom blockiert. In weiteren Versuchen wurde daher die Wirkung von Cd^{2+} - Ionen (CdCl₂, 200µmol/l) und TTX (10µmol/l) auf die Auswärtsströme untersucht. Hierzu wurden transienten komplette Inaktivierungskurven erstellt. Es zeigte sich, daß weder der ito,f- noch der hier besonders interessierende ito.s- Strom von Cd²⁺- Ionen oder TTX inhibiert wurden (Abb.16), so daß eine Beteiligung von bekannten, Cd^{2+} - oder TTX- sensitiven Calcium- oder Natrium- Strömen an der Entstehung der transienten Auswärtsströme ausgeschlossen werden konnte.

Als weiterer möglicher, interferierender Strom war aus elektrochemischen Gründen ein Chloridstrom möglich. In der Literatur gilt 4,4'-diisothiocyanatostilben-2,2'disulfonsäure (DIDS) als Blocker kardialer Chlorid- Ströme (Bouron et al., 1991; Duan et al., 1992), obwohl seine diesbezügliche Selektivität nicht geprüft wurde. Da der i_{to,f}- Strom längere Zeit unwidersprochen als Chlorid- Strom betrachtet wurde und zudem das Chlorid- Anion zumindest als anteiliger Ladungsträger einer der beiden transienten Auswärtsströme in Frage kam, wurde geprüft, ob DIDS die transienten Ströme beeinflußt. In bekannter Weise wurden

zunächst beide Ströme unter Kontrollbedingungen aufgenommen, wobei bei festem Testpotential die spannungsabhängige Inaktivierung gemessen wurde (Abb.17A). Danach wurden dieselben Klemmuster in Anwesenheit verschiedener DIDS-Konzentrationen wiederholt (100 und 200µmol/l). Es zeigte sich, daß der ito,s- Strom konzentrationsabhängig inhibiert wurde, und zwar bei 100µmol/l DIDS um etwa 50% (Abb.17A Mitte) und bei 200µmol/l DIDS auf 30 % des Kontrollwertes (Abb.17B unten), während der ito,f- Strom kaum beeinflußt wurde. Dies wurde durch die Inaktivierungskurven des ito,f-Stroms (Abb.17B) bestätigt. Im Gegensatz zur Amplitude wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung beider Ströme nicht beeinflußt. Die Werte der halbmaximalen Inaktivierung des ito,f waren -65.2mV, -65.2mV und -64.2mV für die Kontrolle und 100 bzw. 200µmol/l DIDS, die entsprechenden Daten für den ito,s - Strom waren -90.1mV, -90.0mV und -90.4mV. Auf die Bewertung dieser Befunde wird in der Diskussion näher eingegangen.

5. Temperaturabhängigkeit der transienten Auswärtsströme

Es gibt in der Literatur zur kardialen Elektrophysiologie nur wenige Hinweise auf die Temperaturabhängigkeit von Ionenströmen (Isenberg und Trautwein, 1975; Kirsch und Sykes, 1987; Kiyosue und Arita, 1989; Kiyosue et al., 1993). Dies liegt unter anderem daran, daß die Konstruktion und die Realisierung temperaturkonstanter Versuchsbäder sowie die korrekte Temperaturmessung in Flüssigkeitsvolumina von wenigen hundert Mikrolitern Schwierigkeiten bereiten. Zur 10°C Einstellung einer festen Temperatur (z.B. zur Untersuchung des schnellen Natrium- Stroms) werden in der Regel die Versuchsbäder mit Wasser temperiert, das durch überdimensionierte Thermostaten (> 101 Flüssigkeitsvolumen) mit geringer Genauigkeit ($\geq 0.5^{\circ}$ C) und enormer thermischer

eine von der Raumtemperatur abweichende Trägheit auf Temperatur eingestellt wird. Aufgrund der interindividuellen Variabilität der von Einzelzellen abgeleiteten Meßdaten ist es sinnvoll, die elektrophysiologischen Parameter innerhalb eines individuellen Experiments zu untersuchen. Da die Einzelexperimente in der Regel auf max. ca 1 Stunde stabiler sind, Registrierung begrenzt ist eine sehr schnelle Temperaturänderung auf den neuen Sollwert vonnöten. Wie erwähnt, wurden die Experimente bereits zunächst bei Zimmertemperatur durchgeführt. Um aber Messungen bei physiologischen Temperaturen (37-40°C) vornehmen zu können, wurde ein Versuchsbad nebst Regelverstärker konstruiert und (s. Abschnitt C.7), daß Experimente selbst gebaut bei definierter Temperatur im Bereich zwischen 10 und 60°C ermöglichte. Die Genauigkeit der eingestellten Temperatur ≤0.1°C genannten Bereich bei betrug im einer Temperaturkonstanz von ≤0.05°C. Die thermische Leistung der Anlage konnte variabel geschaltet werden und es waren bei voller Leistung Temperaturänderungen von 1°C/s möglich. Dies ermöglichte die Messung der Temperaturabhängigkeit wichtiger Parameter wie Kinetik und Amplitude der transienten Stromkomponenten.

qlobalen Eindruck Einen ersten der starken Temperaturabhängigkeit von Ionenströmen verdeutlicht Abb.18. Hier wurden Aktionspotentiale im Rattenventrikel bei einer Frequenz von 0.5Hz getriggert. Die Versuchstemperatur wurde zunächst auf 15°C eingestellt, also ca. 5-10°C unter der herrschenden Zimmernormalerweise und damit Versuchstemperatur und es wurden im "steady- state" einige Aktionspotentiale registriert. Darauf wurde eine neue Versuchstemperatur von 40°C eingestellt, die nach etwa einer Minute erreicht wurde. Während der Temperatursteigerung kontinuierlich weiterhin wurden Aktionspotentiale registriert. Es ist deutlich zu erkennen, daß parallel zu der Temperaturerhöhung die Aktionspotentialdauer drastisch abnahm

und auch das Ruhepotential zu negativeren Werten hin einem Potential von -60mV wanderte. Bei wurde eine Aktionspotentialdauer von 7ms bei 40°C gemessen gegenüber einer von 37ms bei 15°C. Das Ruhepotential veränderte sich von -73mV bei 15°C auf -85mV bei 40°C. Die extreme Verkürzung des Aktionspotentials mit steigender Temperatur, vor allem in den Phasen I und II der Repolarisation, deutet schon sehr darauf hin, daß repolarisierende Stromkomponenten massiv aktiviert wurden. Nach den orientierenden Experimenten mit Aktionspotentialen wurde gezielt die Temperaturabhängigkeit der transienten Auswärtsströme untersucht. In folgenden Versuchen stellte sich heraus, daß die beiden transienten Auswärtsströme extrem temperaturabhängig waren. Abhängig von der Temperatur änderten sich sowohl die Amplitude als auch die Kinetik der Ströme. In Abb.19 ist die Änderung der transienten Ströme Temperaturbereich von 20-40°C im dokumentiert, wobei jeweils in Sprüngen von 5°C gemessen wurde. Bei allen Temperaturen wurde das gleiche Klemmuster appliziert: einmal wurden beide Ströme maximal aktiviert (Konditionierungspotential -137mV, Testpotential 49mV), zusätzlich wurde die Referenzstromspur (Konditionierungspotential -28mV) aufgenommen, wo beide Ströme inaktiv waren. Es ist mit bloßem Auge festzustellen, daß mit steigender Temperatur die Amplitude des ito,f, gemessen als zeitabhängiger Strom, abnahm, wohingegen die des ito,s stark anstieg. Bei 20°C (Abb.19A) dominierte der ito,f-Strom noch deutlich gegenüber dem i_{to,s}. Bei 35°C (Abb.19D) hingegen war der ito,f - Strom nurmehr eine kleine Nadel und bei 40°C (Abb.19E) war er nicht mehr erkennbar, während der ito,s seine Amplitude fast verdreifachte. Deutlich ist auch zu erkennen, daß die Tail- Ströme parallel zum itors mit der Temperatur anwuchsen. Das heißt, es bestand ein inverser Zusammenhang zwischen den Amplituden von ito,f und ito,s und der Versuchstemperatur.

Neben den Effekten auf die Amplituden wurde auch die Kinetik der transienten Ströme stark beeinflußt. Die Bilder (Abb.19) verdeutlichen, daß die Inaktivierung beider Ströme mit zunehmender Temperatur beschleunigt wurde, die Beschleunigung der Aktivierung ist aufgrund der Zeitbasis nur schwer zu erkennen. Die Inaktivierungszeitkonstante des $i_{to,f}$ verkürzte sich von 42ms bei 20°C auf 9.6ms bei 30°C, die des $i_{to,s}$ entsprechend von 1430ms auf 620ms.

Zur Darstellung der temperatursensitiven Ströme wurden die Stromspuren mit dem Konditionierungspotential von -137mV bei 25 bis 40°C von der Stromspur bei 20°C, die als niedrigste Temperatur als Referenz diente, subtrahiert. Abbildung 20 zeigt die bei den jeweiligen Temperaturerhöhungen gegenüber der Referenz induzierten Ströme. Mit steigender Temperatur wird zunehmend langsam inaktivierender ito,s -Strom induziert, gleichzeitig steigen die Tail- Ströme parallel an (Abb.20A-D). Die scheinbar relativ langsame dazu Inaktivierung der Differenzströme wird durch die mit der ito,s- Aktivierung einhergehende Reduktion des ito,f - Stroms hervorgerufen. Es ist ebenfalls gut zu erkennen, daß die mit zunehmender Temperatur induzierten ito,s - Ströme parallel dazu schneller inaktivieren.

Wie bereits oben gezeigt, konnte der $i_{to,f}$ - Strom mit dem spezifischen Blocker 4-AP selektiv ausgeschaltet werden. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob das phänomenologische Verschwinden des $i_{to,f}$ - Stroms bei höherer Temperatur sich auch unter dem Einfluß von 4-AP bewahrheitet.

Zunächst wurde ein Kontrollstrom bei Zimmertemperatur registriert zur Bestätigung, daß tatsächlich beide transienten Auswärtsströme und auch der Tail- Strom des $i_{to,s}$ aktivierbar waren. (Abb.21A). Danach wurde die Temperatur im gleichen Experiment auf 37°C erhöht. Die Temperaturerhöhung ging wieder einher mit dem virtuellen Verschwinden des $i_{to,f}$ -Stroms und einer starken Aktivierung des $i_{to,s}$. Der temperatursensitive Strom ist in Abb.21B dargestellt, es ist

wieder der typische $i_{to,s}$ - Kurvenverlauf nebst Tail- Strom erkennbar. Es ist ebenfalls die bei 37°C erheblich beschleunigte Inaktivierung zu sehen. Um das virtuelle Verschwinden des $i_{to,f}$ - Stroms zu überprüfen, wurde der selektive $i_{to,f}$ - Inhibitor 4-AP in einer Konzentration von 1mmol/l zugegeben. Unter dem Einfluß des Blockers trat keine Veränderung gegenüber der Kontrolle bei 37°C auf (Abb.21A). Die Analyse des 4-AP-sensitiven Stroms (Differenzstrom: 4-AP minus Kontrolle) ergab eine schlichte Nullinie, die bestätigt, daß bei 37°C der $i_{to,f}$ - Strom vollständig inaktiv war.

Die starke Aktivierung des i_{to.s}- Stroms bei Temperaturerhöhung wurde nun als "Gegenprobe" ebenfalls überprüft: es wurde bereits oben gezeigt, daß mit dem Tedisamil- Derivat Bertosamil in Konzentrationen bis ca. 3µmol/l ein hinreichend selektiver Blocker des ito.s- Stroms zur Verfügung stand. Es war daher zu zeigen, ob der bei erhöhter Temperatur beobachtete langsam inaktivierende transiente Auswärtsstrom tatsächlich Bertosamil- sensitiv war, und damit als ito,s - Strom identifiziert werden konnte. Ein entsprechender Versuch ist in Abb.22 dargestellt. Zunächst wurde bei 37°C wieder eine Kontrollkurve (Konditionierungspotential -124mV) registriert, die nur einen langsam inaktivierenden transienten Auswärtsstrom und die typischen, hier sehr stark ausgeprägten ito,s - Tail- Ströme zeigt. Danach wurde Bertosamil in einer Konzentration von 3µmol/l appliziert. Unter dem Einfluß des Blockers wurde der gesamte transiente Auswärtsstrom vollständig inhibiert, auch die Tail- Ströme waren völlig verschwunden. Es war nur noch instantaner Strom ableitbar. Das heißt, bei einer physiologischen Temperatur von 37° war der ito,f - Strom, der bislang als maßgeblich für die Repolarisation des Rattenventrikel angesehen wurde, tatsächlich vollständig inaktiv und damit bedeutungslos für den Repolarisationsvorgang des Aktionspotentials. Dahingegen war

der schon bei Zimmertemperatur deutlich ausgeprägte itors -Strom bei Körpertemperatur zusätzlich aktiviert und ist unter diesen Bedingungen als das dominierende repolarisierende Stromsystem anzusehen. Es standen somit zwei experimentelle Eckpfeiler im Raum, nämlich die übliche Experimentdurchführung bei Zimmertemperatur, wo beide ito-Ströme aktiv waren und die physiologische Temperatur, bei der nur der i_{to,s} - Strom präsent war. Der Temperaturbereich außerhalb dieser beiden Temperaturen war jedoch unbegangenes Terrain, deshalb wurden die Amplituden der transienten Ströme im Temperaturbereich von 10-40°C in Intervallen von 5°C untersucht. Dabei wurden stets alle Temperaturen innerhalb eines individuellen Experiments abgefragt. Wenn dies nicht möglich war, wurde das Experiment verworfen. Zunächst wurden die Experimente wie üblich bei Zimmertemperatur begonnen. Wenn sich die Zellen als aussichtsreich stabil anboten, wurden bei 10°C wie oben beschrieben, beide transienten Auswärtsströme aktiviert und registriert. Danach wurde die Temperatur schrittweise, d.h. in 5°C - Intervallen, erhöht und jeweils nach Einstellung des neuen Gleichgewichtszustandes die Ströme erneut registriert. Nach Stabilisierung einer neuen Temperatur stellte sich in der Regel innerhalb von 1-2min ein neues Gleichgewicht der Membranströme ein, wobei sicherheitshalber etwa 5min gewartet wurde. Die Amplituden der transienten Auswärtsströme wurden anhand des Schemas in Abb.7B ermittelt und als normierte (Abszisse) in Abhängigkeit von der Werte Temperatur (Ordinate) dargestellt (Abb.23). Als 100%- Wert wurde die jeweilige Stromamplitude bei einer Temperatur von 25°C herangezogen. Diese Temperatur lag zum einen etwa in der Mitte des untersuchten Temperaturbereichs und entsprach ungefähr der Zimmertemperatur, bei der viele Experimente durchgeführt wurden. Der ausschlaggebende und zwingende Grund war aber, daß an den Grenzen des Temperaturbereichs (10° und 40°C) einer der beiden Ströme inaktiv war, so daß die

Grenzwerte überhaupt nicht als 100%- Werte zur Verfügung standen, bzw. für beide Ströme dann unterschiedliche Temperaturen als Referenz hätten benutzt werden müssen.

Temperaturabhängigkeiten der Amplituden beider Die transienter Auswärtsströme zeigten sigmoide Verläufe, die durch Boltzmann- Verteilungen angepaßt werden konnten. Der bei Temperaturen ≤20°C ito,fhatte ein Strom Amplitudenmaximum und war bei Werten ≥35°C nicht mehr nachweisbar. Die Anpassung der Kurve mittels eines Levenberg-Marquardt- Algorithmus ergab eine halbmaximale Temperatur von 25.1°C für den ito,f - Strom, und einen Steigungsfaktor von 3.3°C. Der Verlauf der i_{to,s}- Kurve zeigte ein nahezu inverses Verhalten: bei Temperaturen ≤10°C war der i_{to.s}-Strom inaktiv, während er zu hohen Temperaturen hin anwuchs. Das Amplitudenmaximum war bei ≥35°C erreicht. Die Anpassung ergab eine halbmaximale Amplitude von 30.1°C und einen Steigungsfaktor von -3.9°C. Das heißt, daß bei Zimmertemperatur (ca.25°C) beide transienten Auswärtsströme mit größenordnungsmäßig der jeweils halbmaximalen Amplitude abgeleitet werden konnten. Diese Daten machen nochmals deutlich, daß bei einer Temperatur von etwa 38°C (Körpertemperatur der Ratte) der ito,f- Strom praktisch keine Bedeutung für die Repolarisation des ventrikulären Rattenaktionspotentials haben kann, hingegen der ito.s- Strom sein Amplitudenmaximum hat und somit das maßgebliche repolarisierende Stromsystem darstellte.

Es wurde bereits angedeutet, daß neben der Amplitude auch die Kinetik der transienten Ströme von der Temperatur abhängig war. Dies ist auch durchaus plausibel, da die Aktivität von Ionenkanälen mit der Aktivität von Enzymen verglichen werden kann, deren Stoffumsatz bekanntlich in dramatischer Weise temperaturabhängig ist.

Einen ersten Eindruck der Temperaturabhängigkeit der Kinetik vermittelt Abb.24, sie zeigt die Aktivierung und Inaktivierung des $i_{to,f}$ - Stroms beispielhaft bei zwei

ausgewählten Temperaturen von 15 und 30°C. Aufgrund des depolarisierten Konditionierungspotentials von -47mV war der $i_{to,s}$ - Strom inaktiv. Bei 15°C (Abb.25A) betrug die Zeitkonstante der Aktivierung τ = 7.9ms (7.3 ± 0.8ms, n=6) und die der Inaktivierung τ =111ms (113 ± 21ms, n=6). Bei 30°C (Abb.25B) war die Aktivierungszeitkonstante auf 2.3ms (2.4 ± 0.2ms, n=6) reduziert und die Inaktivierungszeitkonstante betrug nur noch 8ms (10 ± 2ms, n=6). Daraus ließ sich für die Inaktivierung des $i_{to,f}$ - Stroms für das Temperaturintervall 15 nach 30°C ein Q₁₀- Wert von 5.8 errechnen, was eine 5.8 fach schnellere Inaktivierung bei einer Temperatursteigerung von 10°C bedeutet. Der Q₁₀- Wert für die Aktivierungskinetik des $i_{to,f}$ - Stroms betrug 2.3.

Die Q₁₀- Werte wurden nach der Formel Q₁₀= exp [{10/(T2-T1)}ln(τ_1/τ_2)] berechnet, wobei T1 und T2 die niedrigere bzw. höhere Temperatur und τ_1 und τ_2 die entsprechenden Zeitkonstanten darstellen.

Zur genauen Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit der Kinetik der transienten Ströme wurden bei Temperaturen zwischen 10 und 40°C in Abständen von 5°C die jeweiligen Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung bestimmt. ito,f- Strom durch depolarisierte wurde der Dabei Konditionierungspotentiale (ca. 45-50mV) selektiv aktiviert. Die ito, s - Kinetik wurde nach Ausschaltung des ito, f- Stroms mittels 4-AP (1mmol/1) ermittelt. Um jede Interferenz mit dem Strom auszuschließen, wurden die Experimenten Cain 200µmol/l CdCl₂ durchgeführt. Anwesenheit von Die SO erhaltenen Zeitkonstanten aus 4-6 Experimenten je Temperatur wurden gemittelt und mit den zugehörigen Standartabweichungen gegen die Versuchstemperatur aufgetragen (Abb.25). Die Kurvenverläufe wurden durch monoexponentielle Funktionen angepaßt. Da der ito, f bei 40° und der ito, s bei 10°C inaktiv war, wurden einheitlich aus den Zeitkonstanten bei 20 und 30° C die Q₁₀- Werte für die Kinetik bestimmt. Der Q₁₀- Wert für die ito,f - Aktivierung betrug 2.2, der der ito,f -

Inaktivierung 5.5, die entsprechenden Werte für den $i_{to,s}$ - Strom waren 3.4 und 2.2.

Eine zusammenfassende Darstellung der temperaturabhängigen Veränderungen der transienten Auswärtsströme gibt Abb.26. Es wurden Klemmuster bei drei verschiedenen Temperaturen (10, 23 und 37°C) angewendet, die beide transienten Ströme maximal aktivierten. Bei 10°C war nur ein langsam inaktivierender transienter Strom (Inaktivierungszeitkonstante τ = 318ms) zu registrieren. Nach Zugabe des ito, f - Blockers 4-AP (1mmol/l) verschwand der gesamte transiente Auswärtsstrom, der persisterende Auswärtsstrom war rein instantaner Natur. Bei Zimmertemperatur (25°C) waren problemlos beide transienten Stromkomponenten unterscheidbar. Nach Zugabe von 4-AP verschwand nur die schnell inaktivierende Komponente, der langsam inaktivierende Strom und die Tail- Ströme wurden nicht beeinflußt. Nach Einstellung der Temperatur auf 37°C war unter Kontrollbedingungen nur ein langsam inaktivierender Strom erkennbar, zum Verwechseln ähnlich derjenigen Stromspur, die unter Kontrollbedingungen bei 10°C registriert wurde, auch die Zeitkonstante der Inaktivierung lag mit τ = 460ms in derselben Größenordnung. Dennoch war hier das 4-AP ohne jede Wirkung, da hier der transiente Strom den 4-APresistenten ito,s - Strom repräsentierte. Das heißt, unter Kontrollbedingungen wurden bei 10°C und 37°C quasi identische transiente Ströme abgeleitet, die aber bei 10°C ausschließlich ito,f- Strom und bei 37°C ausschließlich ito.s- Strom darstellten.

6. Ionale Natur der transienten Auswärtsströme

Die ionale Natur eines Ionenstroms ist für die physiologische Bedeutung und auch im Hinblick auf eine pharmakologische Beeinflussung von großer Bedeutung. Die Art des oder der

Ladungsträger sind unter anderem dafür verantwortlich, in welcher Weise bzw. in welcher Phase das Aktionspotential beeinflußt wird. Da unter physiologischen Bedingungen die Ionenkonzentrationen beiderseits der Membran vorgegeben und mit hinreichender Genauigkeit bekannt sind, läßt sich, sofern es gemessen werden kann, aus dem jeweiligen elektrochemischen Gleichgewichtspotential die ionale Natur eines Ionenstroms bestimmen. Dies gilt jedoch nur dann in eindeutiger Weise, wenn der jeweilige Ionenstrom nur durch einen einzigen Ladungsträgertyp getragen wird. Da diese Bedingung nur für wenige Ionenströme hinreichend gut erfüllt ist, sind intermediäre Umkehrpotentiale, d.h. zwischen verschiedenen nach Nernst für ein bestimmtes Ion errechnete, unter Umständen nicht direkt zu interpretieren und bedürfen weiterer Experimente.

Gleichgewichtspotentialen Die Messung von ist vom theoretischen Ansatz her relativ simpel. Der interessierende Strom wird selektiv aktiviert und während die Kanäle (noch) offen sind, wird der Strom bei verschiedenen Potentialen, die negativ und positiv (hypothetischen) vom Gleichgewichtspotential liegen, registriert. Die so erhaltenen Tail-Ströme können gegen das Testpotential aufgetragen werden, wobei der Durchgang durch die Nullstromlinie dem Gleichgewichtspotential entspricht. Die Tail- Ströme des ito,s wurden in der vorliegenden Arbeit bereits zur Bestimmung der potentialabhängigen Aktivierung des itors - Stroms genutzt. Trotz des theoretisch einfachen Prinzips entstehen real aber meist erhebliche Probleme. Zum einen ist die Messung der Ströme bei den verschiedenen Potentialen von der entsprechenden Deaktivierungskinetik abhängig. Das heißt, die Tail- Ströme können nur dann hinreichend qenau gemessen werden, die wenn Deaktivierungskinetik dies meßtechnisch erlaubt. Das ist größenordnungsmäßig im "whole- cell"- Modus der Fall, wenn die Deaktivierungszeitkonstante ≥5ms beträgt. Die zweite

Schwierigkeit liegt in der Trennung der interessierenden Tail- Ströme von interferierenden Strömen. Rein theoretisch müßten alle bei den jeweiligen Potentialen aktiven und damit störenden Stromkomponenten elektrophysiologisch oder pharmakologisch eliminiert werden, was meist nicht oder nur unvollständig gelingt.

6.1 Gleichgewichtspotential des Ito,f- Stroms

Wie bereits oben erwähnt, war die ionale Natur des ito,f-Stroms lange Zeit unklar bzw. auf indirekten Hinweisen begründet. Direkte Messungen des Gleichgewichtspotentials mittels Tail- Strom- Analysen standen aufgrund der bei Zimmertemperatur extrem schnellen Deaktivierung bisher nicht zur Verfügung. Die einzige Publikation über die Messung von angeblichen ito,f- Tail- Strömen (Apkon und Nerbonne, 1991) ist sowohl vom experimentellen Ansatz wie auch von der Interpretation der Ergebnisse her falsch (s. Diskussion). In dieser Arbeit wurde der klassische Ansatz zur Messung des ito,f- Gleichgewichtspotentials über die Tail- Ströme aufgegriffen. Normalerweise, das heißt bei Zimmertemperatur, wäre dies unmöglich gewesen: wurde das Membranpotential bei Zimmertemperatur in den Potentialbereich geklemmt, wo das virtuelle ito,f- Aktivierungstor spannungsabhängig schloß, so deaktivierte der Strom "unmessbar" schnell. Dies zeigte sich im Experiment derart, daß unter diesen Bedingungen kein 4-APsensitiver Tail- Strom meßbar war. Daher wurde die extreme Temperaturabhängigkeit der Kinetik genutzt und die Experimente wurden zur "Verlangsamung" der Deaktivierung des ito, f bei 10°C durchgeführt. Bei Absenkung der Temperatur auf 10°C wurden die Inaktivierung bzw. Deaktivierung des ito.f-Stroms derart verlangsamt, daß Tail- Ströme problemlos aufgelöst und gemessen werden konnten. Die 4-AP- Sensitivität

der bei 10°C gemessenen Tail- Ströme bewies, daß es sich tasächlich um Deaktivierungsströme des $i_{to,f}$ handelte.

Die Experimente wurden bei zwei verschiedenen externen K^+ -Konzentrationen (4.7 und 47mmol/l) durchgeführt. Bei einer cytosolischen K^+ - Konzentration von 140mmol/l und 10°C Versuchstemperatur errechnete sich somit ein K-Gleichgewichtspotential von -82.7mV für 4.7mmol/l externer K^+ - Konzentration und -26.6mV bei 47mmol/l externer K^+ -Konzentration.

Obwohl der ito,s - Strom bei 10°C inaktiv war, wurde zusätzlich ein Konditionierungspotential von etwa -60mV gewählt, bei dem der i_{to,s} spannungsabhängig inaktiviert war. Des weiteren wurden die Experimente generell in Gegenwart von 200µmol/l CdCl₂ durchgeführt um den L-Typ - Ca - Kanal (i_{si}) auszuschalten. In einigen Experimenten wurde zusätzlich Tetrodotoxin eingesetzt, 10µmol/l um evtl. langsam inaktivierende Na- Ströme zu eliminieren. Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt: zunächst wurde der ito,f bei externem K⁺ ausgehend 4.7mmol/l von ca. -60mV Konditionierungspotential durch ein 100ms dauerndes Testpotential aktiviert. Nach dem Testpuls wurden Tail-Ströme bei verschiedenen Testpotentialen zwischen ca. 20 und -100mV registriert (s.Abb.29A). In einer zweiten Serie wurde (bei derselben Zelle) das gleiche Klemmuster appliziert, wobei aber zur Inaktivierung des ito,f - Stroms das Konditionierungspotential auf etwa -20mV angehoben wurde (s.Abb.29B). Durch Subtraktion der Stromspuren (nach Beendigung des gesamten Experimentes) bei inaktiviertem ito,f (Konditionierungspotential ca. -20mV) von der ersten Serie aktivem ito, f (Konditionierungspotential ca. -60mV) mit konnten als Differenzströme die reinen ito,f - bzw. Tail-Ströme gewonnen werden. Andere, evtl. mitaktivierte Stromkomponenten wurden durch die Subtraktion eliminiert. Die durch die Subtraktion gewonnenen Tail- Strom- Amplituden

(gemessen als "peak" gegen den Nullstrom) wurden gegen das Testpotential der Tail- Ströme aufgetragen (s.Abb.29C). Das gleiche experimentelle Setup wurde darauf, wieder bei derselben Zelle, bei einer externen K- Konzentration von 47mmol/l durchgeführt. Jedoch wurden die Testpotentiale für die Registrierung der Tail- Ströme aufgrund des geänderten K-Gradienten auf Werte zwischen ca. 50 und -40mV verändert. Der Kurvenverlauf ergab ein auswärtsgleichrichtendes Verhalten der ito,f - Tail- Ströme bei beiden K⁺- Konzentrationen, wobei im Auswärtsbereich ein linearer Verlauf zu beobachten war, der durch Regressionsgeraden angepaßt wurde. Die Schnittpunkte der Geraden mit der Nullstromlinie ergaben für das in Abb.29 gezeigte Experiment ein Gleichgewichtspotential von -72mV für 4.7mmol/l externes K⁺ und von -12mV für 47mV externes K. Durch die zehnfache Erhöhung des extrazellulären Kaliums wurde eine Verschiebung des Gleichgewichtspotentials um 60mV induziert.

sich bei 4.7mmol/l Mittel erqab Im ein Gleichgewichtspotential von -73mV (73 ± 3mV, n=3) und entsprechend bei 47 mmol/l externem K⁺ ein Wert von -13 mV (13 2mV, n=3). Die Mittelwerte der "shifts" ± des Gleichgewichtspotentials bei Erhöhung des äußeren Kaliums waren 59 \pm 3mV (n=3). Nach Nernst hätte sich für einen reinen K^+ ein "shift" von etwa Strom 56mV und Gleichgewichtspotentiale von -82 bzw. -26mV bei 4.7 und 47 mmol/l externem K für einen nur durch K^+ - Ionen getragenen Strom ergeben müssen.

6.2 Gleichgewichtspotential des ito,s - Stroms

Die Emittlung des $i_{to,s}$ - Gleichgewichtspotentials erfolgte analog zu der oben für den $i_{to,f}$ beschriebenen. Aufgrund der schon bei Zimmertemperatur langsamen Deaktivierung war es

möglich, die Experimente bei ca. 25°C durchzuführen. Zur Eliminierung des ito,f und des Ca- Stroms wurden 4-AP (1mmol/l) und CdCl₂ (200 μ mol/l) der Badlösung zugegeben. Wieder wurde der i_{to,s} durch einen 100ms dauernden depolarisierenden Testpuls aktiviert und nachfolgend die ito,s - Tail- Ströme bei verschiedenen Testpotentialen zwischen ca. -120 und ca. -20mV ausgelöst. Es konnten nur ito,s - Ströme bzw. Tail- Ströme bei einer externen K-Konzentration von 4.7mmol/l registriert werden. Nach Erhöhung der extrazellulären K-Konzentration auf 47mmol/l und auch noch bei 20mmol/l war der i_{to,s} aufgrund zu kleiner Amplituden nicht mehr sicher auswertbar. Nach der Messung der ersten Serie von Stromspuren mit voll aktiviertem ito,s (s.Abb.30A) wurde nun eine zweite Serie unter identischem Spannungsprotokoll aufgenommen mit dem Unterschied, das durch ein depolarisiertes Konditonierungspotential von etwa -40mV der ito,s inaktiviert wurde (s.Abb.30B). Die Subtraktion der zweiten von der zuerst aufgenommenen Serie ergab dann reine ito,s - Ströme bzw. Tail- Ströme, die gegen das Testpotential der Tail-Ströme aufgetragen wurden. Die Strom-Spannungskurve des Beispiels (Abb.30D) zeigte wieder ein auswärtsgleichrichtendes Verhalten, die Punkte in Auswärtsrichtung wurden durch eine Regressionsgerade ausgeglichen. Der Schnittpunkt mit der Nullstromlinie und damit das Gleichgewichtspotential wurde zu -75.3mV errechnet. Im Mittel aus 4 Experimenten wurde ein Wert von 77 \pm 3mV bestimmt. Nach Nernst wäre ein Potential von -87mV für einen reinen K^+ - Strom zu erwarten gewesen.

7. Effekte der transienten Auswärtsströme auf das Aktionspotential

Derzeit geht man davon aus, daß die Repolarisation des ventrikulären Aktionspotentials durch die Aktivität von K⁺-Strömen bewerkstelligt wird. Die Ergebnisse aus den Kap.6.1 und 6.2 zeigten, daß ito, f und ito, s präferentiell durch K-Ionen getragene Ströme sind. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind die beiden transienten Auswärtsströme die dominierenden Auswärts- und damit repolarisierenden Ströme im Rattenventrikel. Infolgedessen wurde untersucht, ob bzw. in welcher Weise eine Inhibition der transienten Ströme die Repolarisation ventrikulären des Aktionspotentials beeinflußt. Es wurde bereits gezeigt, daß mit 4-Aminopyridin und Bertosamil Inhibitoren für beide Ströme zur Verfügung standen, so daß deren spezifischer Einfluß auf die Repolarisation untersucht werden konnte.

Aktionspotentiale wurden im "current- clamp"- Modus durch kurze depolarisierende Stompulse (0.5-3ms Dauer, 0.5-1.5nA) ausgelöst, die Stimulationsfrequenz betrug in der Regel 0.5Hz. Nachdem ein niederohmiger Zugang zur Zelle geschaffen worden war, wurden zunächst für 5-10min Aktionspotentiale registriert, um die Stabilität der Zelle bzw. der Ableitung zu überprüfen. Erwiesen sich die Aktionspotentiale als stabil, so wurden die Experimente begonnen. Die elektrische Stimulation wurde kontinuierlich während der gesamten Experimentdauer fortgesetzt.

Zunächst wurden Experimente bei Zimmertemperatur durchgeführt, da beide transienten hier Ströme etwa halbmaximal aktiv waren und so in einem Experiment die jeweilige quantitative Beteiligung der beiden Ströme am Repolarisationsvorgang untersucht werden konnte. Nach Aufnahme eines Kontrollaktionspotentials wurde zuerst der ito,f - Strom durch 4-AP (1mmol/1) ausgeschaltet. Dies resultierte in einer deutlichen Verzögerung der frühen

Repolarisationsphase bzw. der Phase 2. Die späte Repolarisation wurde durch 4-AP nicht beeinflußt (Abb.30). Dies war an der unveränderten Steigung bzw. Steilheit der späten Repolarisationsphase erkennbar. Aufgrund der Verzögerung der frühen Repolarisation war die finale Repolarisationsphase nur zeitlich verzögert, also parallel nach hinten verschoben. Bei einer Repolarisation auf -50mV war die Dauer des Aktionspotentials unter 4-AP auf 50ms oder 263% erhöht im Vergleich zu 17ms in der Kontrolle (100%). Nach Inhibition des ito,f- Stroms wurde der Einfluß des ito,s- Stroms untersucht, indem in Gegenwart von 4-AP zusätzlich der itors- Blocker Bertosamil (3µmol/l) appliziert wurde. Es hatte sich bereits in den voltage- clamp-Experimenten gezeigt, daß die Wirkung von Bertosamil auf den ito,s- Strom wesentlich langsamer vonstatten ging als dies beim ito,f- Blocker der Fall war. Dementsprechend zeigte sich auch die Wirkung auf das AP in einem Zeitraum von 10-15min. Bertosamil bewirkte ebenfalls eine Verlangsamung der frühen Repolarisationsphase, darüber hinaus wurden jedoch auch die Phase 2 und in starkem Maße die finale Repolarisation verlangsamt. Bei einer Repolarisation auf -50mV wurde eine Aktionspotentialdauer von 147ms gemessen, dies entsprach einer Verlängerung auf 865% des Kontrollwertes. Im Mittel aus 5 Experimenten wurden unter den genannten Bedingungen Verlängerungen des Aktionspotentials unter 4-AP

auf 310 \pm 28% und in Anwesenheit von 4-AP plus Bertosamil auf 904 \pm 44% ermittelt.

8. Temperaturabhängigkeit der transienten Auswärtsströme und ihre Auswirkung auf das Aktionspotential

Es wurde bereits oben (Abschnitt D.5) gezeigt, daß die transienten Auswärtsströme in starkem Maße temperaturabhängig waren, wobei der i_{to,s} bei Temperaturen ≥35°C maximal, der ito,f- Strom hingegen inaktiv war. Bei niedrigen Temperaturen ≤15°C war der i_{to,f} maximal und der i_{to,s} inaktiv. Diese, auf der Ebene der Membranströme gefundenen Ergebnisse waren nun im Aktionspotential nachzuprüfen. Dementsprechend sollten die spezifischen Inhibitoren der beiden transienten Auswärtsströme, 4-AP (ito,f) und Bertosamil (ito,s), das Aktionspotential, abhängig von der Versuchstemperatur, in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Zur Überprüfung dieser Annahmen wurde die Wirkung der beiden vorgenannten Inhibitoren auf das Aktionspotential bei drei charakteristischen Temperaturen untersucht: bei 10°C, 25°C und 37°C. Wie bereits beschrieben, war der ito, f bei 10°C maximal und der i_{to,s} inaktiv. Bei 25°C waren beide transienten Auswärtsströme etwa halbmaximal aktiv und bei 37° war der i_{to,s} maximal, der i_{to,f} hingegen inaktiv (s. Abb.23).

Temperatur von 10°C wurden zunächst Bei einer Kontrollaktionspotentiale registriert. Nach Applikation von 1mmol/l 4-AP zeigte sich eine starke Verlängerung des Aktionspotentials, insbesondere der frühen Repolarisationsphase (abb.31A). Die zusätzliche Applikation von 3µmol/l Bertosamil bewirkte keine weitere Veränderung des Aktionspotentials (Abb.31A). Danach wurden in einem neuen 25°C Experiment wieder Kontrollaktionspotentiale bei aufgenommen. Die Zugabe des ito, f - Blockers 4-AP (1mmol/1) bewirkte wieder eine deutliche Verbreiterung des Aktionspotentials (Abb.31B). Durch diesen Vorversuch wurde gezeigt, daß die untersuchte Zelle tatsächlich den ito,f -

Strom exprimierte. Danach wurde 4-AP ausgewaschen, worauf sich innnerhalb weniger Minuten der Effekt auf das Aktionspotential zurückbildete. Nach dem Auswaschen von 4-AP wurde im gleichen Experiment die Temperatur auf 37°C erhöht, wobei bereits unter Kontrollbedingungen ein erheblich kürzeres AP registriert wurde (s.Abb.31C). Nach Applikation von 1mmol/l 4-AP blieb das Aktionspotential unbeeinflußt. was im Einklang mit der auf der Ebene der Membranströme gemessenen Inaktivität des i_{to,f}- Stroms bei 37°C war. In Abb.23 wurde gezeigt, daß bei einer Temperatur von 35-40°C der ito,s- Strom maximal aktiv ist. Es war daher zu vermuten, daß die starke Verkürzung des Aktionspotentials auf die Aktivierung des ito,s- Stroms zurückzuführen ist. Daher wurde zusätzlich zu dem bereits im Superfusat befindlichen 4-AP noch 3µmol/l des ito,s - Blockers Bertosamil zugegeben. Diese Maßnahme resultierte in einer extremen Verzögerung der Repolarisation, die in einigen Experimenten so stark war, daß überhaupt kein eindeutiger Repolarisationsvorgang mehr erkennbar war, sondern das Membranpotential im Bereich von bis -30mV fluktuierte. Bei Erreichen eines etwa 0 Membranpotentials von etwa -40mV kam i.d.R. wieder eine schnelle Repolarisation auf das Ruhepotential zustande. In diesem Potentialbereich begann die Aktivität des i_{K1} - Stroms, durch den wahrscheinlich die Repolarisation initiiert wurde. Die gleichen Ergebnisse wurden auch erzielt, wenn direkt bei 37°C mit dem Experiment begonnen wurde und von vornherein 4-AP bzw. Bertosamil eingesetzt wurde.

Insgesamt bestätigen die Untersuchungen der Aktionspotentiale in eindeutiger Weise die Ergebnisse, die bei den Messungen der Membranströme (s. Abschnitt D.5) gewonnen wurden.

E. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen deutlich die Existenz von zwei unterschiedlichen transienten Auswärtsströmen im ventrikulären Myokard der Ratte. Diese Ströme wurden hier als schnell und langsam inaktivierende transiente Auswärtsströme bezeichnet (i_{to,f}, i_{to,s}). Sie unterscheiden sich in signifikanter Weise in Bezug auf ihr jeweiliges elektrophysiologisches und pharmakologisches Profil.

1. Schnell inaktivierender transienter Auswärtsstrom (ito,f)

Der schnell inaktivierende transiente Auswärtsstrom ist identisch mit dem in der Literatur seit längerem in vielen kardialen Geweben beschriebenen "i_{to}- Strom". Dieser Strom sollte ursprünglich als "innere Referenz" parallel registriert und untersucht werden, es konnten aber im Verlauf der Arbeit viele neue Daten, speziell zur Temperaturabhängigkeit und zum Gleichgewichtspotential gewonnen werden. Zur Unterscheidung von dem hier beschriebenen langsam inaktivierenden transienten Auswärtsstrom wurde der schnell inaktivierende transiente Auswärtsstrom mit dem Index "f" ("fast") versehen.

Die hier beschriebenen Daten bezüglich der potentialabhängigen Steuerung des ito,f- Stroms entsprechen im großen und ganzen denen in der Literatur für den Rattenventrikel publizierten Daten. Das virtuelle Inaktivierungstor war im Mittel halb- offen bei einem Potential von -58.4mV. Viele Publikationen (Castle, 1991; Dukes und Morad, 1989; Josephson et al., 1984; Su et al., 1993) bestätigen die halbmaximale Inaktivierung des ito,f-Stroms mit Werten zwischen -50 und -60mV. Es sei jedoch erwähnt, daß einige Arbeiten deutlich positivere Werte angeben (z.B. Lefevre et al., 1991, V_h: -24mV). Dies ist

dadurch zu erklären, daß teilweise in den Experimenten zur Unterdrückung des L- Typ Ca²⁺- Stroms Cd²⁺- Ionen in verhältnismäßig hohen Konzentrationen (ca. 200-300µmol/1) eingesetzt wurden. Agus et al. (1989) beschrieben, daß der ito,f- Strom nicht, wie bis dato vorausgesetzt, unabhängig von divalenten Kationen wie Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} oder Zn^{2+} ist, sondern daß die Potentialabhängigkeit des ito,f durch die Anwesenheit divalenter Kationen verändert wird. Es ist darüber hinaus bekannt, daß auch "physiologische" divalente Kationen wie Ca- und Na- Ionen die Potentialabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung beeinflussen (Dukes und Morad, 1991). Da die verwendeten Badlösungen z.T. in ihren Na- bzw. Ca- Konzentrationen deutlich voneinander abweichen, ist auch hier eine Quelle der Variabilität zu suchen. Bei der Interpretation aller potentialabhängigen Parameter muß daran erinnert werden, daß, wie in Kapitel C.9 beschrieben, alle angegebenen Potentiale nach Abzug des Diffusionspotentials von -4mV zwischen extra- und intrazellulärer Lösung um diesen Wert negativer sind. Auch nach entsprechender Korrektur liegen die potentialabhängigen Kenndaten des ito,f-Stroms im Bereich der Literaturwerte.

Der Steigungsfaktor der Inaktivierungskurven des ito,f-Stroms wurde hier im Mittel zu k=5.4mV bestimmt. Dies korrelierte mit einer Steuerung durch das virtuelle Inaktivierungstor von etwa -40 bis -80mV. Obwohl die Werte für die halbmaximale Inaktivierung, wie gesagt, in der Literatur erheblich streuen, liegen die Werte der Steigungen der Inaktivierungskurven relativ eng beieinander (Castle 1990, k: 4.5mV; Lefevre et al. 1991, k:5mV; Xu und Best 1991, k: 4.2mV). Dies war auch zu erwarten, da sowohl Cd- wie auch Ca- und Na- Ionen ausschließlich die Lage der Inaktivierungsbzw. Aktivierungskurven, nicht jedoch deren Steigung beeinflussen (Dukes und Morad, 1991). Genauso wurden durch Cd, Ca und Na die Maximalamplituden beeinflußt.

Die bisher verfügbaren Daten zur spannungsabhängigen Aktivierung des ito,f- Stroms waren bisher unklar und schwer interpretierbar. Nach der heutigen Vorstellung sollte auch die spannungsabhängige Öffnung des virtuellen Aktivierungstores einer Boltzmann- Funktion folgen. Das heißt, die Leitfähigkeit der Membran für den ito,f- Strom über dem Membranpotential sollte sigmoidal verlaufen, wobei die Leitfähigkeit einem Plateau zustrebt, das durch die maximale Öffnungswahrscheinlichkeit der entsprechenden Kanäle definiert wird. In der Literatur wurden zwar einige "Aktivierungskurven" für den i_{to,f}- Strom publiziert, die aber in keinem einzigen Fall einen sigmoiden Verlauf mit deutlichem Plateau zeigten. Vielmehr präsentierten sich mehr oder weniger ideale Geraden, d.h. die Leitfähigkeit zeigte keinerlei Sättigungsverhalten (Apkon und Nerbonne, 1991; Ertl et al., 1991; Fedida et al., 1990; Lefevre et al., 1991; Tohse et al., 1990) . Lefevre et al. (1991) verfolgten die potentialabhängige Aktivierung bei linearem Zusammenhang bis zu einem Testpotential von 70mV, Apkon und Nerbonne (1991) beschrieben einen linearen Zusammenhang sogar bis zu 100mV Testpotential, wobei die Aktivierung jeweils etwa bei -30 bis -40mV einsetzte. Die Messung linearer Strom- Spannungskurven hinderte trotzdem erstaunlicherweise viele Experimentatoren nicht daran, ihre Daten mit fitting- Programmen für Boltzmann- Verteilungen zu traktieren und die ausgeworfenen Daten zu publizieren (z.B. Lefevre et al. 1991). Eine für die "Linearität" mögliche Erklärung der Aktivierungskurven ist in der Definition und Auswertetechnik für den ito,f- Strom zu suchen. Nahezu alle Publikationen werten den ito,f als "peak- Auswärtsstrom" aus, wobei als Bezug, sofern überhaupt angegeben, meist der Nullstrom willkürlich und fälschlich herangezogen wird (Kilborn und Fedida 1990; Ravens et al. 1989, Zang et al. 1994). Bei dieser Prozedur wird der ito, f nicht als transiente Stromkomponente gemessen, sondern es werden alle

Stromkomponenten hinzuaddiert, die vom Beginn des Testpulses bis zum Peak- Auswärtsstrom aktivieren. Nach derzeitigem Wissensstand sind dies neben dem $i_{to,f}$ der $i_{to,s}$ - Strom, der i_K - Strom (eigene unveröffentlichte Messungen), ein initial aktivierender Chlorid- Strom (Duan et al., 1992) und natürlich unspezifische Leckströme. Darüber hinaus wird die Existenz eines nicht (oder sehr langsam) inaktivierenden Ca-Stroms diskutiert. Je nach Potential könnten noch "windowcurrents" des L- Typ- Calcium und des Na- Stroms diskutiert werden.

2. Langsam inaktivierender transienter Auswärtsstrom (ito,s)

Die deutlichen Unterschiede in der Potentialabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung zeigen klar, daß es sich bei dem ito,s - Strom um eine eigenständige Stromkomponente handelt. Es mag erstaunen, daß ein Strom von (bereits bei Zimmertemperatur) derartiger Amplitude bisher unentdeckt blieb. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, daß in vielen Experimenten zur Untersuchung des ito,f - Stroms sehr kurze Testpulse im Bereich von etwa 100ms appliziert wurden, um, wie oben diskutiert, nur den peak- Auswärtsstrom zu registrieren. Zum zweiten wurden häufig verhältnismäßig depolarisierte Konditionierungspotentiale eingesetzt, die zu einer deutlichen Aktivierung des ito, f ausreichten, aber den ito,s- Strom spannungsabhängig ausschalteten. Nichtsdestotrotz ist in vielen publizierten Abbildungen ein langsam inaktivierender Strom unter adäquaten Versuchsbedingungen erkennbar, der auf die Anwesenheit des itors - Stroms hinweist (Ertl et al., 1991, Abb.7; Jahnel et al., 1993, Abb.7) und der durch verschiedene Pharmaka beeinflußt wurde: durch das tertiäre Clofilium- Homolog LY97119 (Castle, 1991, Abb.8), durch Chlorpromazin (Kon et al., 1994, Abb.3), und

durch D600 (Lefevre et al., 1990, Abb.8). Eine Publikation beschrieb eine langsam inaktivierende Stromkomponente im Rattenventrikel (Apkon und Nerbonne, 1991). Die Autoren definierten diesen Strom jedoch als i_{K} - Strom oder "delayed rectifier", weil er ihrer Meinung nach die meisten Charakteristika mit dem i_{K} - Strom teilte. Sie berichteten über eine iK- typische langsame Aktivierung und eine Beeinflussung des Aktionspotentials durch den "iK" nur in der späten Repolarisationsphase, während Phase 1 und 2 angeblich nicht verändert wurden. Darüber hinaus beschrieben sie die potentialabhängige Aktivierung als linear bis zu 100mV ("lacking any sign of saturation"), wie dies für den ito,f -Strom mehrmals publiziert wurde (s.o.). Der hier beschriebene Strom hat, im Gegensatz dazu, keinerlei _ ito,s Charakteristika eines i_K - Stroms. Er aktiviert schnell (τ \leq 10ms bei Zimmertemperatur), wodurch das Aktionspotenial bereits in der frühen Repolarisationsphase beeinflußt wird. Aufgrund der langsamen Inaktivierung ist jedoch der itors -Strom auch während der späteren Repolarisationsphasen noch aktiv. Außerdem zeigt die ito,s - Aktivierungskurve einen Hodgkin- Huxley- konformen sigmoiden Verlauf mit klarer Sättigung im Bereich von Memranpotentialen positiv zu 30-40mV. Man könnte somit meinen, daß der ito,s - Strom und der von Apkon und Nerbonne beschriebene i_K- Strom nichts miteinander zu tun haben. Es scheint dennoch offensichtlich, daß Apkon und Nerbonne in ihren Experimenten den ito,s zumindest anteilig registrierten und auch anteilig mit auswerteten. Jedoch differenzierten sie, wie dies leider oft geschieht, den Strom nicht klar von anderen Stromkomponenten, insbesondere nicht vom ito,f. Sie begingen ebenfalls den Fehler, den ito,f als peak- Auswärtsstrom zu definieren, wodurch sie die Messung des ito, f mit dem ebenfalls schnell aktivierenden ito,s - Strom und allen anderen im "peak"-Strom enthaltenen Stromkomponenten kontaminierten. Dadurch erhielten sie bisigmoide Inaktivierungskurven, in denen sich

die Spannungsabhängigkeit sowohl des ito, f als auch des ito, s widerspiegeln, jedoch zusätzlich verfälscht durch die im "peak"- Strom zusätzlich enthaltenen anderen Stomkomponenten. Zur Demonstration wurde beispielhaft eine Serie von ito,f -Strömen als spannungsabhängige und als zeitabhängige Stromkomponente ausgewertet (Abb.32). Der zeitabhängige ito,f wie in Abb.7 beschrieben ausgewertet, wurde der spannungsabhängige ito, f wurde als peak- Auswärtsstrom minus Strom in der Referenzspur ermittelt, wobei die Referenzspur wie beim i_{to,s} – Strom die mit dem negativsten Konditionierungspotential war, in der gerade kein transienter Strom mehr aktivierbar war (Abb.32A). Die Inaktivierungskurve des zeitabhängigen ito,f zeigte, wie zu erwarten, wieder die sigmoide Form mit einer halbmaximalen Inaktivierung bei -55mV und einem klaren Plateau negativ zu etwa -70mV. Die Auswertung als spannungsabhängiger ito, f entspricht bis auf die subtrahierten Referenzströme der "peak- Auswertung" des ito,f von Apkon und Nerbonne. Die Inaktivierungskurve zeigt den bisigmoiden Verlauf, den Apkon und Nerbonne prinzipiell fanden. Die Subtraktion der Inaktivierungskurve auch "zeitabhängiger ito, f" von der Kurve "spannungsabhängiger ito,f" ergab eine sigmoide Kurve mit einer Charakteristik, die exakt die typische ito,s - Inaktivierungskurve mit einer halbmaximalen Inaktivierung bei -87mV und einem Steigungsfaktor von 10mV wiedergibt. Dieser Test beweist klar, daß die Auswertung des zeitabhängigen ito,f wie in Abb.7 beschrieben, die korrekte Technik darstellt und die Auswertung als "peak" massiv durch den schnell aktivierenden ito,s - Strom kontaminiert wird mit dem Ergebnis einer bisigmoiden Kennlinie. Die Intensität der Kontamination des "peak"- Stroms durch den ito,s hängt von den individuellen Unterschieden in den Aktivierungszeitkonstanten der beiden transienten Ströme ab. Je langsamer die Aktivierung des ito,s- Stroms im Vergleich zu der des ito,f ausfällt, umso geringer fällt die Beteiligung des ito,s am "peak"- Strom aus

und umgekehrt. Es wurde in Kapitel D.5 gezeigt, daß im Mittel die Aktivierungszeitkonstanten der beiden transienten Ströme in der gleichen Größenordnung liegen. Das heißt, das auch generell der "peak"- Strom, natürlich abhängig vom Konditionierungspotential und von der Temperatur, eine Summe beider transienter Ströme darstellt.

3. Unterschiedliche Expression der transienten Auswärtsströme

In Kapitel D.3 wurde gezeigt, daß mitunter einzelne Zellen ausschließlich einen der beiden Ströme exprimierten. Der Grund für dieses Phänomen kann auf verschiedene Weise erklärt werden. Eine Möglichkeit ist, daß durch die enzymatische Behandlung eine Population der transienten Ströme zerstört oder zumindest funktionsunfähig gemacht wurde. Eine andere Erklärung wäre die Existenz verschiedener Zellpopulationen im ventrikulären Myokard mit unterschiedlicher Expression der Ströme, wobei ein Extrem die völlige Abwesenheit eines der beiden Ströme wäre. In jüngster Zeit wurde gezeigt, daß es signifikante Unterschiede in der Expression des 4-APsensitiven ito,f - Stroms zwischen subendocardialen und subepicardialen Schichten im Ventrikel von Katze und Mensch (Furukawa et al., 1990; Wettwer et al., 1994) sowie generelle Differenzen im Repolarisationsverhalten verschiedener Ventrikelbereiche (Wang et al., 1991) gibt. Darüber hinaus ist in einer Untersuchung der ontogenetischen Entwicklung von Auswärtsströmen des Rattenventrikels zu sehen (Kilborn und Fedida, 1990, dortige Abb.7), daß bei neugeborenen Ratten (1. Tag post partum) nur ein schnell aktivierender und langsam inaktivierender Strom bei einer Depolarisation von -90 nach 20mV zu sehen war, der mit dem hier beschriebenen ito,s identisch sein könnte. Der 4-AP- sensitive ito,f - Strom war erst am zehnten Tag post partum präsent. Ganz allgemein

mehren sich die Erkenntnisse, daß es in verschiedenen Bereichen eines Herzgewebes Unterschiede in den elektrophysiologischen Charakteristika gibt (Antzelevitch et al., 1991; Fedida und Giles, 1991). Es erscheint durchaus sinnvoll, daß z.B. innerhalb des Ventrikels unterschiedliche Zelltypen existieren. Die Einteilung in die verschiedenen Gewebetypen erfolgte schließlich recht grob aufgrund anatomischer bzw. funktioneller Kriterien. Aufgrund der der Herzkontraktion ist die Dynamik Kontraktion beispielsweise des endokardnahen Ventrikelbereichs zwangsläufig anders als die der epikardnahen Regionen. Daher wären auch spezielle elektrophysiologische Eigenheiten je nach Lokalisation des Gewebes durchaus zu erwarten.

4. Pharmakologische Modulation der transienten Auswärtsströme

Die Ergebnisse der pharmakologischen Charakterisierung der transienten Ströme bestätigte die Sensitivität des ito,f -Stroms für 4-Aminopyridin. Der langsam inaktivierende ito,s -Strom war hingegen völlig insensitiv für 4-AP. Umgekehrt der ito,s - Strom durch das Tedisamil- Derivat wurde Bertosamil konzentrationsabhängig selektiv inhibiert. Das heißt, es standen für jeden der transienten Ströme selktive Blocker zur Verfügung. Es wurde hier darüber hinaus gezeigt, daß das als Blocker kardialer Chloridströme geltende Stilben DIDS ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition des ito,s bewirkte. Obwohl eine DIDS- Sensitivität oft in der Literatur beinahe als Synonym für einen Chloridstrom ist die diesbezügliche verwendet wird, Selektivität erstaunlicherweise bisher weder bewiesen noch überhaupt diskutiert worden. Die DIDS- Sensitivität kann also in keiner Weise als direkter Beweis oder auch nur als Hinweis für Chlorid als Ladungsträger herangezogen werden. In Kapitel D.6
wird die ionale Natur der transienten Ströme diskutiert. Die Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften sind zwar kein strenger Beweis, aber zumindest deuten sie stark darauf hin, daß die beiden transienten Ströme tatsächlich unterschiedliche Stromkomponenten sind und nicht etwa unterschiedliche "Zustände" ein und derselben Kanalpopulation darstellen. Die unterschiedliche Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung sowie die drastisch unterschiedliche Inaktivierungskinetik machen die Existenz unterschiedlicher Kanalpopulationen zumindest sehr wahrscheinlich. Eine eindeutige Beantwortung dieser Frage ist jedoch prinzipiell auf der Ebene der whole-cell-voltage-clamp zu leisten. Hierzu müßten Einzelkanalableitungen nicht durchgeführt werden, wobei auch hier die wohl Elektrophysiologie an ihre Grenzen stößt. Eventuell werden Techniken zur räumlichen Darstellung von Ionenkanälen, die zur Zeit entwickelt werden, mehr Einsicht bringen.

5. Kinetik der transienten Auswärtsströme

Das kinetische Verhalten von Ionenströmen ist von großer Bedeutung für die Art und Weise, in der der betreffende Strom das Aktionspotential beeinflußt. Wie bereits erwähnt, ist die Auflösung und damit die Zeitkonstante des voltage-clamp Systems im whole-cell-Modus ca. 1ms. Das heißt, daß die Messung von zeitabhängigen Strömen nur dann hinreichend genau ist, wenn die Zeitkonstante des zu messenden Stromes deutlich größer als eine ms ist. Dies war in fast allen Fällen gegeben. Die Aktivierung des $i_{to,f}$ bei Körpertemperatur lag jedoch im Bereich von 1.3ms, so daß hier bereits eine Interferenz zwischen Meßwert und Auflösungsgenauigkeit des Systems vorlag. Es ist daher wahrscheinlich, daß die "wahre" Aktivierung des $i_{to,f}$ - Stroms noch deutlich schneller vonstatten geht. Die schnelle Aktivierung des $i_{to,s}$ - Stroms

wurde auf verschiedene Weise dargestellt. Zum einen wurden unter Ausnutzung der verschiedenen Spannungsabhängigkeiten der beiden Ströme durch Differenzbildung (s.Abb.9) "reine" ito,s - Ströme gewonnen. Zum zweiten demaskierte die pharmakologische Inhibition des ito,f die schnelle Aktivierung des $i_{to,s}$ und letztlich wurden Zellen gefunden, die spontan ausschließlich den i_{to,s} präsentierten. Die Aktivierungszeitkonstante des i_{to,s} - Stroms mit etwa 3ms bei hinreichend "Distanz" Körpertemperatur, hatte zur Zeitkonstante des Meßsystems, so daß der "wahre" Wert nur geringfügig niedriger liegen dürfte. Das bedeutet, daß beide Ströme bereits in der frühen Repolarisationsphase aktiv sind. Dies wurde klar bestätigt, indem nach pharmakologischer Ausschaltung des ito, f und entsprechender Verlängerung der Phase 1 des Aktionspotentials eine weitere starke Phase 1-Verlängerung nach zusätzlicher ito,s - Inhibition auftrat. Aufgrund der schnellen Inaktivierung des ito,f - Stroms war dessen Wirkung im wesentlichen auf die frühe Repolarisation beschränkt. Aufgrund der langsamen Inaktivierung erstreckt die Wirkung des sich itors auch auf die späteren Repolarisationsphasen. Dies trifft auch zu auf die Potentialbereiche negativ zu -20 bis -30mV, wo eigentlich (im "steady-state") das Aktivierungstor geschlossen ist. Aufgrund der ebenfalls langsamen Deaktivierung beeinflussen die dann fließenden Tail-Ströme das Aktionspotential weiterhin.

Die Inaktivierungszeitkonstante des $i_{to,f}$ wurde hier im Mittel zu 34ms (Testpotential 20-50mV) bei Zimmertemperatur bestimmt, wobei die Werte zwischen 20 und 40ms schwankten. In der Literatur sind vergleichbare Werte zu finden (Josephson et al., 1984; Lefevre et al., 1991). In Kapitel E.1 wird die Interpretation der Inaktivierungskinetik des $i_{to,f}$ nochmals aufgegriffen.

6. Temperaturabhängigkeit der transienten Auswärtsströme

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Charakteristika der transienten Auswärtsströme des Rattenventrikels in starken Maße von der Temperatur abhingen. Im Grunde war dies grundsätzlich zu erwarten. Erstaunlich ist nur, daß sich bis dato trotz eines mittlerweile gigantischen experimentellen Outputs nahezu keine diesbezüglichen Publikationen finden. bereits angedeutet, ist es in der Wie Tat nicht unproblematisch, Elektrophysiologie an Einzelzellen unter definierten, aber innerhalb eines individuellen Experiments schnell veränderbaren Temperaturbedingungen durchzuführen. Aus praktischen Gründen wird daher meist einfach bei "Zimmertemperatur" gearbeitet. Dies suggeriert, daß es sich, wenn schon der Wert nicht klar definiert ist, zumindest um eine konstante Temperatur handelt. Die Erfahrung zeiqt jedoch, daß bei langen Experimenten (bis zu einer Stunde), beispielsweise im Sommer, die Zimmertemperatur bei direkter Sonneneinstrahlung leicht um Werte von 5°C innerhalb eines Experimentes schwanken kann. Da die superfundierten Flüssigkeitsmengen sehr klein sind, nimmt die Badlösung und damit die Zelle diese Temperaturänderungen (mit einer gewissen Zeitverzögerung) an.

Betrachtet man den Effekte einer Temperaturänderung von 5°C, so zeigte sich im steilen Teil der Kurven zwischen 20 und 30°C, eine Amplitudenänderung um bis zu 30 bis 50% beim i_{to,s} bzw. i_{to,f} - Strom. Noch größere Effekte (bis zu 200% Änderung) finden sich bei der Kinetik. Es muß somit gefordert werden, daß die Temperaturänderungen innerhalb eines Experimentes möglichst <<0.5-1°C bleiben, ansonsten können Temperaturartefakte das Ergebnis eines Einzelexperimentes unbrauchbar machen. Das heißt, um Temperatureinflüsse herauszumitteln müßten, bei Experimenten ohne

Temperaturkontrolle die n- Zahlen für aussagefähige Daten erheblich angehoben werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß der i_{to,f} bei etwa 10°C sein Amplitudenmaximum hatte und zu höheren Temperaturen hin kleiner wurde, um etwa bei Körpertemperatur zu verschwinden. Der ito,s verhielt sich etwa invers. Vom thermodynamischen Standpunkt aus ist das Verhalten des i_{to,f} zunächst unverständlich, geht man doch bei biologischen Reaktionen von positiven Temperaturkoeffizienten aus. Analog der Enzymreaktion wäre eher, wie beim ito,s gezeigt, ein temperaturproportionaler Amplitudenanstieg zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen kann folgende sein: es wurde gezeigt, daß die Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung beider Ströme mit Q10- Werten zwischen 2.2 und 5.5 der Thermodynamik des "Enzymmodells" folgte. Bei niedrigen Temperaturen (z.B.10°C) liegen die Zeitkonstanten von Aktivierung (10.5ms) und Inaktivierung (ca.300ms) weit auseinander, so daß alle verfügbaren Kanäle geöffnet werden können, bevor der erste Kanal wieder schließt. Da die Inaktivierung des ito, f einen weit größeren Temperaturkoeffizienten hat als die Aktivierung (2.2 zu 5.5), nähern sich die Zeitkonstanten der beiden Prozesse mit zunehmender Temperatur einander an. Dies führt dazu, daß bei zunehmender Temperatur bereits einzelne Kanäle schließen, bevor alle potentiell verfügbaren geöffnet sind und schließlich Inaktivierung und Aktivierung quasi parallel ablaufen, so daß es zu keinem makroskopisch registrierbaren Strom kommt.

Beim i_{to,s} - Strom tauchen derartige Interaktionen nicht auf, da im untersuchten Temperaturbereich die Inaktivierung immer drastisch langsamer verlief als die Aktivierung, so daß hier mit steigender Temperatur und damit höherer innerer Energie die Amplitude bis zu einem Maximalwert anstieg, der durch andere, kanalspezifische Faktoren determiniert wird.

7. Gleichgewichtspotentiale und ionale Natur der transienten Auswärtsströme

Es wurde bereits in der Einleitung kurz erwähnt, daß der dem ito,f- Strom entsprechende Strom von Dudel (Dudel et al., 1967) voreilig als Chlorid- Strom interpretiert wurde und danach Experimente mit radioaktiven K- Isotopen auf eine starke K- Beteiligung hindeuteten. Direkte Messungen des Umkehrpotentials gab es bis in jüngste Zeit nicht, bis Apkon und Nerbonne (1991) derartige Messungen präsentierten und ein Umkehrpotential von -75mV ermittelten. Ein reiner K⁺- Strom experimentellen Standartbedingungen sollte unter den (K_o:4.7mmol/l, K_i:140mmol/l) etwa bei -85mV sein Vorzeichen ändern. Die Abweichung hätte auf einen Mischstrom mit starker K- Präferenz hindeuten können. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch klar, daß die Daten von Apkon und Nerbonne von ihnen fehlinterpretiert wurden. Nach eigenen Messungen deaktivierte der ito,f bei Zimmertemperatur derart schnell, daß ito,f- Tail- Ströme im whole- cell- modus überhaupt nicht aufgelöst werden konnten. Anhand der Originalregistrierungen von Apkon und Nerbonne wurde für den angeblichen ito,f eine Aktivierungszeitkonstante von Strom etwa 6ms abgeschätzt, was recht genau mit den hier ermittelten Daten für den i_{to,s} - Strom bei Zimmertemperatur übereinstimmt. Apkon und Nerbonne wählten eine Testpulsdauer von 10ms und wähnten sich dadurch frei von anderen Strömen. Wie hier gezeigt, aktiviert der ito,s Strom jedoch ebenfalls schnell ($\tau_{\rm S}$: 3-10ms) und nach 10ms ist bereits ein Großteil der Kanäle offen. Die gezeigten Tail- Ströme sind daher als ito,s- Tail- Ströme zu interpretieren. Immerhin ermittelten sie einen Wert für das Umkehrpotential von -75mV, was recht genau mit dem hier für den i_{to,s} - Strom erhaltenen Wert übereinstimmt.

In dieser Arbeit wurde, um bei den Bestimmmungen des $i_{to,s}$ -Umkehrpotentials den $i_{to,f}$ auszuschließen, der selektive

Blocker 4-AP eingesetzt. Es ist prinzipiell das überzeugendste Verfahren, alle potentiell störenden Ströme weitmöglichst spannungsabhängig bzw. pharmakologisch zu eliminieren. Im Falle des $i_{to,f}$ wäre dies theoretisch und offensichtlich gar nicht zwingend notwendig gewesen, da, wie gesagt, bei Zimmertemperatur die Deaktivierung so schnell vonstatten geht, daß keine $i_{to,f}$ - Tail- Ströme auftreten. Somit würde zwar aufgrund des Spannungsprotokolls der $i_{to,f}$ mitaktiviert, bei der Analyse der Tail- Ströme würde er jedoch nicht stören.

Bei der Interpretation des hier gemessenen Gleichgewichtspotentials des i_{to,f} konnten aufgrund der bei 10°C durchgeführten Experimente ito,f- Tails registriert werden. Die Zugehörigkeit dieser Tail- Ströme zum ito,f wurde durch 4-AP nachgewiesen. Da i_{to,f} - Tail- Ströme bei verschiedenen extrazellulären K⁺- Konzentrationen registriert werden konnten, war es möglich, aus der Differenz der Gleichgewichtspotentiale bei 4.7 und 47mmol/l zusätzliche Informationen über den oder die Ladungsträger zu erhalten. Im Mittel ergaben sich Gleichgewichtspotentiale von -73mV und -13mV für 4.7 bzw. 47mmol/l externem Kalium. Es wurde bereits erwähnt, daß ein Diffusionspotential von -4mV existierte zwischen der normalen Badlösung und der Pipettenlösung, wodurch alle Potentiale um diesen Betrag negativiert werden müssen. Bei der Interpretation des Gleichgewichtspotentials sollte dieser ansonsten vernachlässigbare Fehler miteinkalkuliert werden. Nach Korrektur ergeben sich Werte von -77 bzw. -17mV. Der shift darf natürlich nicht "korrigiert" werden. Nach Nernst beträgt das K-Gleichgewichtspotential -83 und 27mV für die beiden K-Konzentrationen. Die gemessenen Werte sind nahe an den entsprechenden K- Gleichgewichtspotentialen und zeigen, daß der ito,f - Strom zumindest von K⁺- Ionen dominiert wird. Die Beteiligung eines oder mehrerer anderer Ionen am ito,f läßt sich nur aufgrund umfangreicher zusätzlicher Experimente

beantworten. Andererseits entspricht der "shift" des Gleichgewichtspotenials von -60mV in Abhängigkeit von der K-Konzentration fast genau dem nach Nernst für einen K- Strom zu fordernden Betrag von -56mV.

8. Einfluß der transienten Auswärtsströme auf das Aktionspotential

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die transienten Auswärtsströme als K- Ströme in maßgeblicher Weise die Repolarisation des ventrikulären Rattenaktionspotentials Zimmertemperatur, die Bei noch immer bewirken. als Standartversuchstemperatur angesehen werden muß, sind beide Ströme jeweils etwa halbmaximal aktiv. Inhibition des ito, f -Stroms sorgte hier für eine Verlängerung nur der frühen Repolarisationsphase bis etwa -40mV Repolarisation. Die späteren Repolarisationsphasen waren lediglich zeitlich verzögert, ihre Steigung blieb hingegen unverändert. Die und damit der Einfluß eines transienten Aktivität Auswärtsstroms auf das Aktionspotential kann auf zwei verschieden Weisen terminiert werden. Zum einen inaktiviert der Strom zeitabhängig und damit nimmt sein Einfluß auf die Repolarisation theoretisch exponentiell ab. Zum zweiten kann der jeweilige Strom aber auch potentialabhängig terminiert werden. Dies ist der Fall, wenn die Repolarisation ein Potential erreicht hat, wo das virtuelle Aktivierungstor schließt. Beide Vorgänge laufen im Aktionspotential parallel ab und beeinflussen sich gegenseitig. Theoretisch könnte der Einfluß des ito,f- Stroms über die ganze Inaktivierungsdauer, die unter konstanter Depolarisation in der whole- cell-Spannungsklemme gemessen wird, andauern. Dieser Zeitraum war bei Zimmertemperatur 80-160ms. Im realen Fall wird aber bereits nach 20-50ms eine Repolarisation auf etwa -40mV

erreicht, wo das virtuelle Aktivierungstor "unmessbar" schnell schließt und die Aktivität des $i_{to,f}$ beendet. Die weitere Repolarisation wird dann nur noch durch den $i_{to,s}$ -Strom und den bei etwa -40mV aktiv werdenden iK1- Strom unterstützt.

Die Kinetik des ito,s- Stroms unterschied sich z.T. deutlich von der des ito,f und dementsprechend wurde auch das Aktionspotential in charakteristscher Weise beeeinflußt. Der ito,s aktivierte ähnlich schnell wie der ito,f und infolgedessen beeinflußte er auch, wie auch der ito,f, bereits die initiale Repolarisation. Aufgrund der langsamen Inaktivierung von 1-2s kann der i_{to,s} für die Dauer des Aktionspotentials quasi als instantaner Strom angesehen werden. Das heißt, die Beendigung seiner Aktivität müßte ebenfalls dann auftreten, wenn potentialabhängig das virtuelle Aktivierungstor schließt. Dies war, wie beim ito,f-Strom ebenfalls bei etwa -40mV der Fall. Man könnte auf den ersten Blick meinen, das negativ zu -40mV auch der ito.s keinen Einfluß mehr auf die Repolarisation haben dürfte und nur noch der iKl zur Verfügung steht. Dies wird jedoch durch die experimentellen Befunde deutlich widerlegt. Inhibition des ito,s durch Bertosamil bewirkte eine starke Verlängerung auch der späten Repolarisationsphasen. Der scheinbare sich bei einem Blick Widerspruch löst auf die Deaktivierungskinetik auf: die Tail- Ströme, die direkt die Kinetik der Schließung des virtuellen Aktivierungstores zeigen, deaktivierten so langsam, daß selbst bei Potentialen bei denen, im "steady- state" das Aktivierungstor geschlossen ist, durch die langsame Abnahme der Tail- Ströme noch potentiell für einige hundert Millisekunden repolarisierender ito.s - Tail- Strom fließt.

Mit steigender Temperatur wurde eine parallele Verkürzung des Aktionspotentials beobachtet. Nach der momentanen Vorstellung müßte diese Verkürzung auf eine Aktivierung von repolarisienden K- Strömen zurückzuführen sein. Die

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß wider Erwarten nur der itors - Strom dieses Verhalten zeigt und parallel dazu der ito,f amplitudenmäßig absinkt und auch sein Strom- Zeit-Integral aufgrund der beschleunigten Inaktivierung zurückging. Wären beide Effekte gleichgroß, so würden sie sich gegenseitig aufheben und die Aktionspotentialdauer wäre, grob betrachtet, temperaturunabhängig. Dem Absinken des insgesamt beim Aktionspotential fließenden ito,f - Stroms steht die Aktivierung des i_{to,s} gegenüber. Die Amplitude des ito,s steigt mit der Temperatur stark an. Die Inaktivierung erfährt zwar auch eine deutliche Beschleunigung, bleibt aber immer so langsam, daß sie im Vergleich zur Dauer des Aktionspotentials vernachlässigt werden kann. Dadurch gewinnt der ito,s - Strom eine Art "instantane" Charakteristik und der Anstieg des ito,s- Strom- Zeit- Integral überkompensiert die Reduktion des ito, f - Stromflusses.

Die Ergebnisse zeigen, daß der ito,f - Strom nur bei Temperaturen deutlich unterhalb der Körpertemperatur aktiv ist und bei physiologischer Körpertemperatur der Ratte von etwa 38°C der i_{to.s}- Strom der dominierende repolarisierende Strom ist. Es stellt sich natürlich zwangsläufig die Frage nach dem Sinn eines Stroms (i_{to,f}), der nur unter unphysiologischen Bedingungen aktiv ist. Da der warmblütige Organismus äußerst empfindlich auf Temperaturabweichungen von mehr als 1°C reagiert und deutliche Abkühlungen auf Dauer mit dem Leben nicht vereinbar sind, dürfte praktisch im normalen Leben der ito,f - Strom niemals aktiv sein. Es könnte spekuliert werden, daß für den Fall einer deutlichen Unterkühlung der ito, f als "Repolarisationsreserve" verfügbar wäre. Oder ist er ein phylogenetisches Relikt? Es kann diskutiert werden, ob der ito,f - Strom bei Körpertemperatur wirklich völlig verschwindet oder nur im Rahmen der wholecell- Klemmtechnik nicht mehr aufgelöst werden kann. Aber es ist müßig zu argumentieren, ob evtl. noch einzelne Ladungsträger durch ito,f - Kanäle fließen oder nicht.

Tatsache ist, daß auf der Ebene des Aktionspotentials klar gezeigt wurde, daß der $i_{to,s}$ - Strom die überragende Rolle im Repolarisationsprozeß übernimmt.

An dieser Stelle taucht die bereits diskutierte Frage auf, ob die beiden transienten Ströme tatsächlich durch unterschiedliche Kanäle fließen oder ob temperaturabhängig eine Art Übergang von einem zum anderen Strom stattfindet. Die Tatsache, daß bei Zimmertemperatur beide Ströme präsent sind, ist kein strenges Ausschlußkriterium, da temperaturabhängig evtl. nur das Gleichgewicht auf die eine oder andere Seite der Kanaleigenschaften verschoben werden könnte. Dies würde bedeuten, daß sich es um eine Kanalpopulation handelt mit einer allerdings bisher nicht beschriebenen Komplexität. In einer ersten Beschreibung des ito,s - Stroms, die zunächst nur auf Daten fußte, die bei Zimmertemperatur erhoben wurden (Weis et al.1993b), wurde die physiologische Relevanz des $i_{to,s}$ wie folgt diskutiert: In vielen cardialen Geweben stehen für die Repolarisation zumindest zwei Ströme zur Verfügung: der 4-AP- sensitive, hier als ito,f bezeichnete Strom und häufig der, ähnlich wie der i_{to.s} - Strom, langsam inaktivierende i_K- Strom. Im Rattenventrikel war bislang nur der schnelle inaktivierende ito,f - Strom bekannt. Wenn nun, aus welchen Gründen auch immer, innerhalb der Aktivitätsphase des ito,f - Stroms die Repolarisation nicht abgeschlossen ist, so stünde zumindest im Bereich positiv zu -40mV kein repolarisierender Strom mehr zur Verfügung. Daher könnte in Geweben, die keinen starken i_k- Strom haben, der i_{to,s} - Strom dessen Rolle als Repolarisationsgarantie übernehmen. Aufgrund der beschriebenen Abwesenheit des ito, f bei Körpertemperatur ist diese Argumentation jedoch erst einmal hinfällig. Es müßte demnach die oben gestellte Frage aufgegriffen werden, welche Rolle der ito,f überhaupt spielt. Zur Klärung dieser Frage ist es wohl unvermeidlich, auf der Ebene der Einzelkanäle nach Antworten zu suchen. Es müßte untersucht werden, ob sich

die kinetischen und spannungsabhängigen Charakteristika der beiden Ströme unabhängig voneinander im Einzelkanalexperiment wiederfinden lassen. Darüber hinaus müßte geklärt werden, ob evtl. ein bei niedrigen Temperaturen als $i_{to,f}$ typisierter Kanal seine aus dem whole-cell-Experiment bekannten temperaturabhängigen Eigenschaften beibehält oder ob ein Übergang zu einem $i_{to,s}$ - Verhalten eintritt.

E. Abbildungen

Abb.1 Schema der Torkinetik potential- und zeitabhängiger Ionenkanäle.

Die modellhafte Beschreibung des Öffnungsverhaltens transienter Ionenströme beinhaltet zwei virtuelle "Tore", die den Ionenfluß steuern. Im Ruhezustand (1), der etwa beim Ruhepotential existiert, ist das "Inaktivierungstor" (I) offen, das "Aktivierungstor" (A) jedoch geschlossen. Bei einer Depolarisation (2) wird das Aktivierungstor potentialabhängig geöffnet, der Ionenstrom wird freigegegben ("Aktivierung"). Selbst bei andauernder Depolarisation schließt zeitabhängig das "Inaktivierungstor" (3). Dies wird als "Inaktivierung" bezeichnet. Die Rückehr in den Ruhezustand, die "recovery from inactivation", wird erst nach Repolarisation negativ zu einem bestimmten Schwellenpotential wiederhergestellt (4). Die damit verbundene Schließung des Aktivierungstores wird als "Deaktivierung" bezeichnet.



Abb.2 Schema der Langendorff- Apparatur zur Zellisolation. Das Herz wurde via Aorta über eine Pipettenspitze mit der Langendorff- Apparatur verbunden und mit einer Bulldogklemme und einem Bindfaden fixiert. Über die Glaszylinder wurden die entsprechenden Lösungen nach Passage eines Wärmetauschers zugeführt. Der Wärmetauscher stand in Verbindung mit einem Thermostaten, der eine Temperatur von ca. 37° aufrecht erhielt. Über zwei Hähne konnten die unterschiedlichen Perfusionslösungen gewählt werden, die permanent über Glasfritten mit Sauerstoff (O₂) durchströmt wurden.



Abb.3 Fotografie eines Rattenherzens während der Zellisolation.

Das komplett explantierte Herz wurde über die Aorta mit einer Langendorff- Apparatur verbunden. Die Bulldog- Klemme verhinderte ein Abrutschen der Aorta von der Pipettenspitze. Der Bindfaden diente zur Abdichtung. Das Bild zeigt das Herz in der Phase der Perfusion mit Ca- freier Tyrode- Lösung.



Abb.4 Bilder isolierter ventrikulärer Rattenmyozyten.

Die obere Abbildung zeigt frisch dissoziierte Rattenmyozyten in "physiologischer" Badlösung (s.Abschnitt C.5). Die Zellen zeigen die charakteristische langgestreckte Form, die Länge beträgt etwa 150µm. Deutlich sind die einzelnen Sarkomeren zu erkennen, deren typischer Abstand ca.2.2-2.5µm beträgt. Das untere Foto zeigt irreversibel hyperkontrahierte Zellen, die dem Calcium- Paradox zum Opfer gefallen sind. Ebenfalls gut erkennbar sind die geschädigten, granulierten Mitochondrien.



Abb.5 Schema der Registrierung transmembranärer Ionenströme. Die Zelle (Z) war intrazellulär über die Glasmikropipette (P) mit dem Spannungsklemmverstärker (VCA) verbunden, der das Membranpotential und den jeweiligen Klemmstrom registrierte. Beide Meßgrößen wurden über einen A/D- Wandler (Strom:12 bit, Spannung:8 bit) digitalisiert und auf der Festplatte des Rechners (PC) abgelegt, außerdem wurden sie on-line auf einem Oscilloskop (SC) dargestellt. Die Kommandosignale für den VCA lieferte alternativ ein spezielles Programm vom Rechner oder ein analoger Signalgenerator (SG). Zwischen beiden Quellen konnte über einen Schalter (**S1**) gewechselt werden. Schalter S2 wählte zwischen Triggersignalen beider Signalquellen, die für die Synchronisierung des SC und für die Steuerung des Registrierprogramms erforderlich waren. Die Referenzelektrode bildete ein chlorierter Silberdraht im Versuchsbad, sie wurde mit dem VCA verbunden und ist schematisch durch das Massezeichen nahe der Zelle dargestellt.



Abb.6 Aktivierung von transienten Auswärtsströmen.

Α. Bei einem Testpotential von 25mV (Konditionierungspotential: -118mV) wurden schnell (τ_{f} :34ms) langsam $(\tau_{s}:1.6s)$ inaktivierende transiente und Auswärtsströme aktiviert. Bei einem anschließenden Testpotential von -25mV wurden Tail- Ströme des langsam inaktivierenden transienten Auswärtsstroms registriert. B. Zeitabhängige Inaktivierung transienter Auswärtsströme. Die Zahlen bezeichnen die vorausgegangenen Konditionierungspotentiale in mV. Nach einem Konditionierungspotential von -120mV wurden bei einem Testpotential von 40mV schnell und langsam inaktivierende Auf transiente Auswärtsströme ausgelöst. den Peak-Auswärtsstrom folgte die schnelle Inaktiverung des ito,f- und schließlich die des i_{to,s}- Stroms. Innerhalb des 10s dauernden Testpulses inaktivierte der ito.s-Strom vollständig und kein Tail- Strom war mehr auslösbar. Am Ende des Testpulses traf die Stromspur das Niveau der Referenzspur (Konditionierungspotential -38mV), in der die transienten Auswärtsströme spannungsinaktiviert waren. C Ableitungen von derselben Zelle wie in B, jedoch wurde der Testpuls in der frühen Inaktivierungsphase des ito,s- Stroms beendet. Unter diesen Bedingungen wurden Tail- Ströme bei -24mV registriert, die ebenfalls vollständig zeitabhängig inaktivierten. In der Referenzspur (Konditionierungspotential -38mV) wurden keine transienten Auswärtsströme registriert.





Abb.7 Spannungsabhängige Inaktivierung der transienten Auswärtsströme.

A. Ito, f und ito, s wurden bei einem Testpotential von 46mV aktiviert. Die vorausgegangenen Konditionierungspotentiale (V_{cond} , mV) sind durch Ziffern an den Kurven gekennzeichnet. $I_{to,s}$ - Tail- Ströme wurden bei -24mV registriert. Bei -125mV waren beide transienten Auswärtsströme vollständig verfügbar, bei -83mV war der ito,f- Strom noch voll aktivierbar, der ito.s- Strom jedoch nur noch zur Hälfte. Eine vollständige Inaktivierung des ito,s- Stroms trat bei -55mV ein, wo der ito,f- Strom immer noch auslösbar war. Bei -40mV war keiner der transienten Auswärtsströme mehr aktivierbar. Die Tail-Ströme zeigten die gleiche Spannungsabhängigkeit wie der ito,s- Strom. B. Auswertung der Stromamplituden. Der ito,f-Strom (●) wurde als zeitabhängig inaktivierender Strom ausgewertet: Maximaler Auswärtsstrom minus Auswärtsstrom bei 4 Inaktivierungszeitkonstanten (4 τ_{f}). Zu diesem Zeitpunkt $(4_{\tau f})$ wurde der $i_{to,s}$ - Strom (\blacktriangle) ermittelt: Auwärtsstrom beim jeweiligen Testpotential minus Auswärtsstrom der Stromspur (Referenzstromspur) mit dem negativsten Konditionierungspotential ohne transienter Auftreten Auswärtsströme (-40mV in diesem Beispiel). Die Tail- Ströme (■) wurden bei -28mV gegen die Referenzstromspur ausgewertet. C. Inaktivierungskurven wurden durch Auftragen der normalisierten Stromamplituden (Ordinate) qeqen das Konditionierungspotential (Abszisse) erstellt. Der ito,f-Strom war bei -60.5mV halbmaximal, der Steigungsfaktor der Kurve betrug 4mV. Die Inaktivierungskurven für den ito,s-Strom bzw. die Tail- Ströme waren virtuell identisch, unterschieden sich aber deutlich von der ito,f- Kurve. Die halbmaximale Inaktivierung trat bei -86.7 bzw. -85.9mV auf, die Steigungsfaktoren betrugen 9.8 bzw. 10.6mV.



Abb.7

Abb.8 Spannungsabhängige Aktivierung des $i_{to,f}$ - Stroms. **A.** Der $i_{to,f}$ - Strom wurde von einem Konditionierungspotential von -58mV aus bei verschiedenen Testpotentialen (V_{test}) aktiviert und als zeitabhängiger Strom ausgewertet. **B.** Die $i_{to,f}$ - Ströme aus **A** wurden als zeitabhängige Ströme ausgewertet und in Form von Leitfähigkeiten (Ordinate) gegen das Testpotential aufgetragen. Die Aktivierungskurve zeigte im untersuchten Potentialbereich keinen sigmoiden Verlauf, sondern stieg positiv zu einem Schwellenpotential von etwa -40mV quasi linear an. Daher konnte die spannungsabhängige Aktivierung des $i_{to,f}$ nicht durch eine Boltzmann- Funktion angepaßt werden und es waren keine Angaben der halbmaximalen Aktivierung und des Steigungsfaktors möglich.



Abb.9 Darstellung des i_{to,s}- Stroms durch Subtraktion des i_{to,f}-Stroms.

A. Der ito,f- Strom wurde von einem Konditionierungspotential -54mV (Inaktivierung des i_{to,s}- Stroms) von bei Testpotentialen zwischen -39 und 42mV aktiviert. B. Bei einem Konditionierungspotential von -108mV wurden beide transienten Ströme aktiviert. C. Durch Subtraktion der Ströme aus Bild A von denen aus Bild B wurden Stromspuren gewonnen, die überwiegend ito,s- Ströme darstellen. Die Ströme zeigen die charakteristische langsame Inaktivierung des ito,s- Stroms und interessanterweise eine schnelle Aktivierung. D. Aus den Differenzkurven wurde eine Aktivierungskurve konstruiert, wobei die ito,s-Ströme hier als "peak- Ströme" gegen den Nullstrom ausgewertet und dann als Leitfähigkeiten gegen das Testpotential aufgetragen wurden. Die rechnerische Auswertung ergab eine halbmaximale Aktivierung von -15.7mV und einen Steigungsfaktor von -7.6mV.





Abb.10 Aktivierungskurve des ito,s- Stroms.

Ausgehend von einem Konditionierungspotential von -119mV wurde der $i_{to,s}$ - Strom stufenweise im Potentialbereich von -43 bis 52mV aktiviert. I_{to,s}- Tail- Ströme wurden bei -29mV registriert. Die Abbildung zeigt die Auftragung der auf Leitfähigkeiten umgerechneten - Tail- Ströme gegen das Testpotential, bei dem der $i_{to,s}$ - Strom ausgelöst wurde. Die Öffnung des virtuellen $i_{to,s}$ - Aktivierungstors begann bei etwa -40mV und war bei \geq 30mV vollständig offen. Die rechnerische Auswertung ergab eine halbmaximale Öffnung des $i_{to,s}$ - Aktivierungstors bei -14.2mV und einen Steigungsfaktor von -11.8mV.





B



Abb.11 Originalregistrierungen einer Zelle mit alleiniger Ausprägung nur des i_{to,s}- Stroms.

A. Der i_{to,s}- Strom (▲) und seine Tail- Ströme (■) wurden bei Testpotentialen von 49mV bzw. -30mV registriert. Die vorhergehenden Konditionierungspotentiale zwischen -148 und -40mV sind durch Zahlen an den Stromspuren gekennzeichnet. In diesem Experiment wurde der ito,s- Strom als "Peak"-Auswärtsstrom gegen die Referenzstromspur (-40mV) ausgewertet. Die Tail- Ströme wurden, wie bei Abb.7 beschrieben, ausgewertet. B. Inaktivierungskurven des ito.sdes Tail- Stroms. Die Charakteristika der und Inaktivierungskurven von i_{to,s}- bzw. Tail- Strömen waren nahezu identisch, die halbmaximale Inaktivierung betrug -91.6 bzw. -91.9mV. Die Steigungsfaktoren waren 11.6 bzw. 12.2mV. C. Die normierten Kurven bestätigen die Übereinstimmung der unterschiedlichen Methoden gewonnenen nach den Inaktivierungskurven.



Abb.11

Abb.12 Originalregistrierungen einer Zelle, die nur den i_{to,f}- Strom zeigte.

A. In allen Stromspuren traten nur schnell inaktivierende transiente Auswärtsströme auf, auch bei sehr negativen Konditionierungspotentialen. Nach vollständiger zeitabhängiger Inaktivierung des $i_{to,f}$ -Stroms lagen alle Stromspuren auf demselben Niveau und es wurden nur noch zeitunabhängige Ströme registriert. **B**. Die Inaktivierungskurve des $i_{to,f}$ - Stroms zeigt den typischen Verlauf mit einer halbmaximalen Inaktivierung bei -56.6mV und einem Steigungsfaktor von 5.1mV.


Abb.13 Effekt von 4-Aminopyridin auf transiente Auswärtsströme.

Schnell und langsam inaktivierende transiente Α. Auswärtsströme wurden bei einem Testpotential von 24mV zunächst unter Kontrollbedingungen aktiviert. Die Zahlen an den Stromspuren bezeichnen die jeweiligen Konditionierungspotentiale (Spannungsprotokoll s.Abb.5B unten). Beim Konditionierungspotential von -123mV waren beide transienten Auswärtsströme voll verfügbar, dagegen bei -25mV (Referenzstromspur) vollständig inaktiviert. Die Tail- Ströme wurden bei -25mV registriert. B. Nach Applikation von 1mmol/1 4-AP war der ito,f- Strom vollständig inhibiert, der ito,s-Strom und dessen Tail- Strom hingegen blieben unbeeinflußt. Der persistierende transiente Auswärtsstrom repräsentiert den ito,s- Strom. C. Der 4-AP- sensitive oder ito,f- Strom wurde durch Subtraktion der Stromspuren "Kontrolle" minus "4-AP" (Konditionierungspotential -123mV) gewonnen. Die Aktivierungszeitkonstante des ito,f - Stroms wurde zu τ = 1.1ms bestimmt. **D.** Die Abbildung zeigt die ersten 25ms des ito,s- Stroms aus **B** (Konditionierungspotential -123mV). Die Aktivierungszeitkonstante des ito,s- Stroms betrug in diesem Experiment 3.3ms.



Abb.14 Wirkung von Bertosamil auf transiente Auswärtsströme. A. Beim Testpotential von 25mV (Konditionierungspotential -118mV) wurden die transienten Auswärtsströme ito, f und ito, s aktiviert. Die Tail- Ströme wurden bei -25mV registriert. Die Nummern an den Stromspuren bezeichen die Bertosamil-Konzentration in µmol/l. Der ito,s- Strom und dessen Tailwurden konzentrationsabhängig durch Bertosamil Ströme inhibiert, wohingegen die Amplitude des i_{to,f} -Stroms, gemessen als zeitabhängig inaktivierender Strom, nicht beeinflußt wurde. B. Die Abbildung zeigt die ersten 200ms von Abb.14A in zeitlich gedehnter Form. Zusätzlich sind die jeweiligen Referenzstromspuren (-25mV Konditionierungspotential) dargestellt, in denen die transienten Auswärtsströme inaktiviert waren. Der ito,s- Strom wurde durch 1µmol/l Bertosamil etwa halbmaximal inhibiert. Bei 3µmol/l trat eine vollständige Blockade auf, die daran erkennbar war, daß nach Inaktivierung des ito,f- Stroms die Stromspuren unabhängig vom Konditionierungspotential auf einem Niveau lagen. C. Inaktivierungskurven des ito,f-Stroms. Bertosamil hatte keinen Effekt auf die Amplitude oder Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung: $1(\blacklozenge)$ und 3μ mol/ $1(\bullet)$ Bertosamil im Vergleich zur Kontrolle (). D. Inaktivierungskurven des i_{to,s}- Stroms. Bertosamil inhibierte den i_{to,s}- Strom konzentrationsabhängig (0 ∎, 1♦, 3● µmol/l) ohne die Lage der Inaktivierungskurven auf der Spannungsachse zu beeinflussen. Die halbmaximale Inaktivierung betrug -86mV (\blacksquare) und -89mV (\blacklozenge), die Steigungsfaktoren lagen bei 10.3 und 12.3mV.

111



Abb.15 Konzentrationsabhängkeit der Bertosamil- Wirkung auf die transienten Auswärtsströme

Die Abbildung zeigt die normierten Amplituden des i_{to,f}-Stroms (ullet) und des i_{to,s}- Stroms (llet) in Abhängigkeit von der Bertosamil- Konzentration. Der ito,f- Strom wurde als zeitabhängig inaktivierender Strom gemessen, der ito,s- Strom wurde als spannungsabhängige Komponente ausgewertet (s. Abb.7). Die Zahlen oberhalb der Grafik geben die Anzahl der Versuche an, die bei den jeweiligen Bertosamil-Konzentrationen ausgewertet wurden. Die Amplitude des ito,f-Stroms wurde durch Bertosamil nicht signifikant beeinflußt, ito,s- Strom hingegen wurde konzentrationsabhängig der inhibiert. Die Schwellenkonzentration betrug ca. 0.1µmol/1, eine vollständige Inhibition trat bei Konzentrationen 3µmol/l auf. Die halbmaximale Inhibition wurde \geq zu 0.63µmol/l berechnet.



µmol/l Bertosamil

 ${\tt Abb.16}$ Effekte von Tetrodotoxin und ${\tt CdCl}_2$ auf die transienten Auswärtsströme.

Beide transienten Auswärtsströme wurden bei einem Testpotential von 37mV aktiviert, die Zahlen an den Stromspuren geben die jeweiligen Konditionierungspotentiale Die i_{to,s}- Tail- Ströme wurden bei -24mV an (mV). registriert. In der Kontrolle (A) zeigen sich die typischen, unterschiedlichen Zeit- und Spannungsabhängigkeiten des ito,f- und des ito,s- Stroms. B. In Gegenwart von 200µmol/1 CdCl₂ und 10µmol/l TTX waren der L- Typ Calcium- Strom und der Na- Strom blockiert. Auch unter diesen Bedingungen konnten beide transienten Auswärtsströme abgeleitet und zeitund spannungsabhängig diskriminiert werden.





Abb. 17 Effekte von DIDS auf die transienten Auswärtsströme. A. Der obere Teil der Abbildung zeigt die potentialabhängige Aktivierung der transienten Auswärtsströme unter Kontrollbedingungen. Die Zahlen bedeuten die jeweiligen Konditionierungspotentiale (mV). Unter dem Einfluß von 100µmol/l (Mitte) und 200µmol/l DIDS (unten) wurde die Amplitude des ito,s- Stroms konzentrationsabhängig reduziert. B. Inaktivierungskurven des ito,f- Stroms, gemessen als zeitabhängiger Strom, der durch DIDS (100µmol/1 ■, 200µmol/1 ●) kaum beeinflußt wurde. Auf die Lage der Inaktivierungskurven auf der Spannungsachse hatte DIDS keinen Einfluß. Die halbmaximale Inaktivierung trat ein bei -65mV (0µmol/1 ▲), -65mV (100µmol/1 ■) und -64mV (200µmol/1 ●) C. Inaktivierungskurven des ito,s- Stroms. 100µmol/l (■) bewirkten etwa eine halbmaximale Inhibition gegenüber der Kontrolle (\blacktriangle), während 200µmol/l (\bullet) den i_{to.s}- Strom auf ca. 30% reduzierten. Trotz des starken Amplitudeneffektes wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung nicht verändert. Die halbmaximale Inaktivierung betrug -90.1mV (0µmol/l), -90.0mV (100µmol/l) und -90.4mV (200mmol/l).



Abb.18 Temperaturabhängigkeit der Aktionspotentialdauer.

Frequenz von 0.5Hz Bei einer wurden zunächst Aktionspotentiale bei 15°C registriert. Das Bild wurde vom Oszilloskop abfotografiert und invertiert. Anschließend wurde die Temperatur bei kontinuierlicher Registrierung auf 37°C 1°C pro Sekunde erhöht. Parallel etwa mit zum Temperaturanstieg zeigte sich eine drastische Verkürzung des eine Aktionspotentials sowie Hyperpolarisation der Zellmembran. Die Aktionspotentialdauer betrug 37ms bei 15°C und einer Repolarisation auf -60mV , dagegen bei 37°C nur noch 7ms.



Abb.19 Einfluß der Versuchstemperatur auf die transienten Auswärtsströme.

Beide transienten Auswärtsströme wurden bei einem Testpotential von 49mV, ausgehend von einem Konditionierungspotential von -137mV, aktiviert. Die ito,s-Ströme wurden bei -29mV ausgelöst. Das Tail-Spannungsprotokoll unter E gilt für die Bilder A-E. Die Stromkalibrierung beträgt jeweils 500pA, die Zeitmarke entspricht 200ms. Beim Konditionierungspotential von -28mV waren die transienten Auswärtsströme inaktiviert, diese Stromspuren dienten als Referenzstromspuren. A. Zunächst wurden die Ströme bei einer Temperatur von 20°C registriert, danach, bei jeweils um 5°C erhöhter Temperatur (B-E), bis auf 40°C (E). Durch den Temperaturanstieg wird eine Beschleunigung sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung des ito,f- Stroms sowie eine beschleunigte Inaktivierung des ito,s- Stroms erkennbar. Darüber hinaus nahm die Amplitude des zeitabhängig inaktiverenden ito,f-Stroms temperaturabhängig ab. Bei 40° war dieser nicht mehr identifizierbar. Im Gegensatz dazu stieg die Amplitude des ito,s- Stroms und die der Tail- Ströme mit zunehmender Temperatur an. Bei 35°C hatte der i_{to,s}- Strom sein Amplitudenmaximum. Er stieg bei Temperaturaturerhöhung auf 40° nicht weiter an. Die i_{to,s}-Tail-Ströme waren stets proportional zum ito.s-Strom.



Abb.20 Temperatursensitive transiente Auswärtsströme.

Die Abbildung zeigt die temperatursensitiven Ströme aus Abb.19 (Konditionierungspotential -137mV), wobei jeweils die Stromspuren bei der niedrigsten Temperatur (20°C) als Referenz verwendet wurden. Dementsprechend zeigen die Bilder **A** bis **D** die temperatursensitiven Ströme von 20 gegenüber 25°C (**A**) bis 20 gegenüber 40°C (**D**). Die Kalibrierungen betragen jeweils 500pA bzw. 200ms. Mit zunehmender Temperatur stieg der langsam inaktivierende $i_{to,s}$ - Strom deutlich an. Der Aktivierungsprozeß der temperatursensitiven Ströme entspricht nicht der Aktivierung des reinen $i_{to,s}$ - Stroms, sondern ist überlagert durch die Reduktion der Amplitude und der Beschleunigung der Aktivierung und Inaktivierung des $i_{to,f}$ -Stroms.





Abb.21 Fehlen der 4-Aminopyridin- Wirkung bei erhöhter Temperatur.

A. Zunächst wurden die Ströme $i_{to,f}$ und $i_{to,s}$ bei Zimmertemperatur (23°C, O) und 49mV Testpotential (Konditionierungspotential: -126mV) aktiviert. Der $i_{to,s}$ -Tail- Strom wurde bei -29mV registriert. Danach wurde die Temperatur auf 37°C erhöht (\bullet). Dies bewirkte eine Steigerung des $i_{to,s}$ - Stroms und ein Verschwinden des schnell inaktivierenden $i_{to,f}$ - Stroms. Nun wurde (bei 37°C) 1mmol/1 4-AP appliziert (\blacksquare), das jedoch den transienten Strom nicht beeinflußte. B. Der temperatursensitive Strom (37 minus 23°C) zeigte wieder die starke Aktivierung des $i_{to,s}$ - Stroms bei Temperaturerhöhung.



Abb.22 Effekte von Bertosamil bei erhöhter Temperatur.

Die Membran wurde bei einer Versuchstemperatur von 37°C auf ein Testpotential von 48mV (Konditionierungspotential -124mV) geklemmt. Der $i_{to,s}$ - Tail- Strom wurde bei -28mV registriert. Bei 37°C ist der $i_{to,f}$ - Strom inaktiv und der $i_{to,s}$ - Strom maximal. Nach Registrierung des Kontrollstroms (\bullet) wurde der selektive $i_{to,s}$ - Blocker Bertosamil in einer Konzentration von 3µmol/l (\blacktriangle) superfundiert. Bertosamil bewirkte eine vollständige Inhibition des gesamten transienten Auswärtsstroms. Dies zeigt, daß der gesamte transiente Auswärtsstrom bei 37°C durch den $i_{to,s}$ - Strom repräsentiert wird.



Abb.23 Temperaturabhängigkeit der Amplituden von ito,f und $i_{to,s}$. Die transienten Auswärtsströme wurden jeweils bei Temperaturen zwischen 10 und 40°C registriert und gemäß dem Schema in Abb.7 ausgewertet. Die Grafik zeigt Mittelwerte aus 5 vollständigen Experimenten. Die jeweiligen Stromamplituden wurden auf die Werte bei 25°C normiert. Die Amplitude des $i_{to,f}$ - Stroms (●) war maximal bei Temperaturen <15°C. Er war inaktiv bei Temperaturen ≥40°C, wobei in vielen Experimenten schon bei 35°C kein $i_{to,f}$ - Strom mehr meßbar war. Die Amplitude des $i_{to,s}$ - Stroms (▲) zeigte ein nahezu inverses Verhalten in Abhängigkeit von der Temperatur. Maximale $i_{to,s}$ - Amplituden traten bei Temperaturen ≥35°C auf, während der Strom bei ≤15°C im Mittel inaktiv war.

Der Verlauf der Kurven wurde durch eine Boltzmann- Verteilung angepaßt (analog zu den Strom- Spannungskurven). Der $i_{to,f}$ -Strom war bei einer Temperatur von 30.3°C halbmaximal, der $i_{to,s}$ - Strom bei 25.1°C. Die Steigungsfaktoren betrugen 3.3°C und 3.9°C.



Abb.24 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung des i_{to,f}-Stroms

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Inaktivierung des ito,f-Stroms bei zwei Temperaturen. A. Registrierung des ito,feiner Temperatur von 15°C. Durch das Stroms bei Konditionierungspotential von -47mV war der ito,s- Strom potentialabhängig inaktiviert. Die Inaktivierungszeitkonstante betrug hier τ =111ms. **B**. Bei einer Temperatursteigerung auf 30°C inaktivierte der ito,ferheblich schneller; die Zeitkonstante Strom der Inaktivierung betrug nur noch τ =8ms. Man beachte die unterschiedliche Zeitbasis gegenüber A. Darüber hinaus ist die Amplitudenreduzierung des zeitabhängigen ito,f- Stroms gegenüber A deutlich erkennbar.



Abb.25 Temperaturabhängigkeit der Kinetik der transienten Auswärtströme

Die transienten Auswärtsströme wurden in individuellen Experimenten bei verschiedenen Temperaturen zwischen 10 und 40°C in Gegenwart von 200µmol/l CdCl₂ zur Inhibition des I_{Ca} aktiviert. Die Zeitkonstanten der Aktivierung bzw. Inaktivierung wurden ermittelt und als Mittelwerte plus Standardabweichung (± SD) gegen die Versuchstemperatur aufgetragen. Die Zahl der Experimente pro Temperatur lag zwischen 5 und 8. Die Meßwerte konnten sehr gut durch Exponentialfunktionen angepaßt werden. A: $I_{to,f}$ -Aktivierung. B. $I_{to,f}$ - Inaktivierung: C: $I_{to,s}$ -Aktivierung, D: $I_{to,s}$ - Inaktivierung.







Abb.26 Temperaturabhängigkeit der 4-AP- Wirkung auf die transienten Auswärtsströme.

Die Abbildung zeigt den Effekt von 4-AP auf transiente Auswärtsströme bei Temperaturen von 10°, 25° und 37°C. Die Experimente wurden jeweils in Gegenwart von 200µmol/l CdCl₂ durchgeführt. Die Spannungsprotokolle befinden sich unterhalb Ausgehend von hyperpolarisierenden Stromspuren. der Konditionierungspotentialen (-120 bis -126mV) wurde die auf Testpotentiale von ca. 50mV Membran unter Kontrollbedingungen (C) geklemmt. Danach wurde 1mmol/l 4-AP appliziert. A. Bei 10°C Versuchstemperatur ist der 4-APito,f- Strom durch eine extrem sensitive langsame Inaktivierung charakterisiert. **B.** Bei 25°C (Zimmertemperatur) ist die Inaktivierung des 4-AP- sensitiven Stroms stark beschleunigt. Gleichzeitig ist innerhalb des 1s- Testpulses die partielle Inaktivierung des i_{to,s}- Stroms zu erkennen. C. Bei 37°C ist kein 4-AP- sensitiver Strom mehr aktiv, die Stromspuren werden von dem i_{to,s}- Strom dominiert. Es ist ohne weiteres nicht möglich, die Kontrollströme bei 10° und 37°C auseinanderzuhalten, sie zeigen praktisch den gleichen Kurvenverlauf, obwohl es sich einmal (A) um den ito,f- Strom und in (C) um den $i_{to,s}$ - Strom handelt.



Abb.26

Abb.27 4-AP- Sensitivität der Tail- Ströme bei niedriger Temperatur

Bei einer Temperatur von 10° C wurde ein Klemmuster appliziert, das prinzipiell beide transienten Ströme aktivieren könnte. Es zeigte sich beim Testpotential von 49mV unter Kontrollbedingungen (C) ein langsam inaktivierender Strom nebst einem Tail- Strom bei -25mV. Unter dem Einfluß des i_{to,f} - Blockers 4-AP (\bullet) verschwand der transiente Strom zusammen mit dem Tail- Strom, der sich somit als Deaktivierungsstrom des i_{to,f} - Stroms identifizieren läßt.



Abb.28 Bestimmung des Gleichgewichtspotentials des $\text{I}_{\text{to},\,f}^-.$ Stroms.

Der ito,f- Strom wurde bei einer Versuchstemperatur von 10°C (Testpotential: 58mV). Beim aktiviert Α. Konditionierungspotential von -56mV und zusätzlich durch die niedrige Temperatur war der ito,s- Strom inaktiv. Nach der 100ms dauernden Depolarisation auf 58mV wurden ito,f- Tail-Ströme bei verschiedenen Potentialen (V₊) bei einer extrazellulären K⁺- Konzentration von 4.7mmol/l (linke Bildhälfte) bzw. 47mmol/l (rechte Bildhälfte) registriert. Die Stromkalibrierungen betragen jeweils 500pA. B. Beim Konditionierungspotential von -16mV war auch der ito,f- Strom Tail- Ströme mehr inaktiviert und es wurden keine registriert. C. Die Bilder zeigen exemplarisch je eine Stromspur aus A und B, nämlich bei einem Tail- Potential von -28 mV $(4.7[K^+]_{0})$ und 53 mV $(47[K^+]_{0})$, ausgehend von einem Konditionierungspotential von -56 und -16mV. Die Differenz der Stromspuren (gezeigt für V_{t} = -28mV und 53mV) entspricht dem spannungsabhängigen ito,f- Tail- Strom. Die Zahlen geben die Konditionierungspotentiale (mV) an. D. Strom- Spannungs-Kennlinien der Tail- Ströme, gemessen als Amplituden der Differenzstromspuren A minus B. Es fällt auf, daß die ito,f-Tails eine starke Auswärtsgleichrichtung bei beiden K'-Konzentrationen zeigen, Einwärtsströme sind nahezu nicht vorhanden. Im Auswärtsbereich jedoch verlaufen die Kurven quasi linear in Abhängigkeit vom Potential (Vt). Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden betragen $(4.7[K^{\dagger}]_{0})$ und 0.992 $(47[K^{\dagger}]_{0})$. Die aus 0.996 den Schnittpunkten mit der Spannungsachse ermittelten Gleichgewichtspotentiale wurden zu -72mV bzw. -12mV für 4.7 bzw. 47mmol/l [K⁺]_o berechnet. Demnach beträgt die Verschiebung des Gleichgewichtspotentials bei einer Erhöhung der extrazellulären K- Konzentration um eine log- Einheit 60mV.



Abb.29 Bestimmung des itors - Gleichgewichtspotentials.

A. Zunächst wurden ito,s - Tail- Ströme in Gegenwart von 1mmol/l 4-AP zur Elimination des ito,f - Stroms bei Zimmertemperatur und verschiedenen Testpotentialen (V_t) registriert. **B.** Bei einem Konditionierungspotential auf depolarisiertem Niveau (-42mV) waren der ito,s- Strom inaktiviert und auch die Tail- Ströme verschwunden. Ausgehend von diesem Konditionierungspotential mit inaktiviertem ito,s-Strom wurde unter ansonsten gleichem Spannungsprotokoll eine Serie von Stromspuren als Referenz aufgenommen. C. Durch Subtraktion der entsprechenden Stromspuren A minus B konnten als Differenzströme reine i_{to,s} - Tail- Ströme gewonnen werden. Bildteil C zeigt exemplarisch zwei derartige Differenzstromspuren, ausgehend jeweils von einem Konditionierungspotential von -123mV und -42mV. D. Strom-Spannungskurve der ito,s - Tail- Ströme, errechnet aus den Differenzkurven. Es ist eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung festzustellen. Die Regressionsgerade der Auswärts- Tail- Ströme schnitt die Nullstromlinie bei -75.3mV.



Abb.29

Abb.30 Beeinflussung des Aktionspotentials durch die transienten Auswärtsströme.

Aktionspotentiale wurden bei Zimmertemperatur mit einer Frequenz von 1Hz ausgelöst. Das Kontrollaktionspotential (C) zeigte den typischen mehrphasigen Zeitverlauf. Zugabe von 1mmol/1 4-AP (\bullet) in die Badlösung bewirkte eine starke Repolarisationsverzögerung im Bereich der Phase 1 bis ca. -40mV. Die späte Repolarisation wurde durch 4-AP nicht beeinflußt, sondern nur zeitlich verzögert. Danach wurde zusätzlich zu 4-AP der i_{to,s}- Blocker Bertosamil (3µmol/1, \blacksquare) hinzugefügt. Dies resultierte in einer weiteren starken Repolarisationsverzögerung, wobei nicht nur die frühe Repolarisation, sondern auch die späteren Phasen verlängert wurden.


Abb.31 Temperaturabhängige Beeinflussung des Aktionspotentials

A. Aktionspotentiale wurden bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz getriggert. Bei einer Temperatur von 10°C wurde nach Registrierung des Kontrollaktionspotentials (C) der itorf-Inhibitor 4-Aminopyridin (4-AP, 1mmol/l) appliziert, was in einer starken Verlängerung des Aktionspotentials resultierte. Die zusätzliche Applikation von Bertosamil (Bert, 3µmol/1) führte zu keiner weiteren Beeinflussung des Aktionpotentials. B. Bei einer Temperatur von 25°C zeigte sich in Gegenwart von 4-Aminopyridin (4-AP, 1mmol/l) ebenfalls noch eine deutliche Verlängerung des Aktionspotentials im Vergleich zur Kontrolle (C). C. Bei Körpertemperatur (37°C) war das Aktionspotential unter Kontrollbedingungen (C) bereits erheblich kürzer als bei Zimmertemperatur. Zugabe von 4-AP (1mmol/1) hatte jedoch keinen Effekt auf die Aktionspotentialdauer. Die zusätzliche Gabe von 3µmol/l Bertosamil führte hingegen zu einer sehr starken Repolarisationsverzögerung.







Abb.31

Abb.32 Vergleich verschiedener Auswerteverfahren für den i_{to,f}- Strom.

A. Die Abbildung zeigt schematisch zwei verschiedene Auswerteverfahren für den ito,f- Strom. Der zeitabhängige ito,f- Strom (●) wurde ermittelt als "Peak"- Auswärtsstrom minus Strom bei 4 Inaktivierungszeitkonstanten (4 τ_{f}) des $i_{to,f}$ - Stroms. Der spannungsabhängige $i_{to,f}$ - Strom (O) wurde als "Peak"- Auswärtsstrom minus dem isochronen Strom in der ermittelt. B. Unter Anwendung beider Referenzsstromspur Auswertemethoden wurden anhand typischer Originalregistrierungen (nicht gezeigt) beispielhaft ito,f-Inaktivierungskurven ausgewertet. Der zeitabhängige ito,f-Strom erreichte ein Plateau bei Konditionierungspotentialen negativ zu ca. -70mV, während der spannungsabhängige ito,s-Strom eine bisigmoide Kennlinie zeigte. C. Die Differenzkurve spannungsabhängiger minus zeitabhängiger ito,f- Strom ergab die typische Inaktivierungskennlinie des i_{to,s}- Stroms mit einer halbmaximalen Inaktivierung bei -87mV und einem k-Faktor von 10mV.



Abb.32

F. Literatur:

Abbott G.W., Goldstein S.A.N., Sesti F. (2001) Do all voltage-gated potassium channels use MiRPs? irc. Res. 88: 981

Agus Z.S., Dukes I.D., Morad M. (1989) Divalent cations modulate transient outward current in rat ventricular myocytes. J Physiol (Lond) 418, 28P

Aldrich R. (2001) Fifty years of inactivation. Nature 411: 643-644

Apkon M., Nerbonne J.M. (1991) Characterization of two distinct depolarization- activated K^+ - currents in isolated adult rat ventricular myocytes. J Gen Physiol 97:973-1011

Antzelevich C., Sicouri S., Litovsky H., Lukas A., Krishnan S.C., Di Diego J.M., Gintant G.A., Liu D.W. (1991) Heterogeneity within the ventricular wall: electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial and M- cells. Circ Res. 69, 6: H1427-H1449

Benndorf K., Markwardt F., Nilus B. (1987) Two types of transient outward currents in cardiac ventricular cells of mice. Pflügers Arch 409, 641-643

Berger F., Borchard U., Hafner D. (1989a) Effects of the calcium entry blocker bepridil on repolarizing and pacemaker currents in sheep cardiac Purkinje fibres. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 339, 638-646

Berger F., Borchard U., Hafner D. (1989b) Effects of (+) and (\pm) - sotalol on repolarizing outward currents and pacemaker current in sheep cardiac Purkinje fibres. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 340: 696-704

Berger F., Borchard U., Hafner D., Kammer T., Weis T. (1991) Inhibition of potassium outward currents and pacemaker current in sheep cardiac Purkinje fibres by the verapamilderivative YS-035. Naunyn- Schmiedebergs Arch Pharmacol 344: 653-661

Berger F., Borchard U., Hafner D., Kammer T., Weis T. (1995) Modulation of action potential duration by inhibition of the transient outward current in sheep cardiac Purkinje fibres. Basic Res Cardiol 90: 185-191

Bouron A., Potreau D., Raymond G. (1991) Possible involvement of a chloride conductance in the transient outward current of whole-cell voltage-clamped ferret ventricular myocytes. Pflügers Arch.419, 534-536

Boyle W.A., Nerbonne J M. (1991) A novel type of depolarization-activated K⁺ current in isolated adult rat atrial myocytes. Am J. Physiol Heart Circ Physiol 260, 29: H1236-H1247

Braun A.P., Fedida D., Clark R.B., Giles W.R. (1990) Intracellular mechanisms for α_1 - adrenergic regulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. J Physiol (Lond) 431, 689-712

Callewaert G., Vereecke J., Carmeliet E. (1986) Existence of a calcium- dependent potassium channel in the membrane of cow cardiac Purkinje cells. Pflügers Arch 406: 424-426

Carmeliet E., Ramon J. (1980) Effect of acetylcholine on time- dependent currents in sheep cardic Purkinje fibers. Pflügers Arch 387, 217-223

CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) New Engl J Med

CAST II (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) New Engl J Med

Castle N. (1990) Bupivacaine inhibits the transient outward K^+ current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. J Parmacol Exp Ther 255,3: 1038-1046

Castle N. (1991) Selective inhibition of potassium currents in rat ventricle by clofilium and its tertiary homolog. J Pharmacol Exp Ther 257,1: 342-350

Castle N.A., Slawsky M.T. (1992) Characterization of 4-Aminopyridine- block of the transient outward K⁺- current in rat ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 264,3: 1450-1459

Catterall W.A. (1988) Structure and function of voltagesensitive ion channels. Science 242: 50-61

Cha A., Snyder G.E., Selvin P.R., Bezanilla F. (1999) Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. Nature 402: 899-813

Coulombe A., Lefevre I., Deroubaix E., Coraboeuf E. (1989) Effect of a diacetyl monoxime on transient outward current in rat ventricular myocytes. Pflügers Arch 414 (suppl.1): S173-S174

Deck K.A., Trautwein W (1964) Ionic currents in cardiac excitation. Pflügers Arch 280, 63-80

Delpon E., Tamargo J., Sanchez- Chapula J. (1992) Effects of Imipramine on the transient outward current in rabbit atrial single cells. Br J Pharmacol 106, 464-469

Duan D.Y., Fermini B., Nattel S (1992) Sustained outward current after i_{to1} inactivation in rabbit is a novel Cl⁻ current. Am J Physiol 263,32: H1967-1971

Dudel J., Peper K., Rüdel R., Trautwein W. (1967) The dynamic chloride component of membrane current in Purkinje fibers. Pflügers Arch 295, 197-212

Dukes I.D, Morad M. (1989) Tedisamil inactivates the transient outward K⁺- current in rat ventricular myocytes. Am J Physiol 257,26: H1746-H1749

Dukes I.D, Morad M. (1991) The transient K^+ current in rat ventricular myocytes: Evaluation of its Ca²⁺ and Na²⁺-dependence. J.Physiol.435: 395-420

Ertl R., Jahnel U., Nawrath H., Carmeliet E., Vereecke J. (1991) differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and ventricular heart preparations from rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 344: 574-581

Escande D., Loisance D., Planche C., Coraboeuf E. (1985) Agerelated changes in action potential plateau shape in isolated human atrial fibers. Am J Physiol 252, H142-148

Escande D, Coulombe A., Faivre J-F., Deroubaix E., Coraboeuf E.(1987) Two types of transient outward current in adult human atrial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 252, 21: H142-H148

Fedida D., Shimoni Y., Giles W.R. (1989) A novel effect of norepinephrine on cardiac cells is mediated by α_1- adrenoceptors. Am J Physiol 256, 25: H1500- H1504

Fedida D., Shimoni Y., Giles W.R. (1990) α - adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. J Physiol (Lond) 423, 257-277

Fedida D., Giles W. (1991) Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. J Physiol 442, 191-209

Fermini B., Wang Z., Duan D., Nattel S. (1992) differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. Am J Physiol 263, H1747-H1754

Furukawa T., Myerburg R.J., Furukawa N., Bassett A.L., Kimura S. (1990) Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. Circ Res 67, 1287-1291

Kilborn M.J., Fedida D. (1990) A study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. J Physiol (Lond) 430, 37-60

Giles W.R., van Ginneken A.C.G. (1985) A transient outward current in isolated cells from the crista terminalis of rabbit heart. J Physiol (Lond) 368: 243-264

Giles W.R., Imaizumi Y. (1988) Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. J Physiol (Lond) 405: 123-145

Glauner K.S., Mannazzu L.M., Gandhi C.S. Isacoff E.Y. (1999) Spectroscopy mapping of voltage sensor movement in the *Shaker* potassioum channel. Nature 402: 813-814

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981) Improved patch clamp techniques for high-resolution

Hiraoka M., Kawano S. (1989) Calcium- sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. Journal of Physiology 410, 187-212

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952) A quantitative description of membrane currrent and ist application to conduction and excitation in nerve. J.Physiol. Lond. 117, 500-544

Hume J.R., Uehara A., Hadley R.W., Harvey R.D. (1990) Comparison of K^+ - channels in mammalian atrial and ventricular myocytes. Prog Clin Biol Res 334: 17-42

Imaizumi Y., Giles W.R. (1987) Quinidine- induced inhibition of transient outward current in cardiac muscle. Am J Physiol 253, H704-H708

Isenberg G., Trautwein W. (1975) Temperature dependence of outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers: Evidence for electrogenicity of active transport. Pflügers Archiv 358: 225-234

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

Jahnel U., Klemm P., Nawrath H. (1993) Different mechanism of the inhibition of the transient outward current in rat ventricular myocytes. Naunyn- Schmiedebergs Arch Pharmacol 349, 87-94

Josephson I.R., Sanchez-Chapula J., Brown A.M (1984) Early outward current in rat single ventricular cells. Circ. Res. 54, 157-162

Kenyon J.L., Gibbons W.R. (1979) 4- Aminopyridine and the early outward current in sheep cardiac Purkinje fibers. J Gen Physiol 73: 139-157

Kilborn M., Fedida D. (1990) A study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. J Physiol (Lond)

Kirsch G.E, Sykes J.S. (1987) Temperatuere- dependence of Nacurrents in rabbit and frog muscle membrane. J.Gen. Physiol. 89: 239-251

Kiyosue T. Arita M. (1989) Temperature- dependent changes in kinetics of delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular myocytes. Jap.J.Physiol. 39, suppl. 208

Kiyosue T., Arita M., Muramatsu H., Spindler A.J., Noble D. (1993) Ionic mechanisms of action potential prolongation at low temperatures in guinea- pig ventricular myocytes. J. Physiol. 468: 85-106

Kon K., Krause E., Gögelein H. (1994) Inhibition of K^+ channels by chlorpromazine in rat ventricular myocytes. J Physiol Exp Therap 271, 632-637

Langendorff O. (1885) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Arch. Gesamte Physiol. Mens. Tiere Pfluegers 61: 291-332

Leblanc N., Hume J. R. (1990) Sodium current-induced release of calcium from sarcoplasmic reticulum. Science 247: 372-376

Le Grand B., Marty Y.A., Colpert S.C., John G.W. (1995) Ketanserin inhibits the transient outward current in rabbit ventriular myocytes. J Cardiovasc Pharmacol 25, 341-344

Lefevre I.A., Coulombe A., Coraboeuf E. (1991) The calcium antagonist D600 Inhibits Calcium- independent transient outward current in isolated rat ventricular myocytes. J Physiol 432: 65-80

Lipp P, Pott L, Callewaert G., Carmeliet E (1992) Calcium transients caused by calcium entry are influenced by the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig atrial myocytes. J Physiol (Lond), 454:321-338

Maylie J., Morad M. (1984) A transient outward current related to calcium release and development of tension in elephant seal atrial fibers. J Physiol (Lond) 357, 267-292

Nakayama T., Irisawa H. (1985) Transient outward current carried by potassium and sodium in quiescent atrioventricular node cells of rabbits. J Physiol (Lond) 357: 267-292

Nakayama T., Fozzard H.A. (1988) Adrenergic modulation of the transient outward current in isolated canine Purkinje cells. Circ Res 62: 162-172

Ng Y. C., Hume J.R., Akera T. (1987) Paradoxical positive inotropic effect of K^+ in the rat heart

Ogbaghebriel A., Shrier A. (1994) Inhibition of metabolism abolishes transient outward current in rabbit atrial myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 266, 35: H182-H190

Peeters G.A., Sanguinetti M.C., Eki Y., Konarzewska H., Renlund D.G., Karwande S.V., Barry W.H. (1995) Method for isolation of human vetricular myocytes from single endocardial and epicardial biopsies. Am J Physiol 268, H37: H1757-H1764

Pongs O. Structural basis of voltage-gated K⁺ hannels (1992) De Pont, in "Molecular Aspects of Transport Proteins", Elsevier Scientific Publishers

Ravens U., Wang X.L., Wettwer E. (1989) Alpha adrenoceptor atimulation reduces outward currents in rat ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 250,1: 364-370

Rensma P.L., Allessie M.A., Lammeas W.J.E.P., Bonke F.I., Schalij M.J. (1988) Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. Circ Res 62: 395-410

Roden M.R., Hoffman B.F. (1985) Action potential prolongation and induction of abnormal automaticity by low quinidine concentrations in canine Purkinje fibers. Circ Res 56: 857-867

Rüegg J.C. (1988) in: "Calcium in Muscle activation", Springer Verlag

Sanguinetti M.C., Jurkiewicz N.K. (1990) Two components of cardiac delayed outward rectifier K^+ - current. J Gen Physiol 96: 195-215

Shibata E.F., Drury T., Refsum H., Aldrete V., Giles W. (1989) Contribution of a transient outward current to repolarization in human atrium. Am J. Physiol. 257, H1773-H1781

Siegelbaum S.A., Tsien R.W. (1980)Calcium- activated transient outward current in calf cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 299: 485-506

Simurda J., Simurdova M., Cupera P. (1988) 4-Aminopyridine sensitive transient outward current in dog ventricular fibres. Pflügers Arch 411:442-449

Spray D.C., White R.L., Mazet F., Bennett M.V.L. (1985) Regulation of gap junctional conductance. Am J Physiol Heart Circ Physiol 248: H753-H764)

Su M.J., Chang G.J., Kuo S.C. (1993) Mechanical and electrophysiologic studies on the positive inotropic effect 2-phenyl-4-oxo-hydroquinoline in rat cardiac muscle. Br.J.Pharmacol. 110: 310-316

Sugiura H., Toyama S., Tsuboi N., Kamiya K., Kodama I. (1990) ATP directly affects junctional conductance between paired ventricular myocytes isolated from guinea pig heart. Circ Res 66: 1095-1102

Tohse N (1990) Calcium-sensitive delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 258: 1200-1206

Tohse N., Nakaya H., Hattori Y., Endo M., Kanno M. (1990) Inhibitory effects mediated by \acute{O}_1 - adrenoceptors on transient outward current in isolated rat ventricular cells. Pflügers Arch 415: 575-581

Vaughan-Williams E.F. (1975) Classification of antidysrhythmic drugs. Pharmacol. Ther. B.1:115-138

Varró A., Nánási P.P., Lathrop D.A. (1993) Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. Acta Physiol Scand 149, 133-142

Weis T., Berger F., Borchard U. (1993a) Effects of the new Kchannel blocker bertosamil on ionic currents in rat ventricular myocytes. Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl) 347: R80

Weis T., Berger F., Borchard U. (1993b) A slowly inactivating transient outward current in rat ventricular myocytes. Pflügers Arch 425: 184-186

Weis T., Berger F., Borchard U. (1995a) Pharmacological differentiation between fastly and slowly inactivating transient outward current in rat ventricular myocytes. Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol (Suppl) 351: R400

Wettwer W., Amos G.J., Posival H., Ravens U. (1994) transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. Circ Res 75: 473-482

White R.L., Doeller J.E., Verselis V.K., Wittenberg B.A. (1990) Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H^+ and Ca⁺⁺. J Gen Physiol 95: 1061-1075

Xu X., Best P.M. (1991) Decreased transient outward K⁺ current in ventricular myocytes from acromegalic rats. Am J Physiol 260, 29: H935-942

Zang Z.H., Boutjdir M., El-Sherif N. (1994) Ketanserin inhibits depolarization- activated outward current in rat ventricular myocytes.

Wang Z., Fermini B., Feng J., Nattel S. (1995) Role of chloride currents in repolarizing rabbit atrial myocytes. Am J. Physiol 268: H1992-H2002 Lebenslauf:

Tanja Maria Weis, geb. am 28.2.1958 in Duisburg, als Tochter von Waltraud Weis, geb. Forstmann und Horst-Günther Weis.

Besuch einer Volksschule und eines Gymnasiums von 1964 bis 1977 bis zum Abitur. Studium der Biologie von 1980/81 bis 1988 mit Abschluß Diplom am Zoologischen Institut der Universität Düsseldorf. 1988 bis 1995 Wiss. Hilfskraft und Wiss. Mitarbeiterin am Inst. für Pharmakologie der Universität Düsseldorf.