

**Elektrophysiologische Eigenschaften und Modulation
hyperpolarisationsaktivierter Ionenkanäle
im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ednan Gerard
aus Köln

Düsseldorf 2003

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

Referent(in): Prof. Dr. W.-R. Schlue

Korreferent(in): Prof. Dr. H. L. Haas

Tag(e) der mündlichen Prüfung: 12. 05. 2003

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	I _h -Kanäle: Entdeckung, Vorkommen, Nomenklatur	5
1.2	Schaltverhalten	6
1.3	Ionenselektivität	7
1.4	Molekularer Bau	8
1.5	Pharmakologie	9
1.6	Regulation	10
1.7	Physiologische Rolle	12
1.7.1	Ruhepotential und Erregbarkeit	12
1.7.2	Rhythmogenese	13
1.8	I _h -Kanäle bei Blutegel-Neuronen	14
1.9	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Bau des Blutegel-Zentralnervensystems	16
2.2	Präparation	17
2.3	Current-Clamp-Technik und Voltage-Clamp-Technik	18
2.4	Meßapparatur	20
2.5	Glasmikroelektroden	21
2.6	Identifizierung der Neuronen	22
2.7	Experimentelles Vorgehen und Auswertung	23
2.8	Berechnung der Ionenselektivität	25
2.9	Lösungen	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Voltage-Sag	29
3.2	Strom-Spannungskennlinie des I _h -Stroms	29
3.3	Aktivierungskinetik des I _h -Stroms	31
3.4	Aktivität der I _h -Kanäle	32
3.5	Umkehrpotential des I _h -Stroms	33

3.6	Ionenselektivität unter physiologischen Bedingungen.....	34
3.7	I_h -Strom in Na^+ -freier Lösung.....	36
3.8	Effekt des extrazellulären K^+ auf den I_h -Strom	37
3.9	Hemmung des I_h -Stroms durch extrazelluläres Cs^+	38
3.10	Wirkung von cAMP auf die Aktivierung des I_h -Stroms	39
3.11	Wirkung von Koffein auf den I_h -Strom.....	40
3.12	I_h -Strom nach Austausch des extrazellulären Na^+ gegen Li^+	41
3.13	Wirkung des extrazellulären pH-Wertes auf den I_h -Strom	42
3.14	Experimente zur physiologischen Bedeutung der I_h -Kanäle	43
3.14.1	Einfluß der I_h -Kanäle auf die Nachhyperpolarisation.....	43
3.14.2	Erregbarkeit von P-Neuronen mit und ohne aktivierte I_h -Kanäle	44
4	Diskussion	46
4.1	Wirkung des I_h -Stroms auf das Membranpotential.....	46
4.2	Aktivierung des I_h -Stroms	47
4.3	Blockierbarkeit des I_h -Stroms	49
4.4	Einfluß der permeierenden Ionen auf die Leitfähigkeit der I_h -Kanäle	50
4.5	Modulation der I_h -Kanäle	52
4.5.1	Zyklische Nukleotide	52
4.5.2	Koffein.....	53
4.5.3	Einfluß des extrazellulären pH-Wertes	54
4.6	Physiologische Bedeutung der I_h -Kanäle	54
4.7	Abschließende Betrachtungen.....	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis.....	60
7	Abbildungen.....	72

1 Einleitung

1.1 I_h -Kanäle: Entdeckung, Vorkommen, Nomenklatur

1961 beschrieben Araki und Mitarbeiter bei Motoneuronen von Katzen eine Abweichung vom linearen Verlauf der Strom-Spannungs-Beziehung bei einer experimentell induzierten Membranhyperpolarisation: Zu Beginn des hyperpolarisierenden Stroms stieg die Membranhyperpolarisation zunächst an, nahm dann jedoch langsam wieder ab und erreichte schließlich einen stationären Wert (Araki et al. 1961, Ito & Oshima 1962). Dieses Phänomen wurde als 'voltage sag', später auch als 'depolarizing sag' bezeichnet (sag = Absacken). Einige Jahre später beschrieben Fain und Mitarbeiter (1978) bei Wirbeltier-Photorezeptoren zum ersten Mal den dem Voltage-Sag zugrunde liegenden Membranstrom als einen Cs^+ -abhängigen, Hyperpolarisations-aktivierten Einwärtsstrom und bezeichneten ihn deshalb als I_h -Strom. Etwa zeitgleich wurden bei anderen Präparaten ähnliche Ströme entdeckt, die aufgrund ihrer ungewöhnlichen Aktivierung als 'funny' (I_f) oder 'queer' (I_q) bezeichnet wurden (DiFrancesco 1981, Halliwell & Adams 1982). Geblieben sind die Bezeichnungen I_h für den Strom bei Neuronen und I_f für den Strom bei Herzmuskelzellen.

Hyperpolarisations-aktivierte Ionenströme wurden in verschiedensten Geweben einiger Tiergruppen nachgewiesen (Pape 1996), bei Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Janigro et al. 1994), Herzmuskelzellen und glatter Muskulatur von Säugern (DiFrancesco 1993, Siegenbeck van Heukelom 1991), Riechrezeptoren des Hummers (Corotto & Michel 1994), Spermien des Seeigels (Gauß et al. 1998) sowie bei Speicheldrüsen (Wuttke & Berry 1992), Herz-Interneuronen (Angstadt & Calabrese 1989) und Retzius-Neuronen des Blutegels (Angstadt 1999). Die I_h -Kanäle verschiedenster Zelltypen und Tierarten weisen Gemeinsamkeiten auf hinsichtlich

ihrer biophysikalischen Eigenschaften, ihrer Pharmakologie und der Modulierbarkeit durch sekundäre Botenstoffe. Die bisher bekannten Aminosäuresequenzen der Kanalproteine und die daraus abgeleitete Membrantopologie zeigen die Verwandtschaft der I_h -Kanäle mit spannungsabhängigen K^+ -Kanälen und durch zyklische Nukleotide aktivierbaren unselektiven Kationenkanälen (Gauss et al. 1998, Ludwig et al. 1998, Santoro et al. 1998). Aus diesem Grund werden I_h -Kanäle mittlerweile auch als HCN-Kanäle bezeichnet ('hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated'; Ludwig et al. 1999). Bei Vertebraten sind bisher vier Mitglieder der HCN-Genfamilie bekannt: HCN1-4, die sich in ihrer Aktivierungskinetik und der Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide unterscheiden. Bei Invertebraten wurden bisher identifiziert: SpHCN in den Spermien des Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus*), HvHCN in den Antennen des Seidenspinners (*Heliothis virescens*) und DmHCN in den Antennen und Augen von *Drosophila melanogaster* (Kaupp & Seifert 2001).

1.2 Schaltverhalten

I_h -Kanäle öffnen sich bei Membranpotentialen zwischen -45 und -70 mV, sind bei -75 bis -100 mV halbmaximal und bei -100 bis -150 mV maximal aktiviert. I_h -Kanäle zeigen bei einem gegebenen Membranpotential keinerlei Inaktivierung und sind somit tonisch aktiv. Im Unterschied zu den meisten anderen spannungsaktivierten Ionenkanälen besitzen I_h -Kanäle eine langsame Aktivierungskinetik, die von Zelltyp zu Zelltyp stark variieren kann ($\tau = 50 \text{ ms} - 30 \text{ s}$). Der Grund für die langsame Aktivierung der I_h -Kanäle ist unklar. Möglicherweise existieren mehrere Geschlossen Zustände, die erst durchlaufen werden müssen, bevor sich die Kanäle öffnen (DiFrancesco 1981, Pape 1996). Einige Zelltypen scheinen jedoch auch I_h -Kanäle zu exprimieren, die sehr schnell aktiviert werden ($\tau = 10 - 100 \mu\text{s}$; Solomon et

al. 1993). Die Aktivierungskinetik ist spannungsabhängig, d. h. bei stärkerer Hyperpolarisation aktivieren die Kanäle schneller (Bayliss et al. 1994). Die Strom-Spannungsbeziehung der I_h -Kanäle ist linear. Die Leitfähigkeit einzelner I_h -Kanäle wurde bisher nur bei Schrittmacher-Zellen des Sinusknotens ermittelt. An Hand einer Rauschanalyse wurde die Einzelkanal-Leitfähigkeit zu etwa 1 pS bestimmt (DiFrancesco 1986).

1.3 Ionenselektivität

I_h -Kanäle sind für Alkaliionen permeabel, wobei die Permeabilität für K^+ zwei- bis fünffach höher ist als die für Na^+ (Edman et al. 1987). Entsprechend liegt unter physiologischen Verhältnissen das Umkehrpotential des I_h -Stroms zwischen -20 und -50 mV. Interessanterweise können I_h -Kanäle im Unterschied zu anderen Kationenkanälen Na^+ von Li^+ 'unterscheiden' (Ho et al. 1994). In den Photorezeptoren des Tigersalamanders wurde folgende Permeabilitätssequenz gefunden: $Tl^+ > K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ (Wollmuth & Hille 1992). Die I_h -Kanäle dieser Zellen sind für NH_4^+ ebenfalls gut permeabel, für Hydrazonium und Methylammonium dagegen nur wenig. Für organische Kationen wie Cholin, Tris und größere Amine wie Ethylammonium sind I_h -Kanäle nahezu impermeabel. Der Porendurchmesser der I_h -Kanäle wurde aufgrund dieser Daten zu 4,0 bis 4,6 Å abgeschätzt.

Der K^+ -Anteil am I_h -Strom sollte unter physiologischen Bedingungen trotz der hohen K^+ -Permeabilität der I_h -Kanäle gering sein, da die Kanalaktivierung nahe beim K^+ -Gleichgewichtspotential erfolgt. Der I_h -Strom wird hauptsächlich durch Na^+ getragen. Extrazelluläres K^+ ist jedoch notwendig, damit überhaupt Strom durch den Kanal fließen kann. Die I_h -Kanäle besitzen möglicherweise auf der extrazellulären Membranseite eine modulierende Bindestelle für K^+ (DiFrancesco 1982). Die

Stromamplitude nimmt mit der extrazellulären K^+ -Konzentration zu und bei Neuronen im visuellen Cortex der Ratte wurde Proportionalität zu $\sqrt{[K^+]_e}$ ermittelt (Solomon & Nerbonne 1993).

Darüber hinaus ist die Aktivität der I_h -Kanäle von der Gegenwart kleiner Anionen im Extrazellulärraum abhängig. Wird das extrazelluläre Cl^- durch große Anionen ersetzt, wie beispielsweise Methylsulfat, Isothionat oder Gluconat, so sinkt die Amplitude des I_h -Stroms um bis zu 40% (Kilb & Luhmann 2000), während der Ersatz durch kleine Anionen wie Iodid oder Nitrat auf den I_h -Strom keine Wirkung ausübt (Kamondi & Reiner 1991). Da die Leitfähigkeit der I_h -Kanäle mit der extrazellulären Cl^- -Konzentration kontinuierlich ansteigt und schließlich einen Sättigungswert erreicht, ist wahrscheinlich, daß die I_h -Kanäle durch extrazelluläres Cl^- oder andere kleine Anionen aktiviert und nicht durch große Anionen gehemmt werden (Frace et al. 1992, Kilb & Luhmann 2000).

1.4 Molekularer Bau

Eine Untereinheit der I_h -Kanäle enthält sechs transmembranale Segmente (S1 - S6), wobei das N- und C-terminale Ende in das Cytosol weisen. Das Segment S4 zeigt eine typische Sequenz von Aminosäuren mit positiven Seitengruppen und dient wahrscheinlich als Spannungssensor. Eine Poren-bildende Schleife (P-loop) mit dem für K^+ -Kanäle charakteristischen GYG-Motiv befindet sich zwischen S5 und S6. Andere für den P-loop von K^+ -Kanälen typische Aminosäure-Sequenzen fehlen jedoch, wodurch die vergleichsweise geringe K^+ -Selektivität der I_h -Kanäle erklärt werden könnte. In der Nähe des C-terminalen Endes liegt eine Aminosäuresequenz, die mit Sequenzen von Bindestellen für zyklische Nukleotide (CNB-Domäne) homolog ist, wie sie bei durch zyklische Nukleotide aktivierten Kinasen (PKA, PKG) und zyklisch-

Nukleotid-gesteuerten Kationenkanälen gefunden wurden. Wahrscheinlich sind wie bei spannungsabhängigen K^+ -Kanälen vier Untereinheiten notwendig, um einen funktionellen Kanal zu bilden. Die bei zentralen Vertebratenneuronen gefundenen Untereinheiten HCN1-4 zeigen bei Expression in *Xenopus*-Oozyten alle für I_h -Kanäle typischen Eigenschaften, allerdings mit stark unterschiedlichen Zeitkonstanten und veränderter Abhängigkeit von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP; Kaupp & Seifert 2001). Die verschiedenen Untereinheiten lassen sich in unterschiedlichen Kombinationen co-exprimieren. Unklar ist allerdings, ob I_h -Kanäle *in situ* aus identischen oder verschiedenen Untereinheiten bestehen.

1.5 Pharmakologie

Die Einwärtsströme durch I_h -Kanäle werden durch Cs^+ -Ionen selektiv gehemmt, trotz einer gewissen Leitfähigkeit für Cs^+ (siehe oben), während Auswärtsströme unbeeinflusst bleiben oder sogar verstärkt werden (DiFrancesco 1982). Die halbmaximale Wirkung liegt bei Cs^+ -Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 mM. Dabei wirkt Cs^+ nur bei Applikation auf der extrazellulären Membranseite, so daß die Cs^+ -Bindestelle innerhalb der Kanalpore in Nähe der Außenseite des Kanals liegen sollte (Barnes & Hille 1989). Rb^+ -Ionen hemmen I_h -Kanäle ebenfalls, allerdings wesentlich schwächer als Cs^+ (DiFrancesco 1982). Mn^{2+} -Ionen verschieben die Aktivierungskurve in positive Richtung (= Aktivierung), während Ba^{2+} -Ionen eine Verschiebung in negative Richtung bewirken (= Hemmung; DiFrancesco et al. 1991). K^+ -Kanalblocker wie TEA (Solomon & Nerbonne 1993) oder 4-Aminopyridin (4-AP; Dekin 1993) haben bei Applikation auf der extrazellulären Membranseite keine Wirkung auf den I_h -Strom, dagegen führt die Injektion von TEA zu dessen vollständiger Hemmung (Budde et al. 1994). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die innere Öffnung der I_h -Kanäle ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweist wie diejenige spannungsabhängiger K^+ -

Kanäle. Der bradycarde Wirkstoff ZD7288 hemmt bei Vertebraten in submillimolaren Konzentrationen selektiv I_h -Ströme (BoSmith et al. 1993, Pape 1994). Die Hemmung erfolgt bei intrazellulärer Applikation innerhalb von wenigen Sekunden und ist auch innerhalb kürzester Zeit vollständig reversibel (Shin et al. 2001). Die Hemmung erfordert die Öffnung der Kanäle, so daß die ZD7288-Bindestelle vermutlich in der Kanalpore liegt. Die ZD7288-Wirkung setzt bei extrazellulärer Applikation erst nach einigen Minuten ein (siehe Gasparini & DiFrancesco 1997).

Die I_h -Kanäle lassen sich experimentell durch eine durch Strominjektion induzierte Hyperpolarisation öffnen. Mit zunehmender Aktivierung wird der einwärts gerichtete I_h -Strom immer stärker, wodurch die Hyperpolarisation kontinuierlich abnimmt (Voltage-Sag). Nach Abschalten des hyperpolarisierenden Stroms tritt eine transiente Depolarisation auf, da die I_h -Kanäle relativ langsam deaktivieren und der I_h -Strom immer noch einwärts gerichtet ist (Bayliss et al. 1994). Sowohl der Voltage-Sag als auch die transiente Depolarisation lassen sich durch geringe Cs^+ -Konzentrationen hemmen. Im Zusammenspiel mit T-Typ Ca^{2+} -Kanälen (T = transient, auch tiny), die bereits bei geringer Membrandepolarisation aktiviert werden ('low voltage-activated') und rasch inaktivieren, können durch die transiente Depolarisation bei erregbaren Zellen Aktionspotentiale ausgelöst werden (Akasu et al. 1993).

1.6 Regulation

Die Aktivität vieler I_h -Kanäle wird durch cAMP (DiFrancesco 1985) oder zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP; Chen 1997) moduliert. Verschiedene Neurotransmitter, welche die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, beispielsweise durch Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren oder Serotonin-Rezeptoren, verschieben die Aktivierungskurve der I_h -Kanäle um bis zu +10 mV in positive

Richtung. Dieser Effekt lässt sich auch mit Hydrolyse-resistenten cAMP-Analoga wie 8-Bromo-cAMP erreichen, ebenso wie durch Aktivierung der Adenylatcyclase durch Forskolin oder Hemmung von Phosphodiesterasen (PDE) mittels 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX; Bobker & Williams 1989). Umgekehrt verschieben Neurotransmitter, welche die cAMP-Konzentration vermindern, die I_h -Aktivierungskurve um bis zu -10 mV in negative Richtung (Pape 1996). Die Aktivierung durch cAMP erfolgt in den meisten Fällen durch direkte Bindung an den Kanal. Allerdings wurde bei Purkinje-Zellen im Kleinhirn auch eine durch cAMP induzierte Phosphorylierung der I_h -Kanäle gefunden (Chang et al. 1991).

Ähnliche Effekte wie durch cAMP lassen sich durch Erhöhung der cGMP-Konzentration erzielen, beispielsweise durch Applikation von cGMP-Analoga (Pape et al. 1994). Allerdings ist die Affinität der I_h -Kanäle für cGMP meist wesentlich geringer als für cAMP (Kaupp & Seifert 2001). Auch die Applikation von Stickstoffmonoxid (NO; Dawson & Snyder 1994) zeigt ähnliche Wirkung auf den I_h -Strom wie die Applikation von cGMP. NO führt vielfach zur Aktivierung von Guanylatcyclasen und damit zur Produktion von cGMP. In Herzmuskelzellen erfolgt die Modulation des I_h - bzw. I_f -Kanals primär durch cGMP (DiFrancesco & Tortora 1991).

In den Schrittmacher-Zellen des Sinusknotens wird die Aktivität der I_h -Kanäle wahrscheinlich direkt durch trimere G-Proteine moduliert, wobei sowohl Verstärkung (G_s) als auch Abschwächung des Stroms auftreten kann ($G_{0,i}$; Yatani et al. 1990). Bei Neuronen ist eine direkte Beeinflussung von I_h -Kanälen durch G-Proteine eher unwahrscheinlich (Pape 1996).

1.7 Physiologische Rolle

1.7.1 Ruhepotential und Erregbarkeit

Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß I_h -Kanäle auch im Ruhezustand der Zellen aktiv sind und zur Ionenselektivität der Plasmamembran und zum Membranruhepotential beitragen. Bei CA1-Pyramidenzellen im Rattenhippocampus führte die Hemmung der I_h -Kanäle durch Cs^+ -Ionen zu einer Erhöhung des Eingangswiderstands um bis zu 30% und zu einer Hyperpolarisation geringer Amplitude (Maccaferri et al. 1993). Die depolarisierende Wirkung der I_h -Kanäle wurde auch in Untersuchungen an Neuronen-Populationen deutlich, bei denen einige Zellen den I_h -Strom aufwiesen, andere Neuronen dagegen nicht. Neuronen ohne I_h -Strom wiesen ein Membranruhepotential auf, das wesentlich negativer war als das der Neuronen mit I_h -Strom (Womble & Moises 1993, Larkman & Kelly 1992).

Eine lineare Strom-Spannungsbeziehung in der Umgebung des Membranruhepotentials, wie sie bei vielen Neuronen gemessen wurde, spiegelt nicht zwangsläufig passive, spannungsunabhängige Membraneigenschaften wider, sondern könnte auch auf dem engen Zusammenspiel verschiedener spannungsabhängiger Ionenkanäle beruhen (Mayer & Westbrook 1983). Bei einer Membrandepolarisation können sich spannungsabhängige Na^+ - und K^+ -Kanäle öffnen, gleichzeitig jedoch I_h -Kanäle schließen, so daß der Eingangswiderstand annähernd konstant bleibt. Bei einer Hyperpolarisation wäre es dann genau umgekehrt: I_h -Kanäle werden geöffnet, und wirken dem gleichzeitigen Schließen spannungsabhängiger Na^+ - und K^+ -Kanäle entgegen. Bei Pyramidenzellen in der Amygdala ist der Eingangswiderstand in Nähe des Membranruhepotentials am größten und nimmt sowohl bei Hyperpolarisation als auch bei Depolarisation ab (Rainnie et al. 1991). Dadurch wirken spannungsabhängige K^+ -Kanäle und I_h -Kanäle langsamen Membranpotential-Fluktuationen entgegen (Edman et al. 1987, 1992).

Durch Aktivierung der I_h -Kanäle wird das Membranpotential in Richtung der Feuerschwelle für Aktionspotentiale verschoben und die Erregbarkeit gesteigert. Weiterhin können I_h -Kanäle die Hyperpolarisation nach einem Aktionspotential verkürzen und die Frequenz der Aktionspotential-Bildung steigern (Maccafferi et al. 1993). Ob die Aktivierung der I_h -Kanäle während der Nachhyperpolarisation zu einem physiologisch bedeutendem Effekt führt, ist wegen der geringen Aktivierungsgeschwindigkeit fraglich.

1.7.2 Rhythmogenese

Da sie durch Hyperpolarisation aktiviert werden, können I_h -Kanäle gemeinsam mit T-Typ Ca^{2+} -Kanälen an Membranpotential-Oszillationen mit einer Frequenz von 6 bis 10 Hz beteiligt sein, (Campbell et al. 1992). Während einer Depolarisationsphase mit Aktionspotential-Salven deaktivieren die I_h -Kanäle, wodurch das Membranpotential in hyperpolarisierende Richtung verschoben wird. Durch die Hyperpolarisation, die bei manchen Zellen durch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle verstärkt werden kann, werden die I_h -Kanäle erneut aktiviert und induzieren eine langsame, bis in den Aktivierungsbereich der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle reichende Depolarisation. Der durch die T-Typ-Kanäle getragene Ca^{2+} -Einstrom depolarisiert die Zelle weiter bis in den Aktivierungsbereich der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle und der Zyklus beginnt erneut (Alonso & Llinás 1989, McCormick & Pape 1990). Die Beteiligung der I_h -Kanäle an diesen Membranpotential-Oszillationen wird durch deren Sensitivität gegenüber extrazellulärem Cs^+ deutlich, da Cs^+ -Zugabe die Oszillationen hemmt. Die Membranpotential-Oszillationen können durch ein Modell erklärt werden, welches das Zusammenspiel von I_h -Kanälen, T-Typ Ca^{2+} -Kanälen und Leckstrom beschreibt (Destexhe et al. 1993). I_h -Kanäle können auch an der Rhythmogenese in Netzwerken von erregenden und hemmenden Neuronen beteiligt sein, ohne daß die einzelnen

Neuronen des Netzwerks eigenständig Membranpotential-Oszillationen zeigen (Kopell & LeMasson 1994). Ein Beispiel hierfür sind die langsamen Membranpotential-Oszillationen bei den Herzschlag-kontrollierenden Interneuronen des Blutegels (Angstadt & Calabrese 1989).

1.8 I_h-Kanäle bei Blutegel-Neuronen

Beim Blutegel wurden I_h-Kanäle bisher in Speicheldrüsenzellen (Wuttke & Berry 1992), bei Herz-Interneuronen (Angstadt & Calabrese 1989) und bei Retzius-Neuronen nachgewiesen (Angstadt 1999). Möglicherweise kommen I_h-Kanäle auch bei anderen Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems vor, vielleicht sogar in Neurogliazellen.

1.9 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften der I_h-Kanäle und die Zusammensetzung der durch sie vermittelten Membranströme bei identifizierten Blutegel-Neuronen charakterisiert. Verschiedene Neuronen wurden auf das Vorhandensein von I_h-Strömen hin untersucht, wobei sich zeigte, daß die Expression der Kanäle bei den einzelnen Neuronen sehr unterschiedlich ist. Die genaue funktionelle Charakterisierung der I_h-Kanäle wurde hauptsächlich an P-Neuronen durchgeführt, da sie für Messungen mit zwei Glasmikroelektroden gut zugänglich sind und einen besonders stark ausgeprägten I_h-Strom aufweisen. Besonders eingehend wurden Aktivierungskinetik, Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung und Hemmbarkeit durch nichtpermeable Kationen und einige Pharmaka analysiert. Darüber

hinaus wurde der Einfluß der I_h -Kanäle auf die Erregbarkeit der P-Neuronen und den Zeitverlauf der Aktionspotentiale untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Bau des Blutegel-Zentralnervensystems

Der metamer gebaute Körper des medizinischen Blutegels, *Hirudo medicinalis* (*Hirudinea*, *Clitellata*, *Annelida*), besteht aus 32 Segmenten. Das Zentralnervensystem (ZNS) des Blutegels ist segmentiert aufgebaut. Die Ganglien der vier anterioren Segmente sind zum Cerebralganglion (Unterschlundganglion) und die der sieben posterioren Segmente zum Analganglion verschmolzen. Die zwischen Cerebral- und Analganglion liegenden 21 Segmentalganglien sind nicht paarig angelegt, sondern unter Reduktion der Kommissuren jeweils zu einem einzelnen Ganglion verschmolzen (siehe Abb. 1).

Die Segmentalganglien sind miteinander durch Konnektive verbunden, die aus zwei lateral verlaufenden Konnektivsträngen und einer medianen Faser bestehen, dem Faivre'schen Nerv oder Mediannerv. Über jeweils zwei seitlich aus den Segmentalganglien abzweigende Nervenstränge, den anterioren und posterioren Seitenwurzeln, werden der Hautmuskelschlauch und die inneren Organe innerviert. Die gesamte Ganglienkette ist vom ventralen Blutsinus umgeben (siehe Muller et al. 1981).

Die Segmentalganglien sind von einer äußeren Bindegewebskapsel umhüllt, unter der die Zellkörper von etwa 400 unipolaren Neuronen liegen (Abb. 1; Macagno 1980). Die meisten Neuronenzellkörper befinden sich auf der ventralen Seite des Segmentalganglions, auch die in dieser Arbeit überwiegend untersuchten mechanosensitiven P-Neuronen. Die Somata der Neuronen sind in sechs, durch Bindegewebslamellen getrennte Pakete angeordnet (jeweils 50-80 Neuronen), in denen sie von den Ausläufern jeweils einer Paketgliazelle umgeben sind. Die Neuronen, die häufig an Hand der Lage und Größe des Zellsomas sowie ihrer elektrophysiologischen

Eigenschaften eindeutig identifiziert werden können, entsenden Ausläufer durch die innere Bindegewebskapsel in das Neuropil, wo sich die Ausläufer stark verzweigen und synaptische Kontakte mit den Ausläufern anderer Neuronen bilden. Darüber hinaus ziehen bei vielen Neuronen Ausläufer über die Konnektive oder den Faivre'schen Nerv zu den Nachbarganglien und/oder über die Seitenwurzeln in die Peripherie.

Mit Ausnahme der Ganglien 5 und 6 sind die Segmentalganglien weitgehend stereotyp aufgebaut. Die Segmentalganglien 5 und 6 innervieren die Geschlechtsorgane ('Geschlechtsganglien') und enthalten mit etwa 700 Neuronen fast doppelt so viele Neuronen wie die übrigen Segmentalganglien (Macagno 1980).

2.2 Präparation

Die Experimente wurden überwiegend an P-Neuronen isolierter Segmentalganglien durchgeführt, wobei die Geschlechtsganglien nicht verwendet wurden. Die Ganglien wurden ausschließlich adulten Tieren entnommen, die vom Versuchstierhandel Zaug GmbH (Bibertal) bzw. Moser (Schorndorf) bezogen wurden.

Die Präparation der Segmentalganglien wurde nach dem Protokoll von Deitmer und Schlue (1981) durchgeführt. Der Blutegel wurde mit Stecknadeln an beiden Saugnäpfen mit der Ventralseite nach unten in einer Präparierschale fixiert und dabei leicht gestreckt. Anschließend wurde der Hautmuskelschlauch unmittelbar hinter dem vorderen Saugnapf quer zur Längsachse tief eingeschnitten. Von diesem Einschnitt aus wurden der Hautmuskelschlauch und die dorsale Wand der vorderen Darmabschnitte entlang der Medianlinie nach posteriorwärts aufgeschnitten. Der Hautmuskelschlauch wurde vorsichtig auseinandergezogen und mit Nadeln seitlich festgesteckt. Der nun

freiliegende Magen-Darm-Trakt wurde mit Normalsalzlösung (NSL, siehe Tabelle 1) wiederholt ausgespült, um eventuell vorhandenes Blut sowie Verdauungsenzyme auszuwaschen. Danach wurde unter einer Stereolupe (M3Z, Wild, Herbrugg, Schweiz) der Darmboden abpräpariert und der ventrale Blutsinus freigelegt. Der Blutsinus wurde oberhalb der Segmentalganglien mit einer feinen Pinzette angehoben und mit einer Iridektomieschere aufgeschnitten. Nach Durchtrennen der Seitenwurzeln und Konnektive etwa einen Millimeter vom Segmentalganglion entfernt wurden die Ganglien aus dem Blutsinus vorsichtig herausgezogen, in ein Blockschälchen mit NSL überführt, abgedeckt und bis zur Messung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um Austrocknen zu vermeiden, wurde das Präparat während der letzten Präparationsschritte wiederholt mit NSL überschichtet.

2.3 Current-Clamp-Technik und Voltage-Clamp-Technik

In dieser Arbeit wurden die durch I_h -Kanäle vermittelten Membranströme mit Hilfe von zwei Methoden untersucht, der Current-Clamp-Technik und der Voltage-Clamp-Technik (Strom- bzw. Spannungsklemme). Zur Anwendung dieser Meßtechniken wurden jeweils zwei Glasmikroelektroden in eine einzelne Zelle eingestochen, eine Stromelektrode zur Strominjektion und eine Spannungsmeßelektrode zur Registrierung des Membranpotentials.

Bei der Current-Clamp-Technik werden die Auswirkungen einer Strominjektion auf das Membranpotential der Zelle bestimmt. Die Amplitude der Membranpotential-Verschiebung ist ein Maß für den Eingangswiderstand der Zelle bzw. für deren Membranleitfähigkeit. Der Eingangswiderstand ist um so höher bzw. die Membranleitfähigkeit ist um so niedriger, je größer die durch einen definierten Injektionsstrom hervorgerufene Membranpotential-Verschiebung ist. Änderungen der

Membranpotential-Verschiebung können somit Aufschluß über die Aktivierung sowie die De- bzw. Inaktivierung von Ionenkanälen geben.

Bei der Voltage-Clamp-Technik wird der Strom gemessen, der in die Zelle injiziert werden muß, um das Membranpotential auf ein vorgegebenes Haltepotential zu klemmen. Der injizierte Strom kompensiert somit den Nettostrom, der bei einem bestimmten Haltepotential über die Zellmembran fließt. Der Injektionsstrom wird über einen Rückkopplungsschaltkreis innerhalb des Verstärkers ermittelt (Abb. 2). Dabei wird das über die Spannungsmeßelektrode registrierte Membranpotential auf den invertierenden Eingang eines Differenzverstärkers, des sogenannten Klemmverstärkers gelegt, der proportional zur Differenz zwischen Membranpotential und Haltepotential Strom in die Zelle injiziert. Da das System bereits auf geringe Unterschiede zwischen Membranpotential und Haltepotential mit hoher Geschwindigkeit reagiert, wird das Membranpotential praktisch vollständig auf das Haltepotential geklemmt.

Die Voltage-Clamp-Technik kann wie die Current-Clamp-Technik Aufschluß über Aktivierung und De- bzw. Inaktivierung von Ionenkanälen liefern. Die Voltage-Clamp-Technik zeigt Polarität und Größe des über die Membran fließenden Stroms an und verhindert bei festem Membranpotential gleichzeitig die Aktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen. Darüber hinaus bietet die Voltage-Clamp-Technik die Möglichkeit, spannungsabhängige Ionenkanäle durch Membranpotential-Verstellung gezielt zu aktivieren. Mit der Current-Clamp-Technik hingegen lassen sich Änderungen des Eingangswiderstands quantitativ erfassen, doch im Unterschied zur Voltage-Clamp-Technik sind keine Aussagen über Membranströme möglich. Die funktionelle Charakterisierung der I_h -Kanäle erfolgte hauptsächlich durch die Anwendung der Voltage-Clamp-Technik.

2.4 Meßapparatur

Die Ganglien wurden in der Versuchswanne mit Hilfe von Minutien-Nadeln mit der Ventralseite nach oben festgesteckt. Das Versuchsbad wurde über eine Agarbrücke (Kunststoffschlauch, gefüllt mit 2% Agar in 3 M KCl) mit einem darin eingeschlossenen chlorierten Silberdraht geerdet. Vor dem Einstich wurden die beiden Glasmikroelektroden von oben her unter Sichtkontrolle (Stereolupe M3Z) in das Bad abgesenkt. Die Positionierung der Elektroden über der Zelle sowie der Einstich erfolgten mit Hilfe zweier Mikromanipulatoren (Leitz, Wetzlar). Der von den Glasmikroelektroden eingeschlossene Winkel betrug 60° , da in dieser Konfiguration durch Strominjektion verursachte kapazitive Störungen minimal waren (NPI-Instruments, Tamm).

Die Ganglien wurden während der Messung kontinuierlich mit NSL oder der jeweiligen Versuchslösung überspült. Die Zufuhr der Lösung erfolgte Gravitationsgetrieben über einen Windkessel, um in der Lösung vorhandene Luftblasen abzuscheiden. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/min, wodurch das Volumen der Versuchswanne (0,05 ml) ca. 100 mal pro min ausgetauscht wurde. Die Lösung wurde aus der Versuchswanne über eine Glaskapillare mit Hilfe einer Vakuum-Kolbenpumpe (HiFlo, Medcalf, Potters Bar, England) abgesaugt.

Die Spannungsmeßelektrode war an den hochohmigen Kanal ($>10^{13} \Omega$), die Stromelektrode an den niederohmigen Kanal ($\sim 10^{10} \Omega$) des Meßverstärkers angeschlossen (TEC-05L, NPI-Instruments; vom Hersteller speziell für Experimente an P-Neuronen und vergleichbaren Zellen konfiguriert). Zeitverlauf, Amplitude und Polarität der Potential-Verschiebungen (-120 bis -30 mV) wurden von einem Stimulator kontrolliert (MAX 21, Zeitz Instruments, München). Die Ausgangssignale des Verstärkers (Membranpotential und Injektionsstrom) wurden digitalisiert (Analog-Digital-Wandler, Eigenbau der Zentralwerkstatt Biologie, Universität Düsseldorf) und

über das Datenerfassungsprogramms ADAX mit einem Computer aufgenommen (E. von Berg, Institut für Neurobiologie, Universität Düsseldorf). Die Abtastfrequenz betrug 1 kHz, bei Aktionspotential-Messungen 10 kHz. Der Versuchsaufbau war in einem geerdeten Faradaykäfig untergebracht, der zur Vibrationsdämpfung auf Gummipuffern gelagert war. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (ca. 21° C) durchgeführt. Die Funktionsfähigkeit der Meßapparatur wurde mit Hilfe eines elektronischen Zellmodells regelmäßig überprüft (Abb. 3).

Bei Anwendung der Voltage-Clamp-Technik ergab sich ein technisches Problem: Bei sprunghafter Verstellung des Haltepotentials traten starke Oszillationen des Haltestroms auf, die in der Regel nach 10 bis maximal 20 ms beendet waren (Abb. 4). Die Amplitude dieser Oszillationen war um ein Vielfaches größer als der Haltestrom, der zur stabilen Klemmung des Membranpotentials auf bis zu -120 mV notwendig war. Die Oszillationen übertrugen sich zum Teil auch auf das Membranpotential. Diese Schwingungen waren jedoch wesentlich kleiner als die Oszillationen im Haltestrom. Die Oszillationen des Haltestroms erschwerten die Messung der frühen I_h -Strom-Amplitude, da in der Regel der Membranstrom kurz nach Verstellung des Haltepotentials nicht bestimmt werden konnte. In den Registrierbeispielen wurden die Oszillationen der Klarheit halber nicht wiedergegeben.

2.5 Glasmikroelektroden

Es wurden konventionelle Glasmikroelektroden verwendet, die aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament hergestellt wurden (GC 150F-15, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England; äußerer Durchmesser: 1,5 mm). Die 15 cm langen Kapillaren wurden halbiert und in einem Vertikal-Elektrodenziehgerät ausgezogen (Narishige PE-2). Die Elektroden wurden mit 0,5 M K_2SO_4 + 5 mM KCl

gefüllt. Mit 3 M KCl gefüllte Elektroden induzierten bei P-Neuronen markante, langsame Oszillationen des Membranpotentials und insbesondere des Eingangswiderstands und wurden daher nicht verwendet (siehe Gerard 1997). Nach Einführen eines chlorierten Silberdrahts wurde die hintere Öffnung der Elektrode mit Hartklebewachs (Deiberit) verschlossen. Der elektrische Widerstand der Elektroden in NSL betrug ca. 90 M Ω .

2.6 Identifizierung der Neuronen

Die P (*pressure*)-Neuronen gehören zusammen mit den N (*noxious*)- und den T (*touch*)-Neuronen zur Gruppe der mechanosensitiven Neuronen, die auf mechanische Hautreizung mit der Bildung von Aktionspotentialen antworten (siehe Muller et al. 1981). Ein Segmentalganglion enthält zwei Paare von P-Neuronen (P₁, P₂), die meist in den beiden posterior-lateralen Paketen lokalisiert sind (siehe Abb. 1). Die P-Neuronen sind auf der ventralen Seite der Ganglien gut zu erkennen und lassen sich aufgrund ihrer Größe eindeutig identifizieren, auch wenn die Lage der Zellkörper erheblich variieren kann. So liegen die P₁-Neuronen abweichend von der Karte in Abb. 1 häufig in der Nähe der AE-Neuronen im zentralen posterioren Paket und die P₂-Neuronen tauschen ihre Position gelegentlich mit den Leydig-Neuronen (auch als 50-Neuronen bezeichnet). Eine mögliche Verwechslung der P₁-Neuronen mit den AE-Neuronen bzw. der P₂-Neuronen mit den Leydig-Neuronen ist auszuschließen, da P-Neuronen im Unterschied zu diesen Zellen keine spontanen Aktionspotentiale auslösen. Allenfalls nach Einstich der Glasmikroelektroden treten, bedingt durch die Verletzung der Plasmamembran, zeitweilig kurze Salven von Aktionspotentialen auf.

Die in den beiden anterior-lateralen Paketen gelegenen Zellkörper der N-, T- und AP-Neuronen besitzen ähnliche Größe. Diese drei Zelltypen konnten an Hand ihrer

Aktionspotentialmuster eindeutig identifiziert werden. Bei N-Neuronen löste der Einstich der Glasmikroelektrode Aktionspotentiale mit sehr großer Amplitude (ca. 90 mV) und ausgeprägter Nachhyperpolarisation aus. Die Aktionspotential-Frequenz nahm dann kontinuierlich ab und nach 2 bis 3 min traten keine Aktionspotentiale mehr auf. Bei T-Neuronen traten in der Regel wie bei P-Neuronen keine Aktionspotentiale auf. AP-Neuronen zeigten regelmäßige Aktionspotentiale mit hoher Frequenz (ca. 5 Hz), geringer Amplitude (ca. 10 mV) und einem charakteristischen, 'pagodenartigen' Zeitverlauf (Sunderland 1980). Retzius-Neuronen konnten anhand ihrer Lage und der Größe ihrer Zellkörper leicht identifiziert werden.

AE-Neuronen liegen im posterior-medianen Paket direkt benachbart zu den 251-Neuronen. AE-Neuronen generieren spontan sehr kleine Aktionspotentiale (ca. 7 mV) mit einer Frequenz von ca. 10 Hz. Sie konnten von den 251-Neuronen eindeutig unterschieden werden, die etwas größere Aktionspotentiale (11 mV) mit einer wesentlich geringeren Frequenz aufweisen (2 Hz). Es ist anzumerken, daß die Aktionspotentiale im Zellsoma abgeleitet wurden. Entsprechend erlauben die angegebenen Amplituden der Aktionspotentiale keine Aussage über die Amplituden in den neuronalen Ausläufern.

2.7 Experimentelles Vorgehen und Auswertung

Nach der Positionierung der beiden Glasmikroelektroden über dem Neuronzellkörper wurde der Nullabgleich der Elektrodenpotentiale vorgenommen. Zunächst wurde die Spannungsmeßelektrode eingestochen und der Sprung des Elektrodenpotentials auf dem Oszilloskop oder auf dem Computerbildschirm verfolgt. Der Einstich der Stromelektrode in die Zelle wurde an einem kleinen, vorübergehenden Sprung im Potential der Spannungsmeßelektrode erkannt.

Bei den Current-Clamp-Experimenten wurden zunächst hyperpolarisierende Strompulse (-3 nA) appliziert und so lange gewartet, bis die dadurch induzierten Membranpotential-Verschiebungen einen konstanten Wert erreicht hatten. Aufgrund der Verletzung der Plasmamembran durch den Elektrodeneinstich war der Eingangswiderstand der Zellen zunächst erniedrigt, erkennbar an der geringen Amplitude der durch die Strompulse induzierten Potentialänderungen. Mit dem 'Einheilen' der Elektroden nahm die Amplitude der Potentialänderung und damit der Eingangswiderstand kontinuierlich über 3 bis 10 min zu. Bei den Voltage-Clamp-Messungen wurde das Membranpotential zunächst auf ein Haltepotential von -50 mV geklemmt, also etwa 5 mV negativer als das mittlere Membranruhepotential der P-Neuronen (Schlue & Deitmer 1984). Mit der Messung wurde begonnen, nachdem der kurz nach dem Einstich sehr hohe Haltestrom von bis zu -15 nA innerhalb einiger Minuten auf einen Wert nahe null abgesunken war.

Zur Ermittlung der Strom-Spannungskennlinie der I_h -Kanäle wurde das Membranpotential in Intervallen von 2 oder 5 mV auf Werte zwischen -50 und -120 mV geklemmt, wobei zwischen den Potentialsprüngen stets wieder auf das Bezugspotential (-50 mV) zurückgeklemmt wurde. Die Klemmdauer betrug immer 2 s, um eine praktisch vollständige Aktivierung bzw. Deaktivierung der I_h -Kanäle beim jeweiligen Membranpotential zu erreichen.

Als Maß für die Streuung der Meßdaten wurde durchweg die Standardabweichung (SD) verwendet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen zweiseitigen t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ überprüft (Bailey 1992).

Die Approximation der Meßdaten erfolgte mit Algorithmen, die in die Software Microcal Origin (Northampton, USA) integriert waren. Im einzelnen wurden e-Funktionen bzw. Summen von e-Funktionen zur Beschreibung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik des I_h -Stroms, die Boltzmann-Funktion zur Beschreibung der

Spannungsabhängigkeit der I_h -Kanalaktivität und die Hill-Funktion zur Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der I_h -Kanalhemmung durch Cs^+ verwendet.

2.8 Berechnung der Ionenselektivität

I_h -Kanäle sind unselektive Kationenkanäle und für Na^+ und K^+ permeabel. Die in NSL und bei verschiedenen extrazellulären K^+ -Konzentrationen gemessenen Umkehrpotentiale (E_{rev}) des I_h -Stroms erlauben, das Permeabilitätsverhältnis (p_K/p_{Na}) bzw. das Leitwertverhältnis (g_K/g_{Na}) zwischen Na^+ und K^+ zu bestimmen.

Die Berechnung des Permeabilitätsverhältnisses erfolgt mit Hilfe der Goldman-Gleichung:

$$E_{rev} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[K^+]_e + \frac{p_{Na}}{p_K} \cdot [Na^+]_e}{[K^+]_i + \frac{p_{Na}}{p_K} \cdot [Na^+]_i} \quad (1)$$

wobei $[K^+]_e$, $[K^+]_i$, $[Na^+]_e$ und $[Na^+]_i$ die extra- bzw. intrazellulären Konzentrationen von K^+ und Na^+ bezeichnen. Die übrigen Symbole haben ihre übliche Bedeutung: R (molare Gaskonstante) = $8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, T (absolute Temperatur) = 293 K , z (Ladung) und F (Faraday-Konstante) = $96487 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Auflösung nach p_K/p_{Na} ergibt:

$$\frac{p_{Na}}{p_K} = \frac{[K^+]_e - e^{\frac{E_{rev}}{z \cdot F}} \cdot [K^+]_i}{e^{\frac{E_{rev}}{z \cdot F}} \cdot [Na^+]_i - [Na^+]_e} \quad (1a)$$

Die Berechnung von g_K/g_{Na} erfolgte durch Anwendung des von Hodgkin, Huxley und Katz entwickelten Formalismus (siehe Aidley 1989). Danach ist der Nettostrom (I) durch eine für Na^+ und K^+ permeable Leitfähigkeit durch folgenden Ausdruck gegeben:

$$I = g_K \cdot (E_m - E_K) + g_{Na} \cdot (E_m - E_{Na}) \quad (2)$$

wobei E_{Na} und E_K die Gleichgewichtspotentiale für Na^+ und K^+ bezeichnen. Am Umkehrpotential wird der Nettostrom durch die Kanäle null. Damit ergibt sich:

$$\frac{g_K}{g_{Na}} = \frac{(E_{rev} - E_{Na})}{(E_K - E_{rev})} \quad (2a)$$

2.9 Lösungen

Die Lösungen wurden mit entsalztem Wasser angesetzt, das über eine Ionenaustauscher-Anlage (Milli-Q Reagent Water System, Millipore, Molsheim, Frankreich) aus vorentsalztem Leitungswasser gewonnen wurde. Der spezifische Widerstand des Wassers betrug mindestens $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$. Der pH-Wert der Versuchslösungen wurde immer auf 7,40 eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die pH-Einstellung mit NaOH.

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die NSL entsprach in ihrer Zusammensetzung der von Nicholls und Kuffler (1964) eingeführten Versuchslösung. Der NaCl-Gehalt war jedoch um etwa 30 mM reduziert, um Isotonie zur Blutegel-Hämolymphe zu erreichen (Munsch & Deitmer 1992). Zur Pufferung wurde HEPES verwendet (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethansulfonsäure,

Applichem, Darmstadt). Durch die pH-Einstellung mit NaOH erhöhte sich die eingewogene Na⁺-Konzentration von 85 mM auf etwa 89 mM.

In der Na⁺-freien Salzlösung war Na⁺ durch NMDG⁺ (N-Methyl-D-Glucammonium) substituiert. Da NMDG⁺ einen geringeren Aktivitätskoeffizienten als Na⁺ aufweist, erfolgte diese Substitution nicht äquimolar. Vielmehr wurden 105 mM NMDG (N-Methyl-D-Glucamin, Sigma, Deisenhofen) eingewogen, durch HCl in NMDG⁺ überführt und dabei der pH-Wert eingestellt. Die hinzugegebene HCl-Menge entsprach einer Konzentration von etwa 105 mM.

Die Ca²⁺-freie Salzlösung wurde aus einer nominell Ca²⁺-freien NSL unter Zugabe des Chelatbildners EGTA (Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure, Sigma) hergestellt. Die EGTA-Konzentration betrug 5 mM.

In der 89 mM Li⁺-Lösung war Na⁺ äquimolar durch Li⁺ ersetzt; der pH-Wert wurde mit LiOH eingestellt. In den 0, 1, 2, 8, 16 und 32 mM K⁺-Lösungen wurde die in der NSL enthaltene Menge an KCl entweder reduziert oder KCl ohne osmotische Kompensation hinzugefügt. Mono- und polyvalente Kationen (Cs⁺, Ba²⁺ und Co²⁺) wurden als Chloridsalze ohne osmotische Kompensation der jeweiligen Lösung zugesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Versuchslösungen

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	Li ⁺	NMDG ⁺	EGTA
NSL	89	4	2	1	95	-	-	-
Na⁺-frei	-	4	2	1	110	-	105	-
Ca²⁺-frei	89	4	-	1	95	-	-	5
89 Li⁺	-	4	2	1	95	89	-	-
0 K⁺	89	0	2	1	91	-	-	-
1 K⁺	89	1	2	1	92	-	-	-
2 K⁺	89	2	2	1	93	-	-	-
8 K⁺	89	8	2	1	99	-	-	-
16 K⁺	89	16	2	1	107	-	-	-
32 K⁺	89	32	2	1	123	-	-	-

Die Konzentrationen der verschiedenen Ionen sind in mM angegeben. Alle Lösungen enthielten 10 mM HEPES. NSL: Normalsalzlösung

Zur weiteren Charakterisierung der I_h-Kanäle wurden einige Pharmaka verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Pharmaka

	Vollständiger Name	Bezugsquelle	Konzentration [mM]
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma	1
DBcAMP	Dibutyryl-cAMP	Sigma	1
ZD7288	4-Ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidinumchlorid	Tocris	1-30
TEA	Tetraethylammonium, Cl ⁻ -Salz	Sigma	25

Die Substanzen wurden den Versuchslösungen ohne osmotische Kompensation hinzugefügt.

3 Ergebnisse

3.1 Voltage-Sag

Die Wirkung hyperpolarisierender Strompulse auf das Membranpotential verschiedener identifizierter Blutegel-Neuronen ist in Abb. 5 dargestellt. Bei Retzius-, T-, P- und N-Neuronen trat ein Voltage-Sag auf, demgegenüber wurde ein Voltage Sag bei Leydig-, AE- und AP-Neuronen nie beobachtet. Während der Strominjektion erreichte die Hyperpolarisation der T-, P- und N-Neuronen nach ca. 50 ms ein Maximum und fiel danach innerhalb von weiteren 100 bis 200 ms auf ein annähernd konstantes Plateau ab. Offenbar verfügen Retzius-, T-, P- und N-Neuronen über Ionenkanäle in der Plasmamembran, die durch Hyperpolarisation aktiviert werden und zu einem Einwärtsstrom führen dagegen fehlen derartige Ionenkanäle bei Leydig-, AE- und AP-Neuronen.

Der Voltage-Sag war durch die Bad-Applikation von 2 mM extrazelluläres Cs^+ vollständig und reversibel hemmbar (Abb. 6). Dieser Befund deutet darauf hin, daß der Voltage-Sag auf Hyperpolarisations-aktivierte Kationenkanäle (I_h -Kanäle) zurückgehen könnte.

3.2 Strom-Spannungskennlinie des I_h -Stroms

Um die funktionellen Eigenschaften des I_h -Stroms zu charakterisieren z.B. zur Bestimmung seiner Aktivierungskinetik und seines Umkehrpotentials, wurden Voltage-Clamp-Experimente durchgeführt. Die Versuche wurden an P-Neuronen durchgeführt, da diese Zellen über einen besonders ausgeprägten Voltage-Sag

verfügen. Außerdem sind P-Neuronen wegen der Größe ihrer Zellkörper hinreichend robust, um in sie zwei Glasmikroelektroden spitzen zur Durchführung von Voltage-Clamp-Experimenten gleichzeitig ohne erkennbare Schädigung einzustecken. Der erforderliche Haltestrom zum Klemmen der P-Neuronen auf ein Bezugspotential von -50 mV betrug $-0,40 \pm 0,32$ nA ($n = 40$). Das Haltepotential wurde zur Aktivierung der I_h -Kanäle sprunghaft in hyperpolarisierende Richtung verstellt (Abb. 7).

Wurde das Haltepotential sprunghaft in hyperpolarisierende Richtung verstellt, so stieg der Haltestrom unmittelbar an. Diese anfängliche Veränderung des Haltestroms entspricht dem veränderten Stromfluß durch die beim Bezugspotential bereits aktivierten Ionenkanäle in der Plasmamembran (passiver Strom, '1' in Abb. 7B). Anschließend stieg der Haltestrom weiter an und erreichte innerhalb von etwa 1 s einen stationären Maximalwert ('2'). Die Differenz zwischen dem passiven Strom und dem Gesamtstrom am Ende des Potentialsprungs entspricht dem beim eingestellten Haltepotential voll aktivierten I_h -Strom. Nach Rückkehr des Membranpotentials auf das Bezugspotential blieb der Haltestrom zunächst erhöht (Tail-Strom, '3') und kehrte dann langsam auf den Ruhestrom zurück ('4'), wodurch die Deaktivierung der I_h -Kanäle angezeigt wird.

Die Aktivierung des I_h -Stroms war bereits bei Potentialen geringfügig negativer als -50 mV zu erkennen (Abb. 8A). Die Amplitude und die Aktivierungsgeschwindigkeit des I_h -Stroms wuchsen mit zunehmender Hyperpolarisation kontinuierlich an und bis zu einem Haltepotential von -80 mV war keine Sättigung dieser beiden Parameter zu erkennen. Die Amplitude des Tail-Stroms nahm mit der vorangegangenen Hyperpolarisation ebenfalls zu, ging jedoch bei Membranpotentialen in Nähe von -80 mV immer mehr in die Sättigung (siehe Abb. 10, 11). Die Abklingkinetik des Tail-Stroms und damit die Deaktivierung der I_h -Kanäle waren von der vorherigen Hyperpolarisation unabhängig.

Der passive Strom zu Beginn des Potentialsprungs nahm proportional zur Amplitude der Hyperpolarisation zu (Abb. 8B). Dagegen stieg der Gesamtstrom am Ende des Sprungs auf Haltepotentiale zwischen -55 und -75 mV überproportional an, entsprechend der zunehmenden Aktivierung des I_h -Stroms. Bei negativeren Potentialen war auch der Gesamtstrom proportional zum Membranpotential. Aus den Steigungen der Strom-Spannungs-Kennlinien ergibt sich, daß durch die Aktivierung der I_h -Kanäle der Eingangswiderstand der Zellen von $23 \pm 3 \text{ M}\Omega$ auf $9 \pm 4 \text{ M}\Omega$ absinkt ($n = 23$).

3.3 Aktivierungskinetik des I_h -Stroms

Der Zeitverlauf der Aktivierung des I_h -Stroms konnte bei Hyperpolarisationen geringer Amplitude (bis -60 mV) mit einer einfachen e-Funktion gut approximiert werden (Abb. 9). Bei Hyperpolarisationen größerer Amplitude (ab ca. -70 mV) wurde die Anpassung zunehmend schlechter, jedoch ließ sich eine befriedigende Approximation mit einer Summe von zwei e-Funktionen erreichen. Bei Anpassung mit einer e-Funktion wurde bei Hyperpolarisation auf -60 mV eine Zeitkonstante (τ) von $368 \pm 74 \text{ ms}$ bestimmt ($n = 12$) bei Hyperpolarisation auf -70 bzw. -80 mV fiel τ auf 223 ± 34 bzw. $158 \pm 42 \text{ ms}$ ab. Wurde zur Approximation des I_h -Stroms bei -80 mV eine Summe von zwei e-Funktionen verwendet, so lagen die Zeitkonstanten fast eine Zehnerpotenz auseinander (78 ± 22 und $557 \pm 84 \text{ ms}$), wobei die schnelle Komponente ca. 75% des gesamten I_h -Stroms ausmachte.

In einzelnen Messungen mit relativ geringen Oszillationen des Haltestroms zu Beginn des Potentialsprungs (siehe Abb. 4), blieb der Haltestrom vor der Aktivierung des I_h -Stroms für einige Millisekunden konstant. In diesen Fällen wäre zur Anpassung der Aktivierungskinetik eine sigmoide Funktion sicher besser geeignet als eine Summe von e-Funktionen. Da allerdings die technisch bedingten Störungen diese kurze

Anfangsphase meist komplett überlagerten, konnte die Approximation nur mit Hilfe von e-Funktionen durchgeführt werden.

3.4 Aktivität der I_h -Kanäle

Der Tail-Strom nach Rückkehr auf das Bezugspotential ist ein Maß für die Aktivität der I_h -Kanäle beim vorher eingestellten Haltepotential, da zu Beginn des Tail-Stroms noch keine oder kaum I_h -Kanäle wieder geschlossen sind. Das Registrierbeispiel in Abb. 10 zeigt die Abhängigkeit des Tail-Stroms von der Stärke der vorhergehenden Hyperpolarisation. Bei den einzelnen Zellen war die Amplitude des Tail-Stroms variabel, so wurden nach der Rückkehr von einem Haltepotential von -80 mV Tail-Ströme zwischen -0,1 und -0,8 nA gemessen (siehe Abb. 11). Der Tail-Strom war maximal, wenn während der Hyperpolarisation alle I_h -Kanäle geöffnet waren.

Bei einem Haltepotential von -80 mV betrug der I_h -Strom im Mittel $-1,3 \pm 0,6$ nA ($n = 23$), der Tail-Strom nach Rückkehr auf das Bezugspotential dagegen nur $-0,5 \pm 0,4$ nA ($n = 21$), obwohl bei beiden Strömen die Anzahl der aktivierten I_h -Kanäle identisch war. Diese Diskrepanz ist mit den unterschiedlichen elektromotorischen Kräften (EMK) zu erklären, die bei beiden Haltepotentialen auf Na^+ - bzw. K^+ -Ionen einwirken. Wie in der Diskussion näher erläutert werden wird, läßt sich bei einem Haltepotential von -80 mV die EMK für Na^+ -Ionen zu -142 mV und für K^+ -Ionen zu -8 mV berechnen, so daß ein ausgeprägter einwärts gerichteter Na^+ -Strom und ein schwächerer, ebenfalls einwärts gerichteter K^+ -Strom zu erwarten sind. Wird stärker hyperpolarisiert, so nehmen beide Ströme und entsprechend der resultierende I_h -Strom zu. Bei einem Haltepotential von -50 mV ist die EMK für Na^+ vermindert (-112 mV) und entsprechend auch der Na^+ -Einstrom. Die Triebkraft für K^+ -

Ionen weist nun aus der Zelle heraus (+22 mV), so daß der resultierende K^+ -Ausstrom den Netto-Strom durch die I_h -Kanäle weiter verringert.

Die bei den einzelnen P-Neuronen gemessenen Tail-Ströme wurden gegen das vorhergehende Haltepotential aufgetragen und mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion approximiert, um das Ausmaß der Aktivierung der I_h -Kanäle durch die vorherige Hyperpolarisation zu bestimmen (Abb. 11). Dieser Approximation entsprechend sind die I_h -Kanäle bei -65 mV halbmaximal und ab -100 mV vollständig aktiviert. Die Aktivierung der I_h -Kanäle setzt bei einem Membranpotential von -30 mV ein und beim Bezugspotential von -50 mV sollten bereits 12% der Kanäle aktiviert sein.

3.5 Umkehrpotential des I_h -Stroms

In Abb. 12 ist das Versuchsprotokoll zur Bestimmung des Umkehrpotentials des I_h -Stroms dargestellt. Die Zellen wurden zunächst 50 ms lang auf ein definiertes Testpotential geklemmt. In diesem Zeitraum werden die I_h -Kanäle nur wenig aktiviert, so daß der Haltestrom dem passiven Membranstrom entsprechen sollte. Das Haltepotential wurde nach einer Ruheperiode von 2 s Dauer bei -50 mV für 3 s Dauer auf -100 mV verstellt, um die I_h -Kanäle vollständig zu aktivieren. Dann erfolgte der Sprung auf das Testpotential und der registrierte Haltestrom sollte dem passiven Strom zuzüglich des maximalen I_h -Stroms entsprechen. Die Differenz zwischen Gesamtstrom und passivem Strom ergibt somit den Strom, der bei dem jeweiligen Testpotential durch die voll aktivierten I_h -Kanäle fließt.

Wie aus der Strom-Spannungskennlinie in Abb. 14 hervorgeht, kehrte der I_h -Strom bei dieser Zelle, von dem auch die Registrierbeispiele der Abb. 12 und Abb. 13 stammen, die Richtung bei -42 mV um. Die bei drei weiteren Zellen ermittelten

Umkehrpotentiale des I_h -Stroms betragen -38, -44 und -47 mV, so daß sich ein Mittelwert von -42 ± 5 mV ($n = 4$) errechnete. Bei drei dieser vier Messungen war jedoch der Strom bei einem Haltepotential von -50 mV wesentlich kleiner als der mittlere maximale Tail-Strom (Abb. 11). Daher wurden auch die Messungen hinzugezogen, bei denen keine Stromumkehr zu erkennen war, so daß sich im Mittel ein Umkehrpotential des I_h -Stroms von -32 ± 7 mV ($n = 7$) ergab.

3.6 Ionenselektivität unter physiologischen Bedingungen

Die Selektivität der I_h -Kanäle für Na^+ und K^+ läßt sich mit Hilfe des Umkehrpotentials des I_h -Stroms bestimmen. Die Anwendung der Gleichungen (1a) und (2a) setzt Kenntnisse von der extrazellulären K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_e$), der intrazellulären K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_i$) und den entsprechenden Na^+ -Konzentrationen $[\text{Na}^+]_e$ und $[\text{Na}^+]_i$ voraus.

Frühere Messungen mit K^+ -sensitiven Glasmikroelektroden zeigten, daß die extrazelluläre K^+ -Konzentration innerhalb des Segmentalganglions höher ist als in der Versuchslösung, wobei die Diskrepanz bei geringen K^+ -Konzentrationen besonders groß ist (Schlue & Deitmer 1980). Bei einer K^+ -Konzentration im Bad von 4 mM wurde $[\text{K}^+]_e$ in der Region der Zellkörper zu $5,8 \pm 0,6$ mM ($n = 27$) und $[\text{K}^+]_i$ von P-Neuronen wurde zu 97 ± 14 mM bestimmt ($n = 40$; Schlue & Deitmer 1984, Schlue 1991). Dabei war $[\text{K}^+]_i$ unabhängig von der K^+ -Konzentration der Versuchslösung, wenn die Konzentration ≥ 2 mM betrug. Bei geringen K^+ -Konzentrationen ($\leq 0,2$ mM) nahm $[\text{K}^+]_i$ dagegen stark ab (siehe unten). Die extrazelluläre Na^+ -Konzentration wurde bislang nicht experimentell bestimmt. Es wird jedoch davon ausgegangen, daß zwischen Versuchslösung (89 mM) und dem Extrazellulärraum kein nennenswerter Na^+ -Gradient besteht, da auch bei hohen K^+ -Konzentrationen im Bad kein signifikanter

K⁺-Gradient zwischen Bad und Extrazellulärraum besteht (Schlue & Deitmer 1980). Die intrazelluläre Na⁺-Konzentration von P-Zellen wurde zu 9,1 ± 2,4 mM (n = 9; Schlue 1991), 7,5 (+2,9/-4,7) mM (n = 52; Lucht 1998) und 7,8 (+2,7/-2,0) mM (n = 15; Hintz 1999) bestimmt. Der für die Berechnungen verwendete Wert von 7,5 mM lehnt sich an die von Lucht (1998) und Hintz (1999) bestimmten Werte an, da deren physiologische Lösung die gleiche Zusammensetzung hatte wie die in dieser Arbeit verwendete, während in der von Schlue (1991) verwendeten Lösung die NaCl-Konzentration erhöht war (115 mM).

Mit [K⁺]_e = 5,8 mM, [K⁺]_i = 97 mM, [Na⁺]_e = 89 mM und [Na⁺]_i = 7,5 mM errechnen sich die Gleichgewichtspotentiale für Na⁺ und K⁺ zu E_{Na} = +62 mV und E_K = -72 mV. Mit diesen Werten und dem in physiologischer Lösung bestimmten Umkehrpotential von -32 mV ergeben die Quotienten sich zu (siehe Abb. 14):

$$p_K/p_{Na} = 4 \quad \text{und} \quad g_K/g_{Na} = 2,3$$

Die absoluten Werte für g_K und g_{Na} lassen sich anhand des I_h-Stroms bei einem vom Umkehrpotential verschiedenen Membranpotential bestimmen. Bei einem Membranpotential von -80 mV betrug der I_h-Strom im Mittel -1,3 nA (Abb. 8B). Hieraus ergibt sich mit Gleichung 2: g_K = 1,85 · 10⁻⁸ S und g_{Na} = 7,90 · 10⁻⁹ S. Mit diesen Werten läßt sich wiederum der Tail-Strom nach Rücksprung von -80 auf -50 mV zu -0,48 nA berechnen, was gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt (Abb. 11).

3.7 I_h -Strom in Na^+ -freier Lösung

Wie in Abschnitt 3.4 näher ausgeführt, sollte der I_h -Strom bei negativem Membranpotential überwiegend durch Na^+ getragen werden. Um diese Vorstellung zu überprüfen, wurden Voltage-Clamp-Experimente in Na^+ -freier Versuchslösung durchgeführt, deren Registrierbeispiele und Auswertungen in den Abb. 15 und Abb. 16 wiedergegeben sind. In Na^+ -freier Versuchslösung war der Haltestrom, um das Bezugspotential von -50 mV zu erreichen, geringfügig auf $-0,20 \pm 0,16 \text{ nA}$ ($n = 7$; vergl. 3.1) verschoben. Der I_h -Strom war in Na^+ -freier Versuchslösung praktisch vollständig unterdrückt (Abb. 15).

Der Tail-Strom war in Na^+ -freier Lösung ebenfalls stark reduziert und in seiner Richtung umgekehrt (Abb. 16). Die Abklingkinetik des Tail-Stroms war deutlich verlangsamt (vergl. Abb. 10). Die halbmaximale Aktivierung der I_h -Ströme erfolgte jedoch ähnlich wie in physiologischer Lösung bei $-69 \pm 9 \text{ mV}$ ($n = 7$). Nach Rückkehr in physiologische Versuchslösung erreichten I_h -Strom und Tail-Strom nach wenigen Minuten wieder normale Werte.

Das Auftreten eines Tail-Stroms zeigt, daß die I_h -Kanäle auch in Na^+ -freier Lösung aktiviert werden können. Sollte der Strom durch die I_h -Kanäle allein durch K^+ -Ionen getragen sein, so wäre der I_h -Strom bei einem Haltepotential positiver als das K^+ -Gleichgewichtspotential (-72 mV) auswärts und bei negativeren Haltepotentialen einwärts gerichtet und in einzelnen Registrierbeispielen ist diese Erwartung auch erfüllt (siehe Abb. 15A). I_h -Strom und Tail-Strom waren in Na^+ -freier Lösung jedoch viel geringer als theoretisch zu erwarten, was darauf hindeutet, daß die K^+ -Leitfähigkeit der I_h -Kanäle in Abwesenheit von Na^+ stark reduziert ist (siehe 4.5).

3.8 Effekt des extrazellulären K^+ auf den I_h -Strom

Verschiedene Befunde deuten darauf hin, daß I_h -Kanäle eine extrazelluläre, modulierend wirkende Bindestelle für K^+ aufweisen, deren Besetzung erforderlich ist, um Strom leiten zu können (Pape & McCormick 1989, Bobker & Williams 1989). Die in Abb. 17 wiedergegebenen Auftragungen zeigen, daß dies auch für die I_h -Kanäle von P-Neuronen zutrifft. Die Amplitude des I_h -Stroms und des Tail-Stroms nahmen in K^+ -freier Versuchslösung um etwa zwei Drittel ab. Umgekehrt stiegen beide Amplituden bei Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration an und erreichten bei 32 mM K^+ das fünffache der in physiologischer Lösung gemessenen Werte. Die Veränderung der K^+ -Konzentration im Bereich zwischen 0 und 16 mM beeinflusste auf den Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential nur wenig, demgegenüber verschob die Erhöhung auf 32 mM K^+ den Haltestrom stark in den negativen Bereich (bis zu -4,3 nA). Die Aktivierungsgeschwindigkeit des I_h -Stroms wurde durch Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration deutlich verlangsamt (8 mM K^+ : $\tau = 360 \pm 89$ ms, 32 mM K^+ : $\tau = 385 \pm 102$ ms; Haltepotential: $E_h = -80$ mV; $n = 12$).

Um das Umkehrpotential des I_h -Stroms und damit das Permeabilitätsverhältnis zwischen Na^+ und K^+ bei den unterschiedlichen extrazellulären K^+ -Konzentrationen zu ermitteln, wurde das Meßprotokoll aus dem Abschnitt 3.5 verwendet (siehe Abb. 12). An Hand dieser Messungen wurde das Umkehrpotential des I_h -Stroms in K^+ -freier Lösung zu -63 ± 6 mV ($n = 12$) bestimmt (Abb. 18A). Mit steigender extrazellulärer K^+ -Konzentration stieg das Umkehrpotential bis zu einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 4 mM auf -32 ± 8 mV ($n = 7$) an (siehe Abb. 14) und fiel bei höheren K^+ -Konzentrationen wieder auf -40 ± 7 mV ($n = 5$) ab (8 mV ± 5 ; $n = 8$).

Das Permeabilitätsverhältnis zwischen K^+ und Na^+ lag bei einer K^+ -Konzentration in der Versuchslösung von 2 mM bei $7,8 \pm 3,5$, erreichte bei der physiologischen K^+ -Konzentration von 4 mM einen minimalen Wert von $4,0 \pm 2,2$ und stieg bei höheren

K⁺-Konzentrationen wieder an (8 mM K⁺: $6,9 \pm 3,4$, 16 mM K⁺: $18,8 \pm 9,2$). Die in K⁺-freier Lösung gemessenen Umkehrpotentiale wurden nicht ausgewertet, da sich [Na⁺]_i und [K⁺]_i bei Entzug des extrazellulären K⁺ stark verändern, wahrscheinlich durch Hemmung der Na⁺-K⁺-Pumpe (Schlue & Deitmer 1984, Schlue 1991, Lucht 1998). Unbekannt ist bisher, ob vergleichbare Änderungen auch bei einer K⁺-Konzentration von 1 mM im Bad erfolgen, daher wurde auch das in 1 mM K⁺ gemessene Umkehrpotential nicht ausgewertet.

3.9 Hemmung des I_h-Stroms durch extrazelluläres Cs⁺

Eines der wichtigsten Kriterien zur Unterscheidung des I_h-Stroms von anderen Ionenströmen ist die reversible Hemmung durch extrazelluläres Cs⁺ in geringer Konzentration (Fain et al. 1978). Der Einwärtsstrom durch I_h-Kanäle wurde auch bei P-Neuronen und anderen Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem durch Zusatz von Cs⁺ zur Versuchslösung gehemmt (Abb. 19, siehe Abb. 6). Die Hemmung war bei einer Cs⁺-Konzentration von 0,3 mM halbmaximal und bei 5 mM Cs⁺ praktisch vollständig. Die Cs⁺-Wirkung setzte schnell ein und war innerhalb weniger Minuten vollständig reversibel. Bei höheren Cs⁺-Konzentrationen (≥ 1 mM) war der Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential leicht erhöht, entsprechend der geringen Depolarisation in den Current-Clamp-Experimenten (siehe Abb. 6). Mehrwertige Kationen wie Ni²⁺, Co²⁺ und Ba²⁺ (jeweils 5 mM) sowie das quarternäre Ammoniumion TEA (20 mM) übten auf den I_h-Strom keinen Effekt aus.

Das bei Vertebraten spezifisch I_h-Kanäle hemmende bradycarde Agens ZD7288 (BoSmith et al. 1993, Pape 1994) hatte bei P-Neuronen selbst bei einer Inkubationszeit von 10 min in einer Konzentration von 10 mM keine Wirkung auf den I_h-Strom. Die Applikation von 30 mM ZD7288 induzierte eine leichte Hemmung des I_h-Stroms, die

jedoch nicht reversibel war. Bei sechs von acht Zellen stieg während oder nach Applikation von 30 mM ZD7288 der Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential stark und irreversibel an. Entsprechend waren die Zellen nach Abschalten der Spannungsklemme weitgehend depolarisiert.

3.10 Wirkung von cAMP auf die Aktivierung des I_h -Stroms

I_h -Kanäle weisen im C-terminalen Ende Aminosäuresequenzen auf, welche auch bei CNG ('cyclic nucleotide-gated')-Kanälen zu finden sind und dort als Bindestellen für zyklische Nukleotide dienen (Gauß & Seifert 2000). Die verstärkte Besetzung dieser Bindestellen durch Erhöhung der Konzentration von cAMP oder cGMP verschiebt bei I_h -Kanälen die Aktivierungsschwelle in positive Richtung und umgekehrt verschiebt eine Entleerung der Bindestellen durch Absenkung der Konzentration von cAMP oder cGMP die Aktivierungsschwelle in negative Richtung (DiFrancesco & Tortora 1991).

Um den Einfluß zyklischer Nukleotide auf die Aktivierung der I_h -Kanäle von P-Neuronen zu ermitteln, wurde zunächst die Wirkung von IBMX untersucht, das durch Hemmung von Phosphodiesterasen die Konzentration zyklischer Nukleotide im Cytosol erhöht (Beavo & Reifsnnyder 1990, Ukena et al. 1993). Die Applikation von 1 mM IBMX für die Dauer von 10 min führte zu einem leichten Anstieg des Haltestroms, der zur Klemmung auf das Bezugspotential benötigt wurde. Auch der passive Strom, gemessen zu Beginn des Potentialsprungs in hyperpolarisierende Richtung, war geringfügig erhöht, ebenso wie der Gesamtstrom nach Aktivierung der I_h -Kanäle (Abb. 20A). Die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle erfolgte vergleichbar wie in physiologischer Lösung bei -67 ± 5 mV (Abb. 20B, vergl. Abb. 11).

Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide besteht in der Applikation membranpermeabler und Hydrolyse-resistenter Analoga, welche dieselben zellulären Vorgänge wie die physiologischen Substanzen beeinflussen. In Gegenwart des cAMP-Analogons Dibutyryl-cAMP (dBcAMP) war der I_h -Strom um etwa 50% reduziert (Abb. 21A). Die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle erfolgte bei -64 ± 7 mV (Abb. 21B), ähnlich wie in physiologischer Lösung bzw. wie in Gegenwart von IBMX (Abb. 11, 20B).

Diese Befunde deuten darauf hin, daß ein Anstieg der intrazellulären Konzentration an zyklischen Nukleotiden bei P-Neuronen offenbar nicht zu einer Verschiebung der Aktivierungskennlinie der I_h -Kanäle in den positiven Bereich führt.

3.11 Wirkung von Koffein auf den I_h -Strom

Die Applikation von Koffein erhöht durch Hemmung von Phosphodiesterasen ebenfalls die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nukleotide (Risman et al. 1991), jedoch ist die Wirksamkeit im Vergleich zu derjenigen von IBMX um etwa zwei Zehnerpotenzen geringer. Die Applikation von 50 mM Koffein induzierte bei P-Neuronen bei einem Haltepotential von -50 mV zwei transiente, einwärts gerichtete Membranströme, an die sich ein anhaltender, auch einwärts gerichteter Membranstrom anschloß (Abb. 22; Gerard 1997). Die beiden transienten Ströme lassen sich nur einmal auslösen und beruhen auf der Aktivierung von unselektiven Kationenkanälen ('caffeine-sensitive ion channels'; Schoppe et al. 1997), die ionale Grundlage des anhaltenden Stroms ist bisher unbekannt.

In Gegenwart von Koffein war der passive Strom zu Beginn des Potentialsprungs in hyperpolarisierende Richtung vergrößert, dagegen nahm der I_h -Strom deutlich ab

(Abb. 22B, 23). In den Experimenten fiel der Unterschied gering aus, ob 40 s (früher konnte der I_h -Strom wegen der transienten Ströme nicht bestimmt werden) oder 10 min nach Beginn nach der Koffein-Applikation gemessen wurde. Der Tail-Strom war in seiner Amplitude stark reduziert oder überhaupt nicht mehr erkennbar, so daß die Spannungsabhängigkeit der I_h -Kanalaktivierung nicht bestimmt werden konnte. Aus den Strom-Spannungskurven in Abb. 23 geht jedoch hervor, daß die I_h -Kanäle in Gegenwart von Koffein erst bei Membranpotentialen negativer als -70 mV aktiviert werden.

Der passive Strom wuchs nach Auswaschen des Koffeins zunächst an, nahm dann aber wieder ab, um auch nach 10 min nicht vollständig auf den Ausgangswert zurückzukehren. Dagegen normalisierten sich der Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential und der I_h -Strom innerhalb weniger Minuten. Der Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential stieg jedoch bei 7 von 12 Zellen während der Koffein-Applikation oder nach dem Auswaschen stark und irreversibel an. Die Membran dieser Zellen war nach Abschalten der Spannungsklemme entsprechend depolarisiert.

Die Wirkung von Koffein auf die Elektrophysiologie von P-Neuronen ist komplex und erlaubt keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Beeinflussung der I_h -Kanäle durch zyklische Nukleotide. Allerdings sprechen die Daten in Abb. 23B gegen eine Verschiebung der Aktivierungskennlinie in positive Richtung.

3.12 I_h -Strom nach Austausch des extrazellulären Na^+ gegen Li^+

Nach Wollmuth und Hille (1992) sind I_h -Kanäle für Li^+ kaum permeabel. Sie sind damit die einzigen Kationen-Kanäle, die Li^+ und Na^+ voneinander unterscheiden

können (Ho et al. 1994). Offenbar weisen auch die I_h -Kanäle der P-Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems diese Eigenschaft auf, da der I_h -Strom nach Austausch des extrazellulären Na^+ gegen Li^+ vollständig unterdrückt war (Abb. 24) und der Tail-Strom seine Richtung umkehrte. Beide Veränderungen waren kaum reversibel, denn auch 20 min nach Auswaschen des Li^+ war nur eine geringe I_h -Strom-Aktivierung zu erkennen und der Tail-Strom blieb auswärts gerichtet. Der Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential stieg nach Ersatz des Na^+ durch Li^+ auf einen Wert von $+1,3 \pm 0,6$ nA ($n = 6$) an und kehrte auch nach Rückkehr in NSL häufig nicht auf den Ausgangswert zurück.

3.13 Wirkung des extrazellulären pH-Wertes auf den I_h -Strom

Die I_h -Kanäle von Vertebraten zeigen bei intrazellulärer oder extrazellulärer Ansäuerung eine Verschiebung der Aktivierungskurve in positive Richtung (Munsch & Pape 1999, Stevens et al. 2001). Dagegen verschob sich bei P-Neuronen bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,8 die halbmaximale Aktivierung des I_h -Stroms, bestimmt anhand der Tail-Ströme, in negative Richtung auf -88 mV ($n = 8$; Abb. 25). Nur bei drei der insgesamt acht untersuchten Zellen waren Tail-Ströme deutlich erkennbar und bei diesen erfolgte die halbmaximale Aktivierung wie in physiologischer Lösung bei -65 mV. Die halbmaximale Aktivierung verschob sich bei einem pH-Wert von 8,0 auf -79 mV (Abb. 26). Die Amplitude des I_h -Stroms ging sowohl bei extrazellulärer Ansäuerung als auch bei Alkalinisierung deutlich zurück, um 20% bei pH 6,8 und um 40% bei pH 8,0 ($E_h = -80$ mV). Die Aktivierungskinetik des I_h -Stroms blieb unverändert (pH 6,8: 176 ± 54 ; $n = 6$ ms bei -80 mV; pH 8,0: 193 ± 42 ms). Der Ruhestrom war bei pH 6,8 auf $-1,7 \pm 3,2$ nA ($n = 6$) und bei pH 8,0 auf $-0,9 \pm 1,9$ nA ($n = 7$) vergrößert. Alle beobachteten pH-induzierten Änderungen waren nach 10 min in NSL nicht oder nur teilweise reversibel.

3.14 Experimente zur physiologischen Bedeutung der I_h -Kanäle

Die P-Neuronen sind mechanosensorische Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem, da sie auf Hautreize (Berührung, Druck) reagieren und je nach Reizstärke Salven von Aktionspotentialen mit unterschiedlicher Frequenz auslösen. Der Na^+ -Einstrom durch aktivierte I_h -Kanäle depolarisierte die Membran in Richtung der Schwelle zur Aktionspotential-Auslösung. Da die Aktivierung der I_h -Kanäle möglicherweise die Frequenz der durch Hautreize ausgelösten Aktionspotentiale moduliert, wurde überprüft, ob die Aktivierung bzw. die Hemmung der I_h -Kanäle die Aktionspotential-Auslösung und den Zeitverlauf der Aktionspotentiale beeinflusst.

3.14.1 Einfluß der I_h -Kanäle auf die Nachhyperpolarisation

Im Verlauf eines Aktionspotentials werden verzögert gleichrichtende K^+ -Kanäle ('delayed rectifier') aktiviert, welche die Repolarisation beschleunigen und die Nachhyperpolarisation des Aktionspotentials bewirken. Die Aktivierung der I_h -Kanäle sollte der durch K^+ -Ausstrom vermittelten Nachhyperpolarisation entgegenwirken sowie deren Amplitude und Dauer reduzieren.

Um die I_h -Kanäle zu aktivieren, wurde je nach Eingangswiderstand der Zelle ein hyperpolarisierender Strom von -3 bis -5 nA Amplitude mit 300 ms Dauer injiziert. Das Aktionspotential wurde direkt danach oder um bis zu 10 ms verzögert durch einen depolarisierenden Strompuls von +2 bis +5 nA Amplitude ausgelöst. Der gleiche Strompuls wurde verwendet, um zum Vergleich ein Aktionspotential ohne vorherige Aktivierung der I_h -Kanäle auszulösen.

Die Nachhyperpolarisation war bei aktivierten I_h -Kanälen verkürzt (Abb. 27) und nach dem Ende der Nachhyperpolarisation trat zusätzlich ein leichtes Überschießen (+2 bis +10 mV) des Ruhepotentials auf, das jedoch nie zur Auslösung eines weiteren Aktionspotentials führte. Solche Effekte wurden ohne Aktivierung der I_h -Kanäle nie beobachtet. Die Aktivierung der I_h -Kanäle beeinflusste die Form des Aktionspotentials nicht.

In Gegenwart von 1 mM Cs^+ waren die Aktionspotentiale und die Nachhyperpolarisationen reversibel verkleinert (Abb. 28). Die Zeitverläufe beider Komponenten waren dagegen unverändert. Die Aktionspotential-Auslösung erfolgte in Gegenwart von Cs^+ um etwa 1,3 ms schneller als in physiologischer Versuchslösung.

3.14.2 Erregbarkeit von P-Neuronen mit und ohne aktivierte I_h -Kanäle

Die Auslösung von Aktionspotentialen war nach Aktivierung der I_h -Kanäle durch eine Membranhyperpolarisation deutlich erleichtert (Abb. 29). Nach einer Hyperpolarisation lösten etwa 30% der P-Neuronen sogar ohne depolarisierenden Strompuls Aktionspotentiale aus (Abb. 29B; siehe Abb. 5, 6).

Da die Aktivierung der I_h -Kanäle die Erregbarkeit der P-Neuronen erhöht, war zu vermuten, daß sie auch die Aktionspotential-Frequenz erhöht. Um diese Vorstellung zu überprüfen, wurde zunächst ein Aktionspotential ausgelöst und nach möglichst kurzer Zeit versucht, ein zweites Aktionspotential auszulösen, um die Refraktärperiode bestimmen zu können. Überraschenderweise vergrößerte sich die Refraktärperiode signifikant um $3,4 \pm 0,7$ ms ($n = 13$), wenn vor Auslösung des ersten Aktionspotentials I_h -Kanäle aktiviert wurden (Abb. 30). Die Hemmung der I_h -Kanäle durch extrazelluläres Cs^+ beeinflusste die Refraktärperiode dagegen kaum (Abb. 31). In

Gegenwart von Cs^+ war es unerheblich, ob die Zellen vor dem ersten Aktionspotential hyperpolarisiert wurden oder nicht.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden durch I_h -Kanäle vermittelte Ströme bei Neuronen im Zentralnervensystem des Blutegels untersucht. Die Experimente wurden überwiegend an P-Neuronen durchgeführt, da der I_h -Strom bei diesen Zellen gut ausgeprägt ist (siehe Abb. 5). Außerdem sind P-Neuronen elektrophysiologischen Experimenten mit zwei einzelnen Glasmikroelektroden gut zugänglich und hinreichend robust. Besonderes Augenmerk wurde in den Untersuchungen auf die Aktivierungskinetik, das Schaltverhalten und die Modulation der I_h -Kanäle durch intrazelluläre Botenstoffe gelegt. Weiterhin sollte aufgeklärt werden, welche Ionen den I_h -Strom unter physiologischen Bedingungen tragen, ob die I_h -Kanäle für andere Ionen permeabel sind und durch welche Pharmaka oder Ionen die I_h -Kanäle gehemmt werden können. Schließlich wurde versucht, über die wiederholte Auslösung und den Zeitverlauf von Aktionspotentialen die physiologische Bedeutung der I_h -Kanäle aufzuklären.

4.1 Wirkung des I_h -Stroms auf das Membranpotential

Die Abhängigkeit der I_h -Kanalaktivität vom Membranpotential bei P-Neuronen deutet darauf hin, daß bereits beim Ruhepotential etwa 6% der I_h -Kanäle aktiviert sind (ca. -45 mV; Deitmer & Schlue 1984, Lucht 1998, Hintz 1999; siehe Abb. 11). Die Hemmung der I_h -Kanäle durch Cs^+ führte jedoch nicht zur Membranhyperpolarisation, vielmehr trat eine geringfügige Depolarisation der Membran auf (siehe Abb. 6, 19).

Auch in Geweben anderer Präparate liegt der Aktivierungsbereich der I_h -Kanäle in der Nähe des Ruhepotentials. Der in diesem Potentialbereich durch die I_h -Kanäle

vermittelte depolarisierend wirkende Einwärtsstrom wird überwiegend durch Na^+ getragen. Je mehr I_h -Kanäle beim Ruhepotential bereits aktiviert sind, desto größer ist deren Einfluß auf das Ruhepotential. Entsprechend ruft die Hemmung der I_h -Kanäle bei manchen Neuronen eine deutliche Membranhyperpolarisation hervor, wobei der Eingangswiderstand der Zellen um 30% zunehmen kann (McCormick & Pape 1990, Travagli & Gills 1994). In der Ratten-Amygdala weisen Neuronen ohne I_h -Kanäle ein erheblich negativeres Ruhepotential auf als Neuronen derselben Population mit deutlich ausgeprägtem I_h -Strom (Womble & Moises 1993, Larkman & Kelly 1992).

4.2 Aktivierung des I_h -Stroms

Bei sprunghafter Verstellung des Membranpotentials in hyperpolarisierende Richtung stieg der Haltestrom zunächst praktisch unverzögert an (Abb. 7). Dieser Anstieg des Haltestroms kompensiert die nun veränderten Ionenflüsse durch die beim Bezugspotential bereits aktivierten Ionenkanäle (‘passiver Strom’). Im Anschluß daran bildet sich der I_h -Strom langsam aus, wobei die Aktivierungsgeschwindigkeit und die Amplitude des Stroms mit steigender Hyperpolarisation zunehmen (Abb. 7 B).

Die Aktivierung des I_h -Stroms bei P-Neuronen ließ sich bei geringer Hyperpolarisation gut mit einer einzelnen e-Funktion approximieren (Abb. 9). Die Annäherung durch eine einzelne e-Funktion verschlechterte sich mit steigender Hyperpolarisation und bei Membranpotentialen ≤ -80 mV ließ sich eine befriedigende Approximation nur noch mit Hilfe einer Summe von zwei e-Funktionen erreichen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Zellen gemacht (Kaupp & Seifert 2001). Die verschiedenen bisher bekannten Untereinheiten der I_h -Kanäle zeigen bei Expression in Xenopus-Oozyten oder HEK-Zellen (‘human embrionic kidney’) stark voneinander abweichende Aktivierungskinetiken. So aktivieren HCN1-Kanäle mit Zeitkonstanten

von 100 bis 300 ms (Santoro et al. 1998, 2000) und HCN2-Kanäle mit 200 bis 500 ms (Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1999). Die Aktivierungskinetik von HCN4-Kanälen ist deutlich langsamer als die von HCN1- oder HCN2-Kanälen und variiert zwischen einigen hundert Millisekunden und bis zu 30 s (Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999). HCN3-Kanäle wurden bislang noch nicht funktionell exprimiert. Eine mehrphasige Aktivierungskinetik könnte wie bei den hier untersuchten P-Neuronen also darauf beruhen, daß diese verschiedene Typen von I_h -Kanälen mit unterschiedlicher Aktivierungskinetik enthalten. Andererseits könnten die Kanäle einer einheitlichen Population auch in Abhängigkeit vom Membranpotential nacheinander verschiedene Offen- und Geschlossen-Zustände mit unterschiedlicher Kinetik durchlaufen (siehe Altomare et al. 2001). Die Aktivierungskinetik von 158 ± 42 ms bei -80 mV (Abb. 9) deutet auf eine Verwandtschaft der I_h -Kanäle von P-Neuronen mit den HCN1-Kanälen von Vertebraten hin.

Anhand der nach einer Hyperpolarisation auftretenden Tail-Ströme läßt sich auf die Aktivität der I_h -Kanäle während der Hyperpolarisation direkt schließen (Abb. 10). Bei P-Neuronen war die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle bei ca. -65 mV erreicht (Abb. 11) und damit deutlich positiver als bei den HCN-Kanälen von Vertebraten (-70 bis -85 mV; Pape 1996, Santoro & Tibbs 1999). Die SpHCN-Kanäle aus Seeigelspermien waren in der intakten Zelle bei einem Membranpotential von -51 mV halbmaximal aktiviert, in 'excised patches' verschob sich das Potential zur halbmaximalen Aktivierung auf -85 mV (Gauss et al. 1998). Dies deutet darauf hin, daß die Aktivierung der I_h -Kanäle bei diesen Zellen durch intrazelluläre Faktoren erheblich beeinflußt wird.

4.3 Blockierbarkeit des I_h -Stroms

Bereits eine extrazelluläre Cs^+ -Konzentration von 0,3 mM hemmte bei P-Neuronen den I_h -Strom halbmaximal (Abb. 19; siehe Abb. 6). Diese Blockierbarkeit durch extrazelluläres Cs^+ in submillimolarer Konzentration (Pape 1996) ist ein wichtiges gemeinsames Merkmal von I_h -Kanälen. Intrazellulär appliziertes Cs^+ zeigt dagegen keinerlei Wirkung (Barnes & Hille 1989, Mercuri et al. 1995).

Dagegen zeigten bei P-Neuronen weder Ni^{2+} , Co^{2+} oder Ba^{2+} (jeweils 5 mM) noch TEA (20 mM) bei extrazellulärer Applikation eine Wirkung auf den I_h -Strom. Die mehrwertigen Kationen Mn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} und Co^{2+} in millimolaren Konzentrationen haben bei anderen Präparaten ebenfalls keinen hemmenden Effekt auf den I_h -Strom (DiFrancesco 1991, Pape 1996), wie auch die extrazellulär applizierten organischen Kationen TEA und 4-Aminopyridin (Budde et al. 1994).

Bei P-Neuronen zeigte die extrazelluläre Applikation von 10 mM ZD7288 über 10 min keinerlei Wirkung auf den I_h -Strom und erst bei einer Konzentration von 30 mM trat eine geringfügige Hemmung auf, die jedoch nicht reversibel war. Weiterhin depolarisierten sechs von acht Zellen während oder nach Applikation von 30 mM ZD7288. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß den I_h -Kanälen von P-Neuronen eine Bindestelle für ZD7288 fehlt, da bei Vertebraten submillimolare Konzentrationen von ZD7288 I_h -Ströme auch bei extrazellulärer Applikation selektiv hemmten (BoSmith et al. 1993, Pape 1994).

Die Hemmung durch ZD7288 bei anderen Präparaten erfolgt bei intrazellulärer Applikation innerhalb von wenigen Sekunden und ist auch innerhalb kürzester Zeit vollständig reversibel (Shin et al. 2001). Die Hemmung erfordert die Öffnung der Kanäle, so daß die ZD7288-Bindestelle in der Kanalpore liegen sollte. Bei

extrazellulärer Applikation setzt die ZD7288-Wirkung erst nach einigen Minuten ein (siehe Gasparini & DiFrancesco 1997).

4.4 Einfluß der permeierenden Ionen auf die Leitfähigkeit der I_h -Kanäle

Die Änderungen des I_h -Stroms in Na^+ -freier und in K^+ -freier Lösung deuten darauf hin, daß die K^+ -Leitfähigkeit der I_h -Kanäle von der Gegenwart von Na^+ -Ionen abhängt und die Na^+ -Leitfähigkeit von der Gegenwart von K^+ -Ionen. In Na^+ -freier Lösung war der I_h -Strom praktisch vollständig unterdrückt, wodurch angezeigt wird, daß die K^+ -Leitfähigkeit der I_h -Kanäle in Abwesenheit von Na^+ stark reduziert ist. Bei einem Membranpotential von -100 mV errechnet sich mit $g_K = 1,85 \cdot 10^{-8} \text{ S}$ ein einwärtsgerichteter K^+ -Strom durch die I_h -Kanäle von $-0,52 \text{ nA}$, gemessen wurde jedoch nur ein Strom von im Mittel $-0,21 \text{ nA}$ (Abb. 15). Weiterhin wäre in Na^+ -freier Lösung bei unveränderter K^+ -Leitfähigkeit ein maximaler Tail-Strom von $+0,41 \text{ nA}$ zu erwarten gewesen, jedoch variierten die gemessenen maximalen Tail-Ströme zwischen $+0,07$ und $+0,3 \text{ nA}$ (Abb. 16). Der Beitrag eines möglichen Na^+ -Ausstroms wurde bei diesen Überlegungen nicht berücksichtigt, da $[\text{Na}^+]_i$ in Na^+ -freier Lösung innerhalb von wenigen Minuten auf 1 mM und weniger absinkt (Hintz 1999). Die Überlegungen deuten darauf hin, daß die K^+ -Leitfähigkeit der I_h -Kanäle in Abwesenheit von Na^+ um mehr als die Hälfte abnimmt.

Der I_h -Strom war wie in Na^+ -freier Lösung auch in K^+ -freier Lösung weitgehend unterdrückt, was stark für eine Verminderung der Na^+ -Leitfähigkeit der I_h -Kanäle spricht. Eine Berechnung der in K^+ -freier Lösung zu erwartenden Membranströme wird jedoch dadurch erschwert, daß sich $[\text{Na}^+]_i$ und insbesondere $[\text{K}^+]_i$ in K^+ -freier Lösung durch die Hemmung der Na^+ - K^+ -Pumpe stark ändern (siehe Schlue & Deitmer 1981; Schlue 1991).

In K^+ -freier Versuchslösung wurde die extrazelluläre K^+ -Konzentration zu $1,6 \pm 0,6$ mM bestimmt ($n = 9$; Schlue & Deitmer 1980), während die extrazelluläre Na^+ -Konzentration wie in physiologischer Lösung 89 mM betragen sollte. Die Veränderungen von $[Na^+]_i$ und $[K^+]_i$ in K^+ -freier Lösung wurden bisher nur durch Einzelregistrierungen dokumentiert. Danach steigt $[Na^+]_i$ in K^+ -freier Lösung innerhalb von 5 min reversibel auf ca. 20 mM an (Lucht 1998). Die K^+ -freie Lösung führte zu einer starken Abnahme von $[K^+]_i$, wobei das Ausmaß in den vier durchgeführten Experimenten stark unterschiedlich war. Bei zwei Experimenten nahm $[K^+]_i$ um 25 bzw. 21% ab und in den beiden anderen um 42 bzw. 84% (Schlue & Deitmer 1984, Schlue 1991). Wird eine $[K^+]_i$ -Abnahme um 20% angenommen ($[K^+]_i = 78$ mM), so errechnet sich mit $[K^+]_e = 1,6$ mM, $[Na^+]_e = 89$ mM und $[Na^+]_i = 20$ mM der I_h -Strom bei -80 mV und unveränderten g_{Na} und g_K zu -0,56 nA. In K^+ -freier Lösung wurde ein I_h -Strom von $-0,33 \pm 0,16$ nA ($n = 12$; Abb. 17B) gemessen. Bei Abnahme von $[K^+]_i$ um 85% ($[K^+]_i = 15$ mM) ergab sich ein I_h -Strom von -1,36 nA. Den Berechnungen nach nahm die Na^+ -Leitfähigkeit der I_h -Kanäle in K^+ -freier Lösung somit um mindestens 40% ab.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Leitfähigkeit der I_h -Kanäle für Na^+ durch die Gegenwart von K^+ bestimmt wird und umgekehrt die Leitfähigkeit für K^+ von der Präsenz von Na^+ . Diese Abhängigkeit ist für sogenannte 'multi-ion-pores' typisch, bei denen sich unterschiedliche Ionensorten bei der Bewegung durch die Kanalpore beeinflussen (Hille 2001).

4.5 Modulation der I_h -Kanäle

Die Aktivierungskennlinie der I_h -Kanäle von P-Neuronen ließ sich durch Applikation des cAMP-Analogen dBcAMP oder durch Hemmung der Phosphodiesterasen durch IBMX oder Koffein nicht in positive Richtung verschieben (Abb. 20, 21, 23).

4.5.1 Zyklische Nukleotide

Die I_h -Kanäle weisen auf ihrer intrazellulären Seite eine Bindestelle für zyklische Nukleotide auf, wie sie zuvor bei CNG-Kanälen gefunden wurde (Santoro et al. 1997). Dabei zeigen die bisher bekannten Untereinheiten unterschiedlich starke Affinitäten für cAMP und cGMP. Allen gemeinsam ist jedoch, daß die Affinität für cAMP deutlich höher ist als die für cGMP. Eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration an zyklischen Nukleotiden verschiebt die Aktivierungskennlinie der meisten I_h -Kanäle in positive Richtung, wobei Verlauf und Amplitude der Kennlinie erhalten bleiben (Kaupp & Seifert 2001). Eine Ausnahme bilden die SpHCN-Kanäle in den Spermien des Seeigels, die ohne zyklische Nukleotide nur wenig aktivierbar sind (Gauss et al. 1998).

Die Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide ist bei HCN1-Kanälen im Vergleich zu den anderen HCN-Untereinheiten am geringsten. Bei einigen Expressionssystemen wurde eine Verschiebung der Aktivierungskennlinie um einige Millivolt nachgewiesen (Santoro et al. 1998), bei anderen wurde überhaupt kein Effekt gefunden (Shin et al. 2001). Dies zeigt, daß diese Kanäle durch cAMP kaum beeinflusst werden. Dieser Befund deutet ebenso wie die schnelle Aktivierung darauf hin, daß die I_h -Kanäle von P-Neuronen mit den HCN1-Kanälen von Vertebraten verwandt sind.

4.5.2 Koffein

Koffein wurde wie IBMX verwendet, um durch Hemmung von Phosphodiesterasen die intrazelluläre Konzentration an zyklischen Nukleotiden zu erhöhen und dadurch möglicherweise die Aktivierungskurve der I_h -Kanäle in positive Richtung zu verschieben. In millimolarer Konzentration übt Koffein bei P-Neuronen vielfältige Effekte auf Membranleitfähigkeit und Membranpotential aus (Gerard 1997, Schoppe et al. 1997). Insbesondere induziert Koffein zwei transiente Membranströme, die überwiegend von Na^+ getragen werden und die sich nur einmal auslösen lassen. Direkt nach Abklingen des zweiten transienten Membranstroms war der I_h -Strom deutlich reduziert und der passive Membranstrom stark erhöht (Abb. 22). Möglicherweise beruht die Verminderung des I_h -Stroms auf einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration und der damit verbundenen Schwächung des Na^+ -Gradienten infolge des Na^+ -Einstroms durch die Koffein-sensitiven Ionenkanäle und der Hemmung der Na^+ - K^+ -Pumpe durch Koffein (siehe Lucht 1998). Die Erhöhung des passiven Stroms geht vermutlich auf den anhaltenden, Koffein-induzierten Strom zurück. Der I_h -Strom nahm während der weiteren Koffeinapplikation geringfügig weiter ab, vermutlich bedingt durch den weiteren Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$.

Nach Auswaschen des Koffeins kehrte der I_h -Strom innerhalb kurzer Zeit auf seinen Ausgangswert zurück, dagegen stieg der passive Membranstrom nochmals stark an. Die Gründe hierfür sind unklar. Möglicherweise stellten die hohen Koffeinkonzentrationen bei langer Applikation und in Verbindung mit der Voltage-Clamp-Technik eine starke Belastung für die Zellen dar, denn mehr als die Hälfte der untersuchten Neuronen starben und bei den überlebenden Neuronen dauerte es mindestens 30 min, bis der passive Membranstrom wieder auf den Ausgangswert abgesunken war (vergl. Sieks et al. 2000).

4.5.3 Einfluß des extrazellulären pH-Wertes

Die I_h -Kanäle von P-Neuronen zeigten sowohl bei geringer extrazellulärer Ansäuerung als auch bei extrazellulärer Alkalinisierung eine Verschiebung der Aktivierungskennlinie in negative Richtung (Abb. 25, 26). Demgegenüber führt extrazelluläre Ansäuerung bei I_h -Kanälen von Vertebraten zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve in positive Richtung (Munsch & Pape 1999). In der Zunge von Ratten wurden sogar I_h -Kanäle gefunden, welche die Depolarisation der Geschmacks-Sinneszellen bedingen, die für die Aufnahme von Sauerreizen zuständig sind (Stevens et al. 2001). Ob eine starke extrazelluläre Ansäuerung die I_h -Kanäle in P-Neuronen aktiviert, ähnlich wie in den Geschmacks-Sinneszellen der Zunge, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da derartige pH-Verschiebungen in neuronalem Gewebe kaum zu erwarten sind.

4.6 Physiologische Bedeutung der I_h -Kanäle

Die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten P-Neuronen sind nicht spontan aktiv, wie auch die T- und N-Neuronen, die ebenfalls einen ausgeprägten I_h -Strom aufweisen (siehe Abb. 5). Alle drei Zelltypen reagieren auf mechanische Hautreize und erzeugen je nach Reizstärke eine Aktionspotentialsalve, die von einer ausgeprägten Membranhyperpolarisation gefolgt wird. Die Membranhyperpolarisation beruht auf der Aktivierung der Na^+ - K^+ -Pumpe und/oder der Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen beruht (siehe Jansen & Nicholls 1973, Catarsi et al. 1993). Diese Hyperpolarisation führt deutlich in den Potentialbereich zur Aktivierung der I_h -Kanäle, die Ausmaß und Dauer der Hyperpolarisation mitbestimmen sollten.

Eine weitere Funktion der I_h -Kanäle liegt in der Modulation des Membranruhepotentials. Nach Aktivierung der I_h -Kanäle durch einen hyperpolarisierenden Strom erzeugen P-Neuronen häufig spontan Aktionspotentiale (Abb. 5, 29). In jedem Fall ist die Aktionspotential-Auslösung durch einen depolarisierenden Strompuls erleichtert (Abb. 29), da das Membranruhepotential mehr in Richtung der Schwelle verschoben ist. Auch die Nachhyperpolarisation eines Aktionspotentials ist bei Aktivierung der I_h -Kanäle verkürzt (Abb. 27). Somit beeinflussen die I_h -Kanäle die Erregbarkeit von P-Neuronen.

Die Refraktärperiode wurde durch die Aktivierung der I_h -Kanäle verlängert (Abb. 30). Es wäre denkbar, daß sich auf Grund der verminderten Nachhyperpolarisation des ersten Aktionspotentials weniger Na^+ -Kanäle im aktivierbaren Zustand befinden und die Schwelle zur Auslösung des Aktionspotentials später erreicht wird. Die Hemmung des I_h -Stroms durch Cs^+ beeinflusste die Refraktärperiode nur wenig (Abb. 31). Möglicherweise ist dies in einer leichten Hemmung der verzögert gleichrichtenden K^+ -Kanäle begründet, die das Membranpotential nach dem Aktionspotential auf den Ruhewert zurückbringen. In anderen Systemen sind I_h -Kanäle an der Integrationsleistung der Neuronen mitbeteiligt, indem sie hyperpolarisierenden Einflüssen entgegenwirken und depolarisierende Einflüsse begünstigen (siehe Pape 1996).

4.7 Abschließende Betrachtungen

Insgesamt zeigen die bei P-Neuronen des medizinischen Blutegels exprimierten I_h -Kanäle ähnliche Eigenschaften wie die anderer Gewebetypen. Die geringe Abhängigkeit der Aktivierung der I_h -Kanäle von zyklischen Nukleotiden und die schnelle Aktivierungskinetik deuten auf ihre Ähnlichkeit mit den HCN1-Kanälen von

Vertebraten hin. Die bei starker Hyperpolarisation zur Approximation der Aktivierungskinetik notwendigen zwei e-Funktionen könnten auf zwei unterschiedliche Typen von I_h -Kanälen bei P-Neuronen hindeuten.

Da die mechanosensorischen Neuronen des Blutegel-Nervensystems keine oszillatorische Aktivität zeigen und die I_h -Kanäle kaum zur Einstellung des Membranruhepotentials beitragen, bleibt die Frage nach der Funktion der Kanäle bei P-, T- und N-Neuronen offen. Diese Neuronen lösen bei Hautreizung Aktionspotentialsalven aus, die von einer starken Hyperpolarisation gefolgt werden, bedingt durch die Aktivierung der Na^+ - K^+ -Pumpe und/oder die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen. Möglicherweise begrenzen die I_h -Kanäle diese starke Hyperpolarisation.

5 Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurden Hyperpolarisations-aktivierte Kationenkanäle (I_h -Kanäle) identifizierter Neuronen in Segmentalganglien des medizinischen Blutegels, *Hirudo medicinalis*, mit Hilfe der Current-Clamp-Technik und Voltage-Clamp-Technik untersucht. Die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der I_h -Kanäle wurden bei P-Neuronen näher charakterisiert, da diese Zellen einen ausgeprägten I_h -Strom aufweisen und Voltage-Clamp-Experimenten zugänglich sind.

2. Bei Injektion negativer Ströme zeigten Retzius sowie T-, P- und N-Neuronen einen sogenannten Voltage-Sag, d.h. nach Erreichen der maximalen Hyperpolarisation kehrte das Membranpotential teilweise wieder auf den Ruhewert zurück. Der Voltage-Sag war in Gegenwart von extrazellulärem Cs^+ in millimolarer Konzentration unterdrückt, so daß davon auszugehen ist, daß er durch die Aktivierung von I_h -Kanälen verursacht wurde. AE-, Leydig- und AP-Neuronen wiesen dagegen keinen Voltage-Sag auf. Offenbar sind I_h -Kanäle bei diesen Zellen nicht exprimiert.

3. Bei P-Neuronen nahm die Geschwindigkeit der Aktivierung des I_h -Stroms mit der Amplitude der Hyperpolarisation zu. Bei Hyperpolarisation geringer Amplitude ließ sich die Aktivierungskinetik gut mit einer einfachen e-Funktion approximieren. Bei Hyperpolarisationen größerer Amplitude (≥ -80 mV) war eine befriedigende Approximation nur noch durch eine Summe von zwei e-Funktionen möglich. Dieses Ergebnis deutet auf eine komplexe Aktivierungskinetik oder auf das Vorkommen von zwei Populationen von I_h -Kanälen hin.

4. Die Abhängigkeit der Aktivität der I_h -Kanäle vom Membranpotential wurde mit Hilfe der Tail-Ströme bei einem Haltepotential von -50 mV bestimmt. Die Anpassung der Daten mit einer Boltzmann-Funktion ergab, daß die Aktivierung der I_h -Kanäle bei -30 mV

einsetzt, also bei einem Membranpotential deutlich positiver als das Ruhepotential. Die halbmaximale Aktivität der I_h -Kanäle war bei -65 mV erreicht und bei -100 mV waren die Kanäle vollständig aktiviert.

5. Das Umkehrpotential des I_h -Stroms betrug -32 mV. Daraus ließ sich mit Hilfe von Literaturwerten bezüglich der intra- und extrazellulären Konzentrationen von Na^+ und K^+ das Permeabilitätsverhältnis $p_K / p_{\text{Na}} = 4$ und das Leitwertverhältnis $g_K / g_{\text{Na}} = 2,3$ der I_h -Kanäle bestimmen.

6. In Na^+ -freier Lösung war der I_h -Strom fast vollständig unterdrückt und der Tail-Strom kehrte seine Richtung um. Die Abklingkinetik des Tail-Stroms war in Na^+ -freier Lösung deutlich verlangsamt. Die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle erfolgte jedoch ähnlich wie in physiologischer Lösung bei ca. -67 mV.

7. Die Absenkung der extrazellulären K^+ -Konzentration führte zur Unterdrückung des I_h -Stroms und umgekehrt wurde der I_h -Strom durch Erhöhung der K^+ -Konzentration verstärkt. Die Abklingkinetik des Tail-Stroms war bei erhöhter extrazellulärer K^+ -Konzentration deutlich verlangsamt.

8. Die starke Verminderung des I_h -Stroms in Na^+ -freier bzw. K^+ -freier Lösung zeigt, daß die Leitfähigkeit der I_h -Kanäle für K^+ von der Gegenwart von Na^+ abhängt und die Leitfähigkeit für Na^+ von der Gegenwart von K^+ . Diese Art der Abhängigkeit ist für sogenannte 'multi-ion-pores' typisch, bei denen die Bewegungen unterschiedlicher Ionensorten durch die Kanalpore voneinander abhängen.

9. Extrazelluläres Cs^+ hemmte den I_h -Strom mit einer halbmaximalen Konzentration von 0,3 mM innerhalb kurzer Zeit und vollständig reversibel. Mehrwertige Kationen, wie Ni^{2+} , Co^{2+} oder Ba^{2+} , übten auf den I_h -Strom keinen Effekt aus, wie auch das quarternäre Ammoniumion TEA. Der bradycarde Wirkstoff ZD7288, der bei

Vertebraten I_h -Ströme selektiv hemmt, wirkte nur in sehr hoher Dosierung hemmend, meistens jedoch toxisch.

10. Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide durch Applikation von nicht-hydrolysierbaren Analoga oder durch Hemmung von Phosphodiesterasen übte keinen Effekt auf die Abhängigkeit der I_h -Stromaktivierung vom Membranpotential aus. Diese Befunde zeigen, daß die I_h -Kanäle von P-Neuronen nicht durch zyklische Nukleotide beeinflusst werden.

11. Die Änderung des extrazellulären pH-Werts in saure Richtung (pH 6,8) führte zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve der I_h -Kanäle in negative Richtung. Bei extrazellulärer Alkalinisierung (pH 8,0) verschob sich die Aktivierungskurve ebenfalls in negative Richtung.

12. Die Aktivierung des I_h -Stroms erleichterte die Aktionspotential-Auslösung und die Nachhyperpolarisation wurde unterdrückt und verringert. Die Refraktärzeit nach einem Aktionspotential war bei aktiviertem I_h -Strom verlängert. Die Hemmung des I_h -Stroms durch Cs^+ beeinflusste die Aktionspotential-Auslösung nur geringfügig.

13. Die I_h -Kanäle der P-Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels weisen ähnliche Eigenschaften wie die I_h -Kanäle bei Vertebraten auf. Die Aktivierungskinetik und die hier indirekt nachgewiesene fehlende cAMP-Abhängigkeit deuten auf eine Verwandtschaft mit den HCN1-Kanälen von Vertebraten hin. Die physiologische Bedeutung der I_h -Kanäle und ihre Verteilung im Blutegel-Zentralnervensystem bleibt ungeklärt.

6 Literaturverzeichnis

Aidley, D.J. (1989) *The Physiology of Excitable Cells*. 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge

Akasu, T., Shoji, S., and Hasuo, H. (1993) Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Pflügers Arch.* 425: 109-116

Alonso, A. and Llinás, R.R. (1989) Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342: 175-177

Altomare, C., Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Viscomi, C., Moroni, A., and DiFrancesco, D. (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J. Gen. Physiol.* 117: 519-532

Angstadt, J.D. (1999) Persistent inward current in cultured Retzius cells of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A* 184: 49-61

Angstadt, J.D. and Calabrese, R.L. (1989) A hyperpolarization-activated inward current in heart interneurons of the medicinal leech. *J. Neurosci.* 9: 2846-2857

Araki, T., Ito, M., and Oshima, T. (1961) Potential changes produced by application of current steps in motoneurons. *Nature* 191: 1104-1105

Bailey, N.T. (1992) *Statistical Methods in Biology*. 2nd Edition, Cambridge University Press, Cambridge

- Barnes, S. and Hille, B. (1989) Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 94: 719-743
- Bayliss, D.A., Viana, F., Bellingham, M.C., and Berger, A.J. (1994) Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 71: 119-128
- Beavo, J.A. and Reifsnyder, D.H. (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes and the design of inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 150-155
- Bobker, D.H. and Williams, J.T. (1989) Serotonin augments the cationic current I_h in central neurons. *Neuron* 2: 1535-1540
- BoSmith, R.E., Briggs, I., and Sturgess, N.C. (1993) Inhibitory action of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization-activated inward current (I_h) in guinea pig dissociated sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* 110: 343-349
- Budde, T., White, J.A., and Kay, A.R. (1994) Hyperpolarization-activated Na^+K^+ current in neocortical neurons blocked by external proteolysis and internal TEA. *J. Neurophysiol.* 72: 2737-2742
- Campbell, D.L., Rasmusson, R.L., and Strauss, H.C. (1992) Ionic current mechanisms generating vertebrate primary cardiac pacemaker activity at the single cell level: an integrative view. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 279-302
- Catarsi, S., Scuri, R., and Brunelli, M. (1993) Cyclic AMP mediates inhibition of the Na^+K^+ electrogenic pump by serotonin in tactile sensory neurones of the leech. *J. Physiol. (Lond.)* 462: 229-242

- Chang, F., Cohen, I.S., DiFrancesco, D., Rosen, M.R., and Tromba, C. (1991) Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current I_f . *J. Physiol. (Lond.)* 440: 367-384
- Chen, C. (1997) Hyperpolarization-activated current (I_h) in primary auditory neurons. *Hear. Res.* 110: 179-190
- Corotto, F.S. and Michel, W.C. (1994) A hyperpolarization-activated conductance in lobster olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.* 72: 360-365
- Dawson, T.M. and Snyder, S.H. (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14: 5147-5159
- Deitmer, J.W. and Schlue, W.-R. (1981) Measurements of the intracellular potassium activity of Retzius cells in the leech central nervous system. *J. Exp. Biol.* 91: 87-101
- Dekin, M.S. (1993) Inward rectification and its effects on the repetitive firing properties of bulbospinal neurons located in the ventral part of the nucleus tractus solitarius. *J. Neurophysiol.* 70: 590-601
- Destexhe, A., Babloyantz, A., and Sejnowski, T.J. (1993) Ionic mechanisms for intrinsic slow oscillations in thalamic relay neurons. *Biophys. J.* 65: 1538-1552
- DiFrancesco, D. (1981) A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314: 359-376
- DiFrancesco, D. (1982) Block and activation of the pacemaker channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium, and rubidium. *J. Physiol. (Lond.)* 329: 485-507

DiFrancesco, D. (1985) The cardiac hyperpolarization-activated current, I_f . Origins and developments. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 46: 163-183

DiFrancesco, D. (1986) Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 324: 470-473

DiFrancesco, D. (1991) The contribution of the 'pacemaker' current (I_f) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 434: 23-40

DiFrancesco, D. (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 455-472

DiFrancesco, D. and Tortora, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-147

DiFrancesco, D., Porciatti, F., and Cohen, I.S. (1991) The effects of manganese and barium on the cardiac pacemaker current, I_f , in rabbit sino-atrial node myocytes. *Experientia* 47: 449-452

Edman, A., Gestrelus, S., and Grampp, W. (1987) Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J. Physiol. (Lond.)* 384: 671-690

Edman, A., Theander, S., and Grampp, W. (1992) Functional effects of a hyperpolarization-activated membrane current in the lobster stretch receptor neurone. *Acta Physiol. Scand.* 146: 221-232

Fain, G.L., Quandt, F.N., and Bastian, B.L. (1978) Contribution of a cesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272: 467-469

Frace, A.M., Maruoka, F., and Noma, A. (1992) Control of the hyperpolarization-activated cation current by external anions in rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol. (Lond.)* 453: 307-318

Gasparini, S. and DiFrancesco, D. (1997) Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Arch.* 435: 99-106

Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U.B. (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587

Gauss, R. and Seifert, R. (2000) Pacemaker oscillations in heart and brain: a key role for hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Chronobiol. Int.* 14: 453-469

Gerard, E. (1997) Elektrophysiologische Charakterisierung des Koffein-aktivierten Kationenkanals in identifizierten Blutegelneuronen, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Halliwel, J.V. and Adams, P.R. (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250: 71-92

Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd Edition, Sunderland, Mass, USA

Hintz, K. (1999) Elektrophysiologische Charakterisierung der Mg^{2+} -Regulation bei identifizierten Neuronen und Neuropil-Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ho, W.K., Brown, H.F., and Noble, D. (1994) High selectivity of the I_h channel to Na^+ and K^+ in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflügers Arch.* 426: 68-74

Ishi, T.M., Takano, M., Xie, L.-H., Noma, A., and Ohmori, H. (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274: 12835-12839

Ito, M. and Oshima, T. (1965) Electrical behaviour of the motoneurone membrane during intracellularly applied current steps. *J. Physiol. (Lond.)* 180: 607-635

Janigro, D., West, A., Nguyen, T.S., and Winn, H.R. (1994) Regulation of blood-brain barrier endothelial cells by nitric oxide. *Circ. Res.* 75: 528-538

Jansen, J.K.S. and Nicholls, J.G. (1973) Conductance changes, an electrogenic pump and the hyperpolarization of leech neurones follows impulses. *J. Physiol. (Lond.)* 229: 635-655

Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 235-257

Kamondi, A. and Reiner, P.B. (1991) Hyperpolarization-activated inward current in histaminergic tuberomammillary neurons of the rat hypothalamus. *J. Neurophysiol.* 66: 1902-1911

Kilb, W. and Luhmann, H.J. (2000) Characterization of a hyperpolarization-activated inward current in Cajal-Retzius cells in rat neonatal neocortex. *J. Neurophysiol.* 84: 1681-1691

Kopell, N. and LeMasson, G. (1994) Rhythmogenesis, amplitude modulation, and multiplexing in a cortical architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10586-10590

Larkman, P.M. and Kelly, J.S. (1992) Ionic mechanisms mediating 5-hydroxytryptamine- and noradrenaline-evoked depolarization of adult rat facial motoneurons. *J. Physiol. (Lond.)* 456: 473-490

Lucht, M. (1998) Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren und second-messenger-Kaskaden bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Nervensystems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofman, F., and Biel, M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591

Ludwig, A., Zong, X., Hofmann, F., and Biel, M. (1999) Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell. Physiol. Biochem.* 9: 179-186

Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hoffmann, F., and Biel, M. (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18: 2323-2329

Macagno, E.R. (1980) Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J. Comp. Neurol.* 190: 283-302

Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A., and DiFrancesco, D. (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 69: 2129-2136

Mayer, M.L. and Westbrook, G.L. (1983) A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 340: 19-45

Mercuri, N.B., Bonci, A., Calabresi, P., Tefani, A., and Bernardi, G. (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation channel I_h in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7: 462-469

McCormick, D.A. and Pape, H.C. (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 431: 291-318

Muller, K.J., Nicholls, J.G., and Stent, G.S. (1981) *Neurobiology of the Leech*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Munsch, T. and Deitmer, J.W. (1992) Calcium transients in identified leech glial cells in situ evoked by high potassium concentrations and 5-hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 167: 251-265

Munsch, T. and Pape, H.C. (1999) Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *J. Physiol. (Lond.)* 519: 493-504

Nicholls, J.G. and Kuffler, S.W. (1964) Extracellular space as a pathway for exchange between blood and neurons in the central nervous system of the leech: ionic composition of glial cells and neurons. *J. Neurophysiol.* 27: 645-671

Pape, H.C. (1992) Adenosine promotes burst activity in guinea pig geniculocortical neurones through two different ionic mechanisms. *J. Physiol. (Lond.)* 447: 729-753

Pape, H.C. (1994) Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons. *Neuroscience* 59: 363-373

Pape, H.C. (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 299-327

Pape, H.C. and McCormick, D.A. (1989) Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340: 715-718

Pape, H.C. and Mager, R. (1992) Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron* 9: 441-448

Pape, H.C., Budde, T., Mager, R., and Kisvarday, Z.F. (1994) Prevention of Ca²⁺-mediated action potentials in GABAergic local circuit neurones of rat thalamus by a transient K⁺ current. *J. Physiol. (Lond.)* 478: 303-322

Rainnie, D.G, Asproдини, E.K., and Shinnick-Gallagher, P. (1991) Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 66: 986-998

Risman, C.A., David, E.S., Storey, K.B., and Crerar, M.M. (1991) Glucose and caffeine regulation of liver glycogen phosphorylase activity in the freeze-tolerant wood frog *Rana sylvatica*. *Biochem. Cell Biol.* 69: 251-255

Santoro, B., Grant, S.G., Bartsch, D., and Kandel, E.R. (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14815-14820

Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Tibbs, G.R. (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-729

Santoro, B. and Tibbs, G.R. (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 868: 741-764

Santoro, B., Chen, S., Lüthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, G.R., and Siegelbaum, S.A. (2000) Molecular and functional heterology of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* 20: 5264-5275

Schlue, W.-R. and Deitmer, J.W. (1980) Extracellular potassium in neuropile and nerve cell body region of the leech central nervous system. *J. Exp. Biol.* 87: 23-43

Schlue, W.-R. and Deitmer, J.W. (1984) Potassium distribution and membrane potential of the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.* 51: 689-704

Schlue, W.-R. (1991) Effects of ouabain on intracellular ion activities of sensory neurons of the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.* 65: 736-746

Schoppe, J., Hochstrate, P., and Schlue, W.-R. (1997) Caffeine mediates cation influx and intracellular Ca^{2+} release in leech P neurones. *Cell Calcium* 22: 385-397

Seifert, R., Scholten, A., Mincheva, A., Lichter, P., and Kaupp, U.B. (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9391-9396

Shin, K.S., Rothberg, B.S., and Yellen, G. (2001) Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J. Gen. Physiol.* 117: 91-101

Siegenbeck van Heukelom, J. (1991) Role of the anomalous rectifier in determining membrane potentials of mouse muscle fibres at low extracellular K^+ . *J. Physiol. (Lond.)* 434: 549-560

Solomon, J.S., Doyle, J.F., Burkhalter, A., and Nerbonne, J.M. (1993) Differential expression of hyperpolarization-activated currents reveals distinct classes of visual cortical projection neurons. *J. Neurosci.* 13: 5082-5091

Solomon, J.S. and Nerbonne, J.M. (1993) Hyperpolarization-activated currents in isolated superior colliculus-projecting neurons from rat visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 462: 393-420

Stevens, D.R., Seifert, R., Bufe, B., Müller, F., Kremmers, E., Gauss, R., Meyerhoff, W., Kaupp, U.B., and Lindemann, B. (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413: 631-635

Sunderland, A.J., Leake, L.D., and Walker, R.J. (1980) Structure-activity studies of the amine receptor on the Retzius cells of the leeches *Hirudo medicinalis* and *Haemopsis sanguisa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C: 347-352

Travagli, R.A. and Gillis, R.A. (1994) Hyperpolarization-activated currents, I_H and I_{KIR} , in rat dorsal motor nucleus of vagus neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 71: 1308-1317

Ukena, D., Schudt, C., and Sybrecht, G.W. (1993) Adenosine receptor-blocking xanthines as inhibitors of phosphodiesterase isozymes. *Biochem. Pharmacol.* 45: 847-851

Wollmuth, L.P. and Hille, B. (1992) Ionic selectivity of I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamander. *J. Gen. Physiol.* 100: 749-765

Womble, M.D. and Moises, H.C. (1993) Hyperpolarization-activated currents in neurons of the rat basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 70: 2056-2065

Wuttke, W.A. and Berry, M.S. (1992) Modulation of inwardly rectifying Na^+K^+ channels by serotonin and cyclic nucleotides in salivary gland cells of the leech, *Haementeria*. *J. Membrane Biol.* 127: 57-68

Yatani, A., Okabe, K., Codina, J., Birnbaumer, L., and Brown, A.M. (1990) Heart rate regulation by G proteins acting on the cardiac pacemaker channel. *Science* 249: 1163-1166

7 Abbildungen

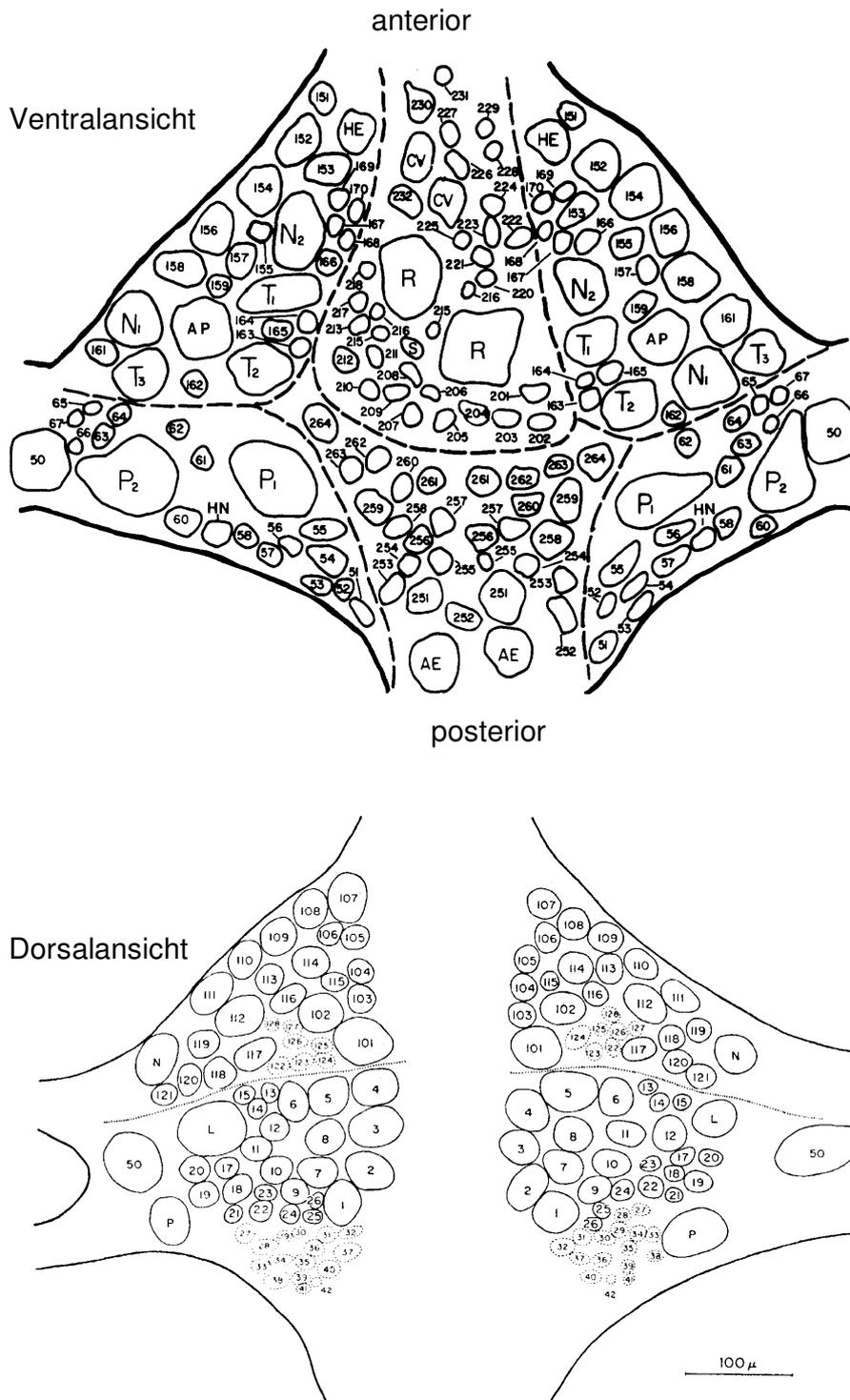


Abbildung 1

Schemazeichnung eines Blutegel-Segmentalganglions in Ventral- und Dorsalansicht

Wiedergegeben sind die Umriss der Neuron-Zellkörper eines Segmentalganglions im mittleren Bereich des Blutegelkörpers mit ihren üblichen Bezeichnungen (R, Retzius). Die gestrichelten Linien markieren die Grenzen der durch Bindegewebslamellen separierten Neuronenpakete (nach Muller et al. 1981). Es ist anzumerken, daß die Positionen der Neuron-Zellkörper von Präparat zu Präparat stark variieren können. In der Regel war jedoch eine sichere Identifizierung an Hand charakteristischer elektrophysiologischer Merkmale möglich.

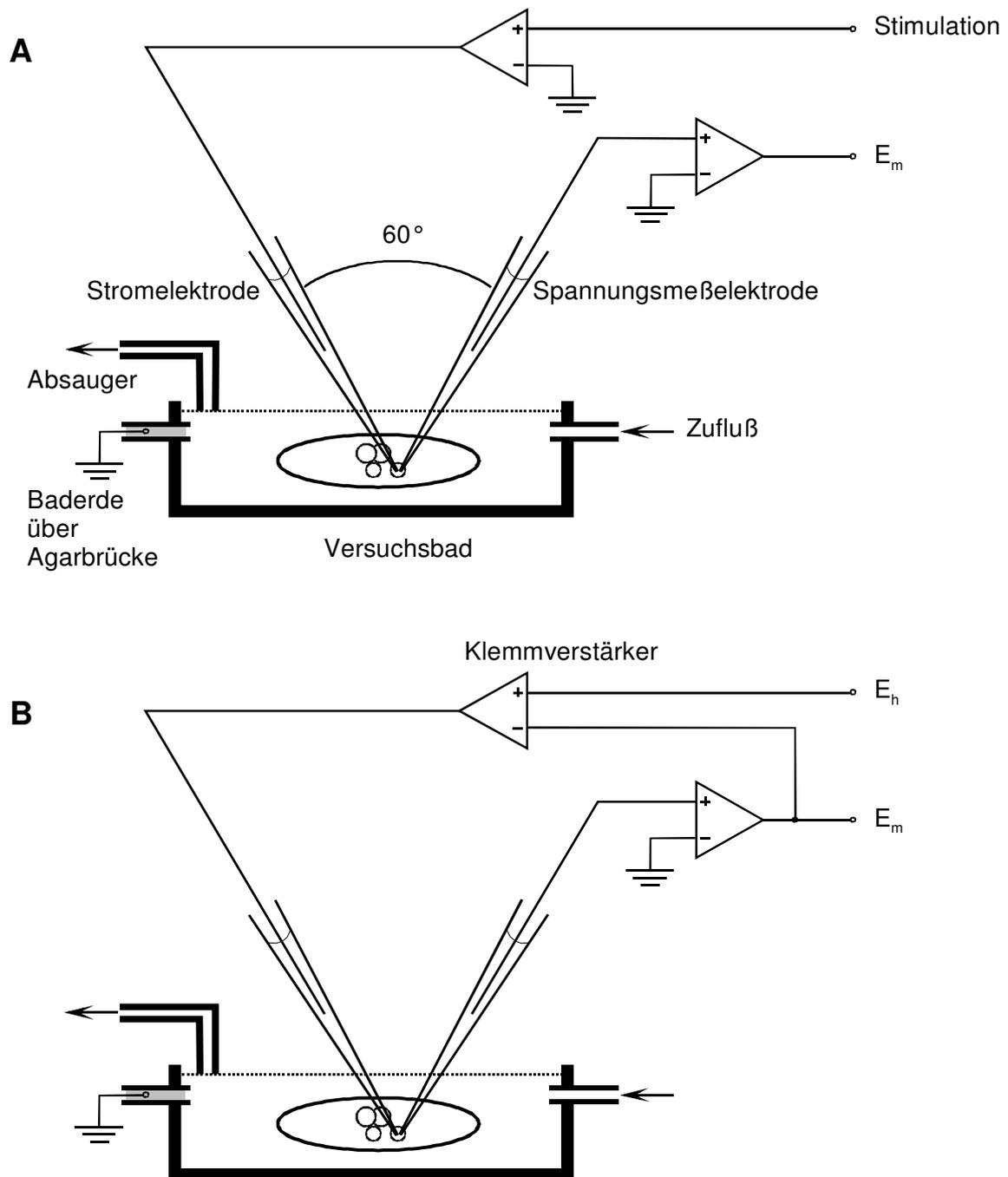


Abbildung 2

Schematischer Aufbau der Versuchsanordnung

A) Current-Clamp-Technik: Über die Stromelektrode wurde ein definierter Strom injiziert und die dadurch hervorgerufene E_m -Verschiebung über die Spannungsmeßelektrode registriert.

B) Voltage-Clamp-Technik: Das von der Spannungsmeßelektrode registrierte E_m wurde auf den invertierenden Eingang des Klemmverstärkers gelegt, der proportional zur Differenz zwischen E_m und dem eingestellten Haltepotential (E_h) Strom in die Zelle injizierte. Wegen der hohen Empfindlichkeit und geringen Ansprechzeit des Klemmverstärkers ist die Differenz zwischen E_h und E_m minimal, d. h. E_m wird praktisch auf E_h geklemmt.

Der von Strom- und Spannungsmeßelektrode eingeschlossene Winkel betrug 60° . In dieser Konfiguration waren Störungen in Folge einer Signalübertragung zwischen beiden Elektroden minimal.

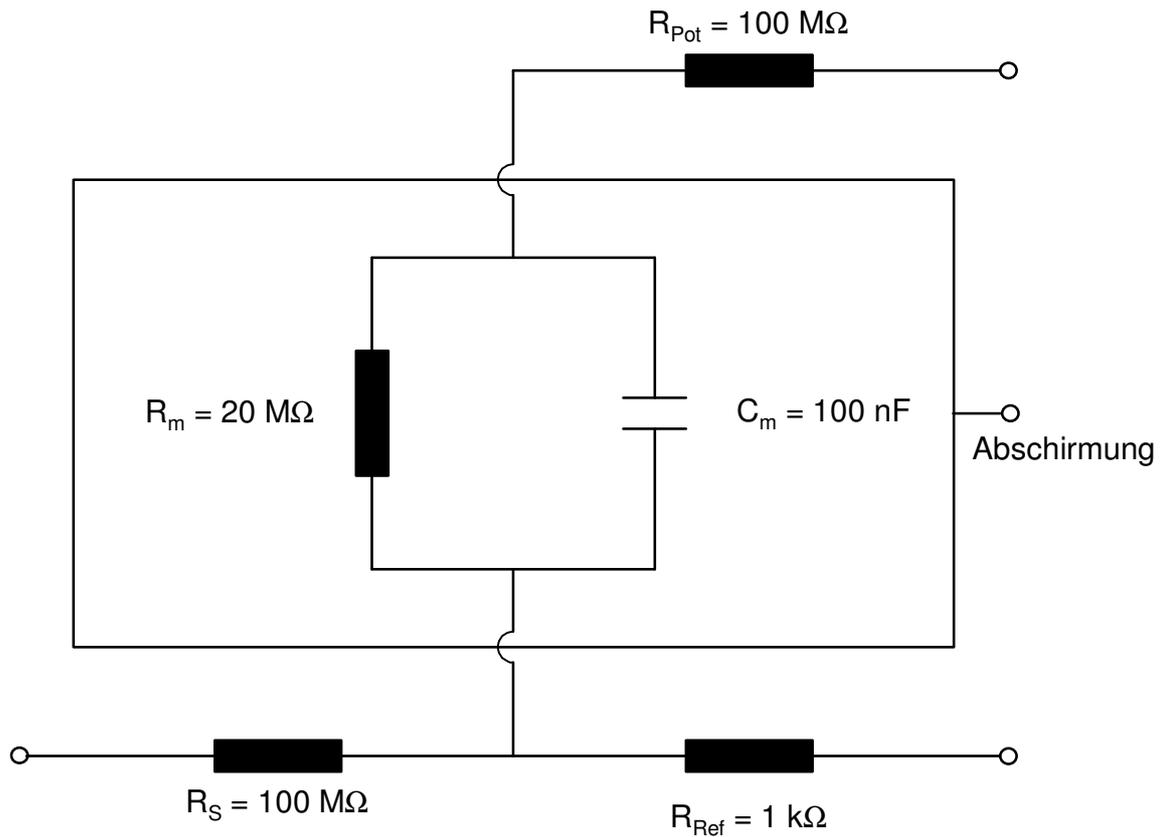


Abbildung 3

Elektronisches Zellmodell

Mit Hilfe dieses Zellmodells wurde die Meßapparatur regelmäßig auf ihre Funktionstüchtigkeit geprüft. Die Widerstände und die Kapazität spiegeln etwa die Verhältnisse bei Messungen an P-Neuronen wider: R_m , Membranwiderstand; C_m , Membrankapazität; R_{Pot} , Widerstand der Spannungsmeßelektrode; R_S , Widerstand der Stromelektrode; R_{Ref} , Widerstand der Referenzelektrode.

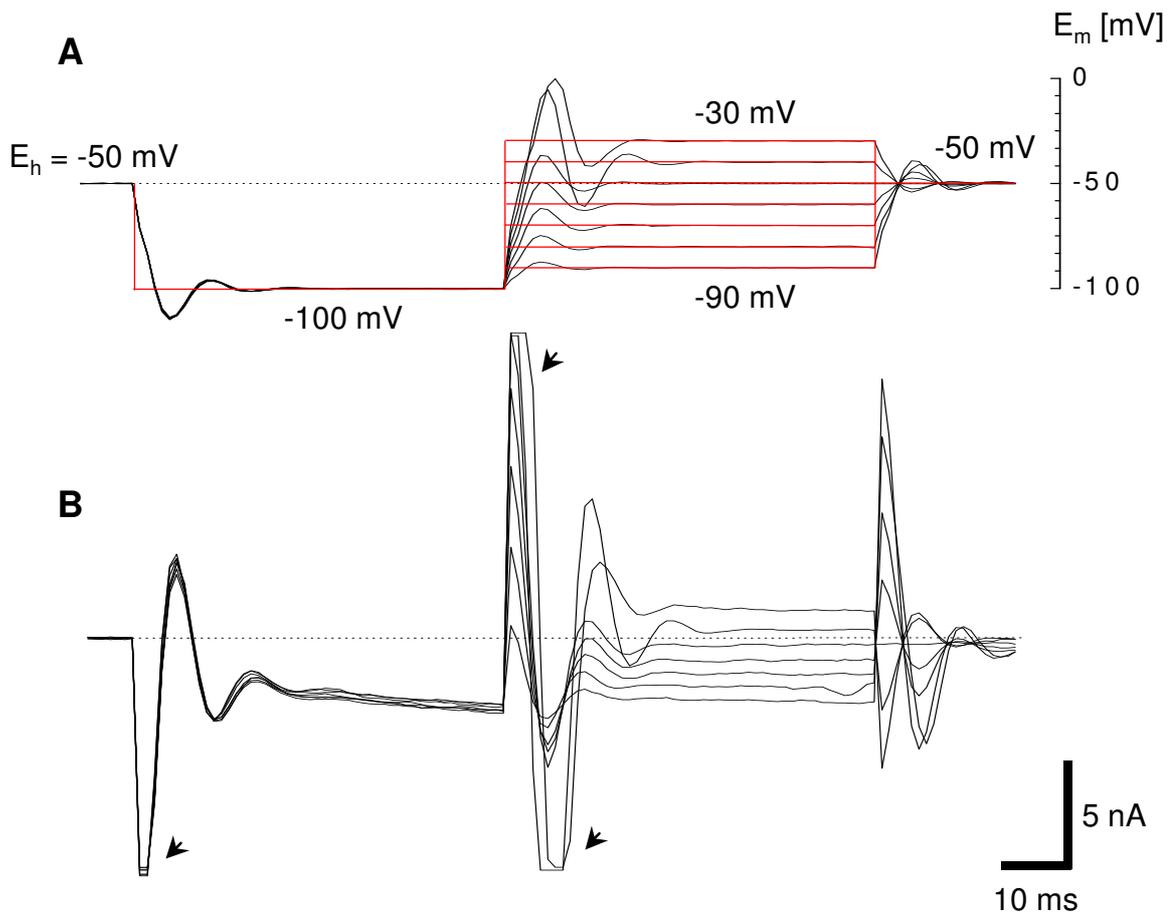


Abbildung 4

Registrierbeispiel der Oszillationen von Membranpotential und Haltestrom nach Verstellung von E_h

Sieben überlagerte Einzelregistrierungen, die im Abstand von ca. 30 s an einer P-Zelle gewonnen wurden.

A) Membranpotential (E_m) bei Verstellung von E_h (rote Linien): Zuerst wurde das Haltepotential für 50 ms von -50 auf -100 mV verstellt. Danach erfolgte eine Verstellung auf -90, -80, -70, -60, -50, -40 oder -30 mV für dieselbe Zeit und schließlich der Rücksprung auf -50 mV. Die Spuren zeigen, daß das Membranpotential erst nach einer Einschwingphase von etwa 20 ms mit E_h übereinstimmte, wobei die anfängliche Abweichung mit der Amplitude der Potential-Verstellung korreliert war.

B) Resultierende Halteströme: Direkt nach Verstellung des Haltepotentials traten Oszillationen des Haltestroms auf, die ebenfalls nach ca. 20 ms beendet waren. Die Amplituden dieser Oszillationen waren um ein Vielfaches größer als die Halteströme, die zur stabilen Klemmung des Membranpotentials erforderlich waren. Die Spitzen der Oszillationen lagen außerhalb des Meßbereichs und sind daher abgeschnitten (Pfeile).

Die Oszillationen des Membranpotentials und des Haltestroms waren apparativ bedingt und ließen sich nicht weiter unterdrücken. Die Oszillationen wurden in den nachfolgenden Abbildungen nicht dargestellt.

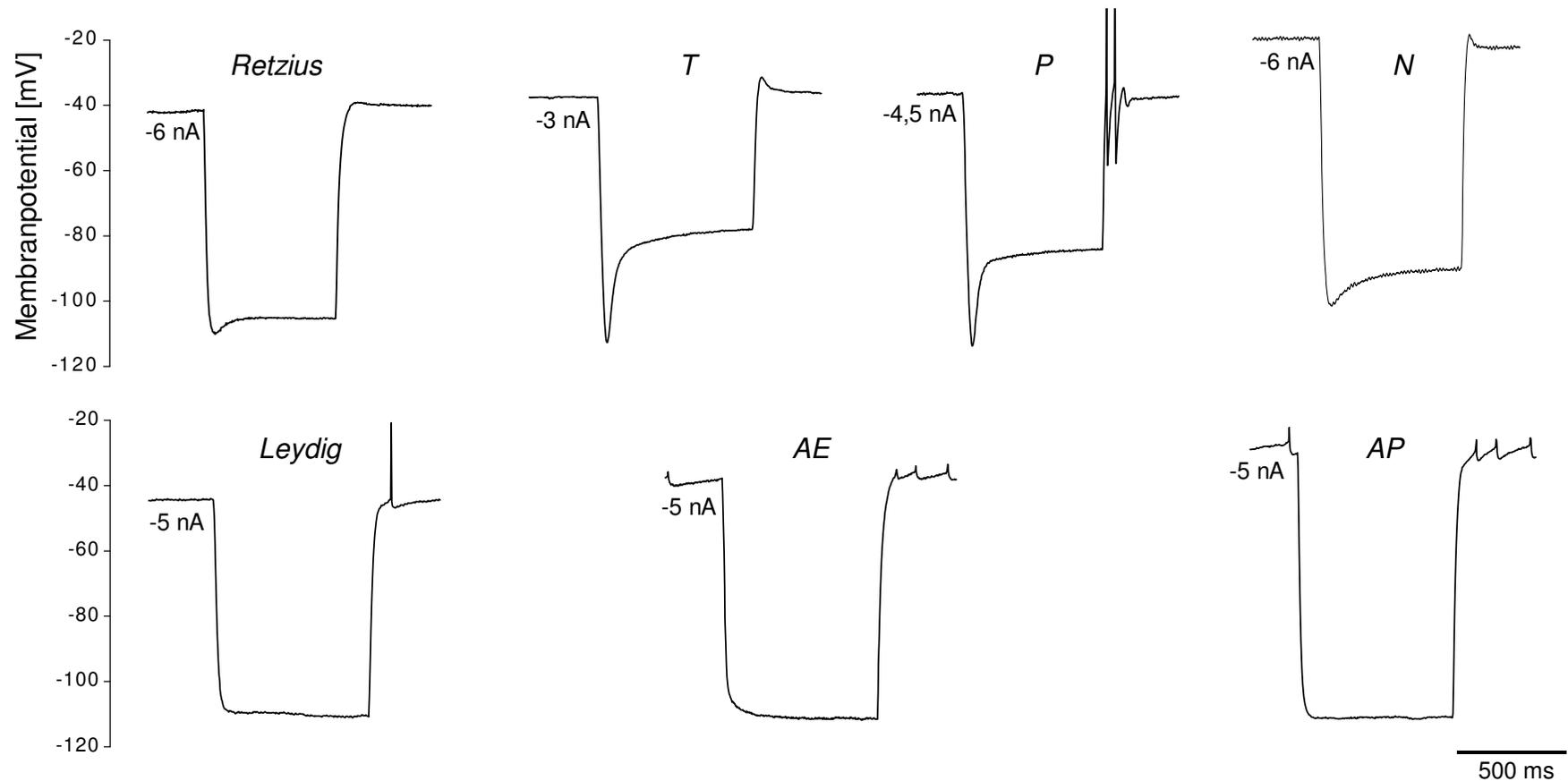


Abbildung 5

Registrierbeispiele des Voltage-Sag bei identifizierten Blutegel-Neuronen

Bei Injektion eines konstanten, hyperpolarisierenden Stroms trat bei Retzius-Neuronen sowie bei den mechanosensorischen T-, P- und N-Neuronen ein sog. Voltage-Sag auf, d. h. nach Erreichen der maximalen Hyperpolarisation repolarisierte das Membranpotential teilweise. Ausprägung und Kinetik des Voltage-Sag waren bei den einzelnen Zellen stark unterschiedlich. Nach Abschalten des Injektionsstroms war das Membranpotential transient in depolarisierende Richtung verschoben, wobei das P-Neuron zwei Aktionspotentiale auslöste. Bei Leydig-, AE- und AP-Neuronen war ein Voltage-Sag nicht zu beobachten. Diese drei Zelltypen waren spontan aktiv. Der injizierte Strom (-3 bis -6 nA) wurde so gewählt, daß die Membran der Zellen anfänglich auf mindestens -110 mV hyperpolarisiert wurde. Die Aktionspotentiale bei dem Leydig- und dem P-Neuron sind nicht in ihrer vollen Amplitude dargestellt.

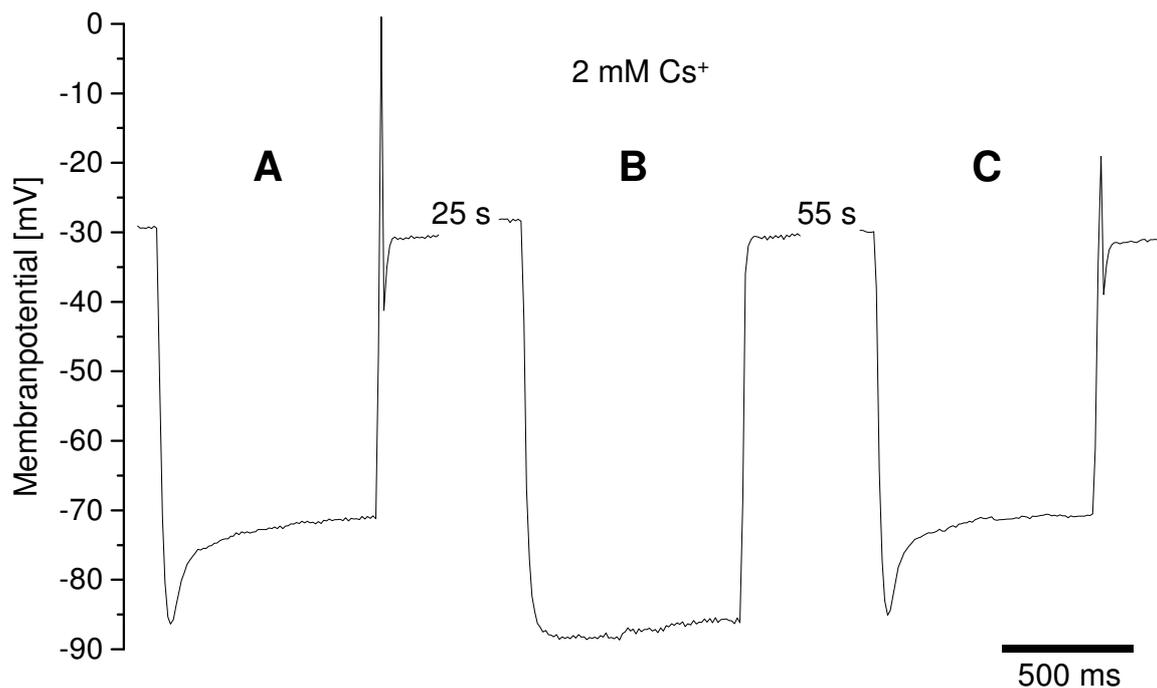


Abbildung 6

Registrierbeispiel zur Unterdrückung des Voltage-Sag durch Cs⁺

A) Wirkung eines hyperpolarisierenden Strompulses (-3 nA, 800 ms) auf das Membranpotential einer P-Zelle.

B) Unmittelbar nach Registrierung der Spur in A wurden der Badlösung 2 mM Cs⁺ zugesetzt und nach ca. 25 s wurde der gleiche Strompuls erneut appliziert. In Gegenwart von Cs⁺ war zumindest die schnelle Phase des Voltage-Sag vollständig unterdrückt.

C) Die Cs⁺-Wirkung war innerhalb von einer Minute völlig reversibel (siehe Abb. 19).

Nach Abschalten des Injektionsstroms löste das P-Neuron in Cs⁺-freier Lösung jeweils ein Aktionspotential aus, nicht jedoch in Gegenwart von Cs⁺. Die Amplituden der Aktionspotentiale sind wegen der geringen Aufzeichnungsfrequenz von 1 kHz hinsichtlich ihrer Amplitude nicht vollständig dargestellt. Die Zugabe von Cs⁺ übte nur einen geringen Effekt auf das Membranpotential aus; häufig trat eine schwache Depolarisation um wenige Millivolt auf.

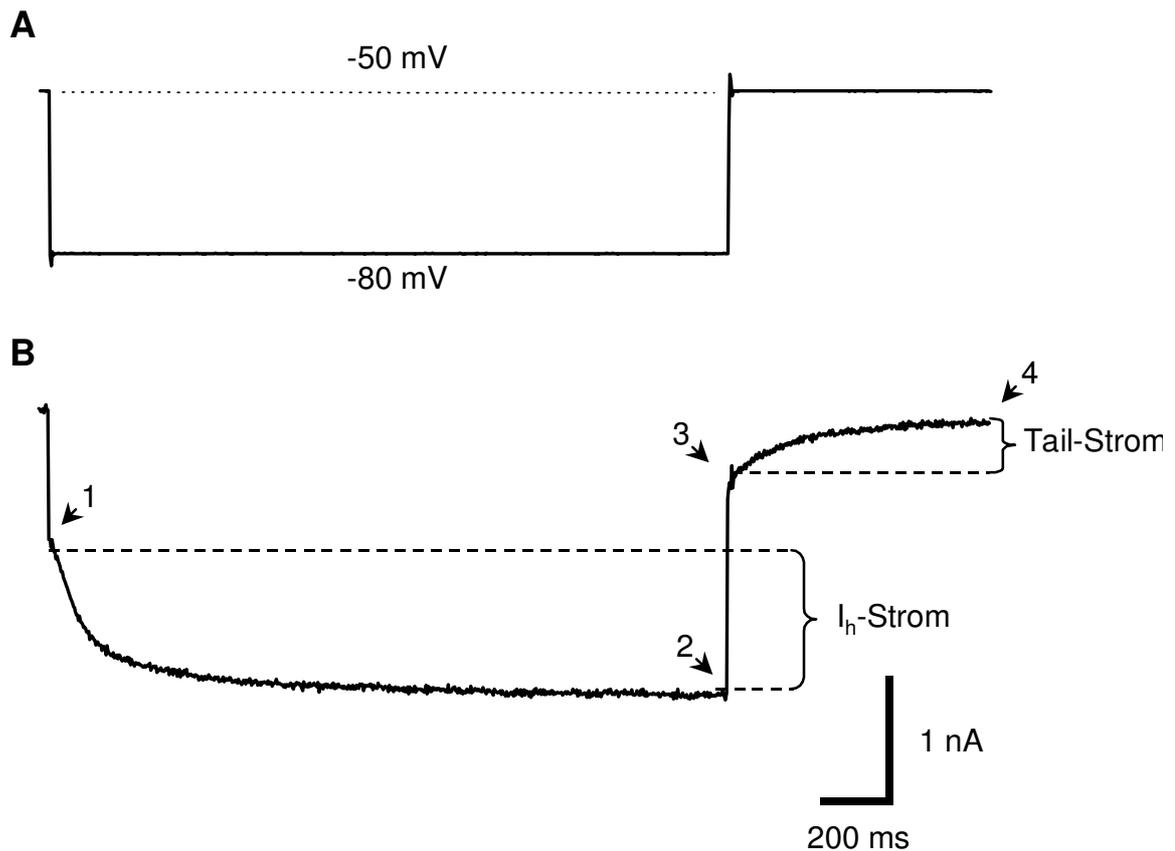


Abbildung 7

Registrierbeispiel des Hyperpolarisations-aktivierten Stroms bei P-Neuronen

Die Verstellung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV (A) führte zur langsamen Aktivierung eines anhaltenden Stroms (B), der auf der Aktivierung von Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanälen (I_h -Kanäle) beruhte, wie die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften dieses Stroms eindeutig zeigten.

Die Amplitude des I_h -Stroms entspricht der Differenz zwischen dem 'passiven' Membranstrom zu Beginn des Potentialsprungs (1) und dem Membranstrom an dessen Ende (2). Nach Rückkehr auf das Ausgangspotential trat ein langsam abklingender Tail-Strom auf (3), der die Deaktivierung der I_h -Kanäle widerspiegelt. Nach Schließen der I_h -Kanäle erreichte der Haltestrom den Wert vor dem Potentialsprung (4).

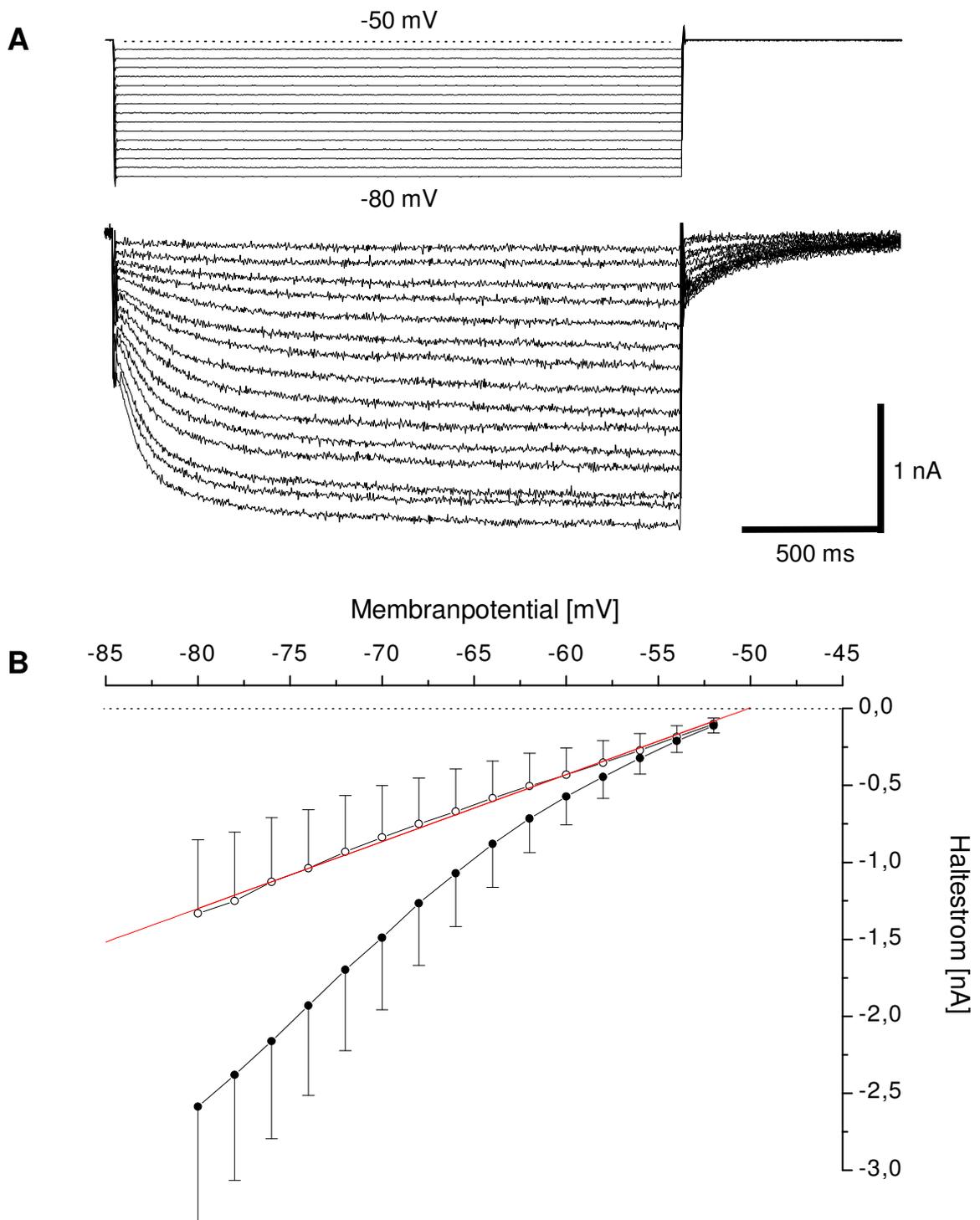


Abbildung 8

Spannungsabhängigkeit des passiven und des I_h -abhängigen Membranstroms

A) Registrierbeispiel: Haltestrome bei sprunghafter Verstellung des Haltepotentials von -50 mV auf -52 bis -80 mV für jeweils 2 s, aufgenommen im Abstand von 30 s. Die Ausbildung des I_h -Stroms war bereits bei Haltepotentialen wenig negativer als -50 mV erkennbar. Mit zunehmender Negativierung des Haltepotentials wurde der I_h -Strom immer schneller aktiviert und seine Amplitude nahm kontinuierlich zu. Der Tail-Strom nahm ebenfalls zu, tendierte jedoch zur Sättigung. Die Abklingkinetik des Tail-Stroms war vom zuvor eingestellten Haltepotential unabhängig.

B) Auftragung des Zusammenhangs zwischen Membranpotential und Haltestrom zu Beginn des Potentialsprungs (○) und kurz vor dessen Ende, nach Aktivierung des I_h -Stroms (●; Mittelwerte \pm SD, $n = 23$). Die Standardabweichungen sind zur besseren Übersicht nur in eine Richtung aufgetragen. Die Abhängigkeit des Haltestroms vom Membranpotential zu Beginn des Potentialsprungs ließ sich durch eine Gerade befriedigend approximieren, während der Strom am Ende des Potentialsprungs mit wachsender Negativierung des Haltepotentials überproportional zunahm.

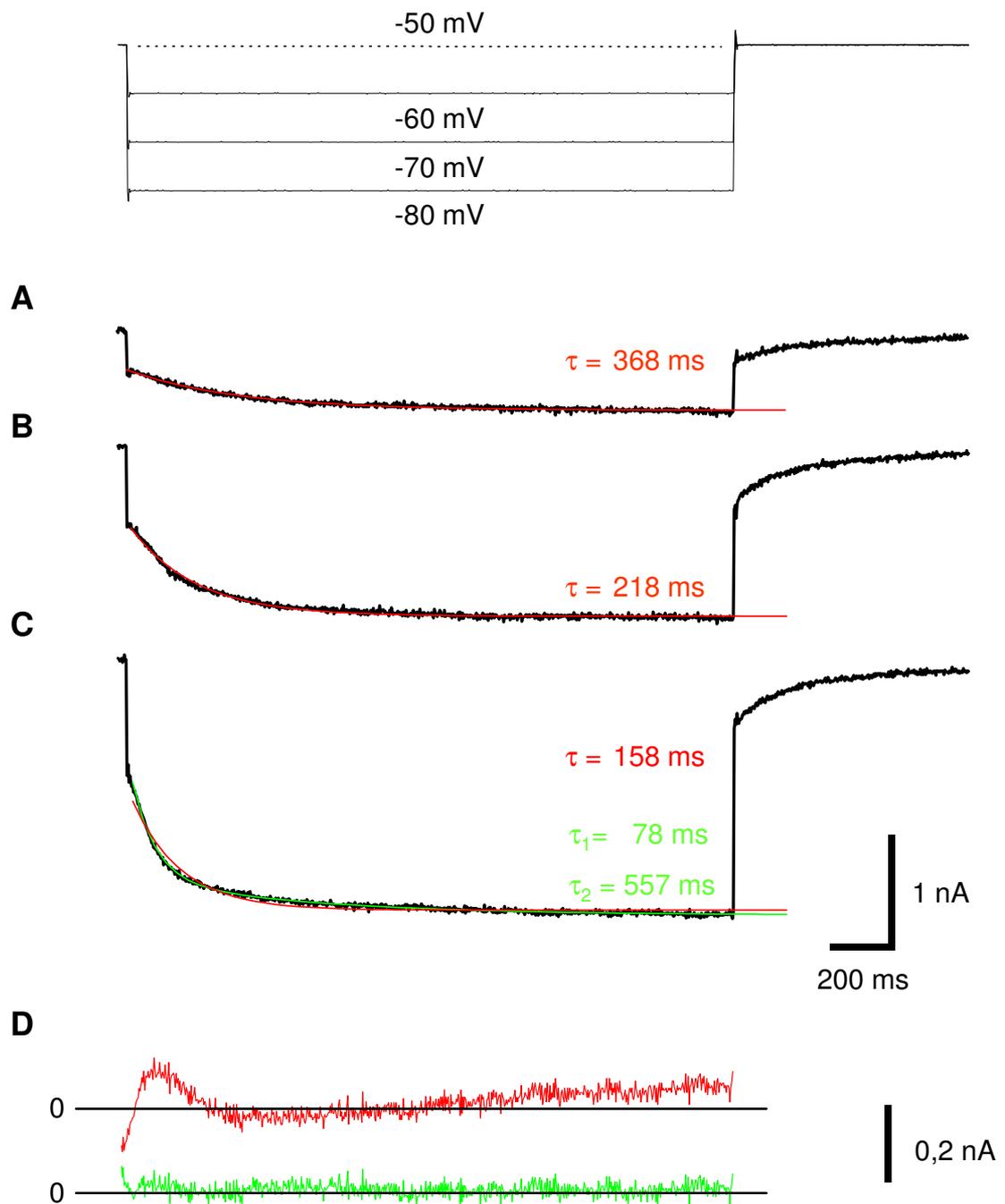


Abbildung 9

Abhängigkeit der Aktivierungsgeschwindigkeit des I_h -Stroms vom Membranpotential

Mit zunehmender Hyperpolarisation erfolgte die Aktivierung des I_h -Stroms immer schneller. Bei geringer Hyperpolarisation ließ sich die Aktivierungskinetik gut mit einer einfachen e-Funktion approximieren (rote Linie in A, $E_h = -60$ mV). Bei stärkerer Hyperpolarisation wurde diese Approximation zunehmend schlechter (B, -70 mV; C, -80 mV). Eine befriedigende Anpassung ließ sich jedoch mit einer Summe von zwei e-Funktionen erreichen (grüne Linie in C). Die Amplituden des I_h -Stroms betragen bei Approximation mit einer e-Funktion -0,38 nA (A), -0,83 nA (B) bzw. -1,26 nA (C). Die Approximation mit zwei e-Funktionen in C ergab eine I_h -Amplitude von -0,93 nA für die schnelle (τ_1) und von -0,33 nA für die langsame Komponente (τ_2). In D sind die Abweichungen der in C berechneten Stromkurven von der gemessenen Kurve dargestellt.

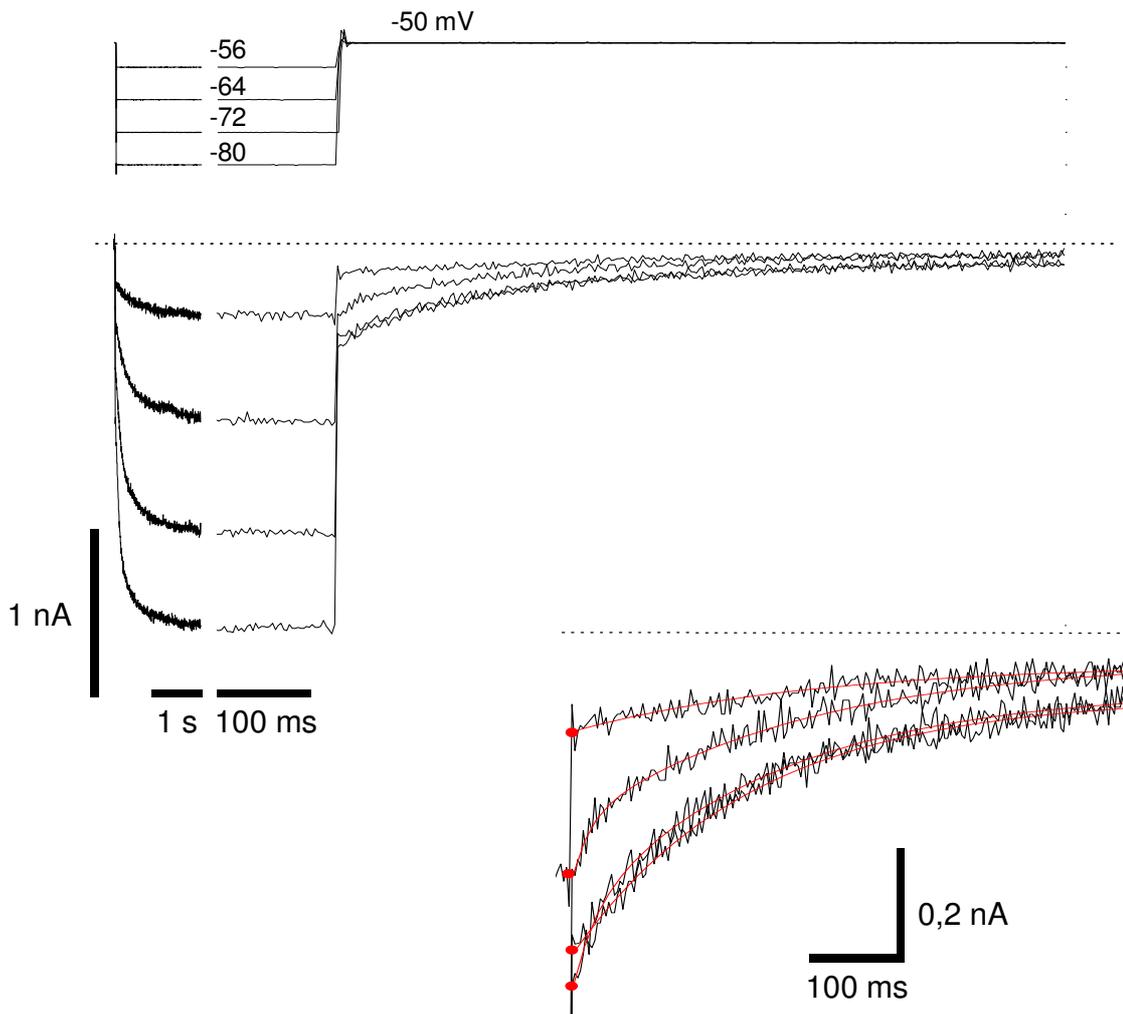


Abbildung 10

Abhängigkeit der Aktivität der I_h -Kanäle von E_m

Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 mV auf -56, -64, -72 und -80 mV für 2 s. Die Stromspuren wurden kurz vor Ende des Potentialsprungs und danach um einen Faktor 20 zeitlich gedehnt, um die Tail-Ströme hervorzuheben. Zur Verdeutlichung wurden die Tail-Ströme im Inset noch vergrößert dargestellt. Die Kreise markieren die visuell vorgenommene Extrapolation der Tail-Ströme auf den Zeitpunkt des Potential-Rücksprungs. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Haltestrom bei einem Haltepotential von -50 mV vor den Potentialsprüngen. Die roten Kurven geben die Approximationen der jeweiligen Spur mit Hilfe einer e-Funktion wieder, die Zeitkonstante der Deaktivierung des I_h -Stroms lag zwischen 150 und 230 ms.

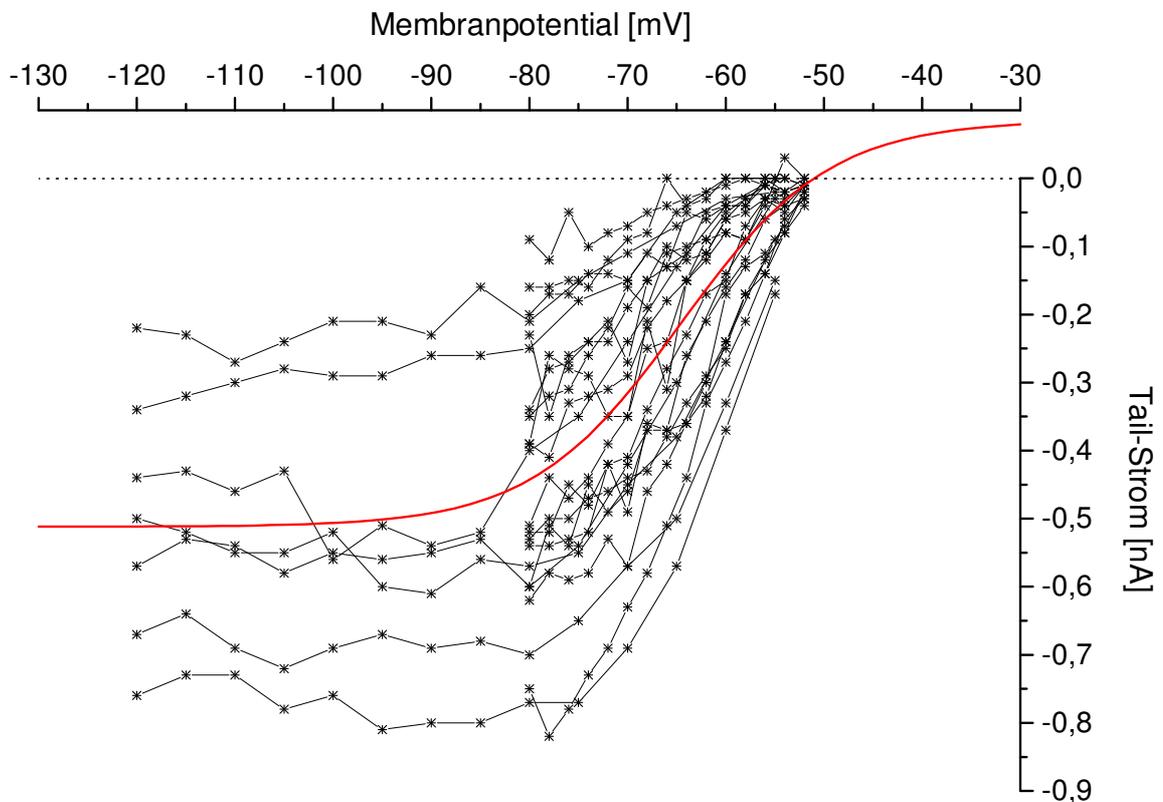


Abbildung 11

Abhängigkeit der Aktivität der I_h -Kanäle vom Membranpotential

Abhängigkeit des Tail-Stroms bei einem Haltepotential von -50 mV vom zuvor, während des Potentialsprungs, eingestellten Haltepotential. Dargestellt sind die an 21 P-Neuronen gewonnenen Ergebnisse, davon 7 Zellen mit einem Meßbereich bis -120 mV (5 mV Intervalle) und die übrigen Zellen bis -80 mV (2 mV Intervalle). Die Variabilität des Tail-Stroms bei den einzelnen Zellen war hoch (z.B. -0,1 bis -0,8 nA bei einem Haltepotential von -80 mV).

Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung sämtlicher Meßdaten mit einer Boltzmann-Funktion dar. Danach beginnen die I_h -Kanäle schon bei Membranpotentialen wenig negativer als -30 mV zu aktivieren. Die halbmaximale Aktivierung war bei -65 mV erreicht und bei ca. -100 mV waren die I_h -Kanäle vollständig aktiviert.

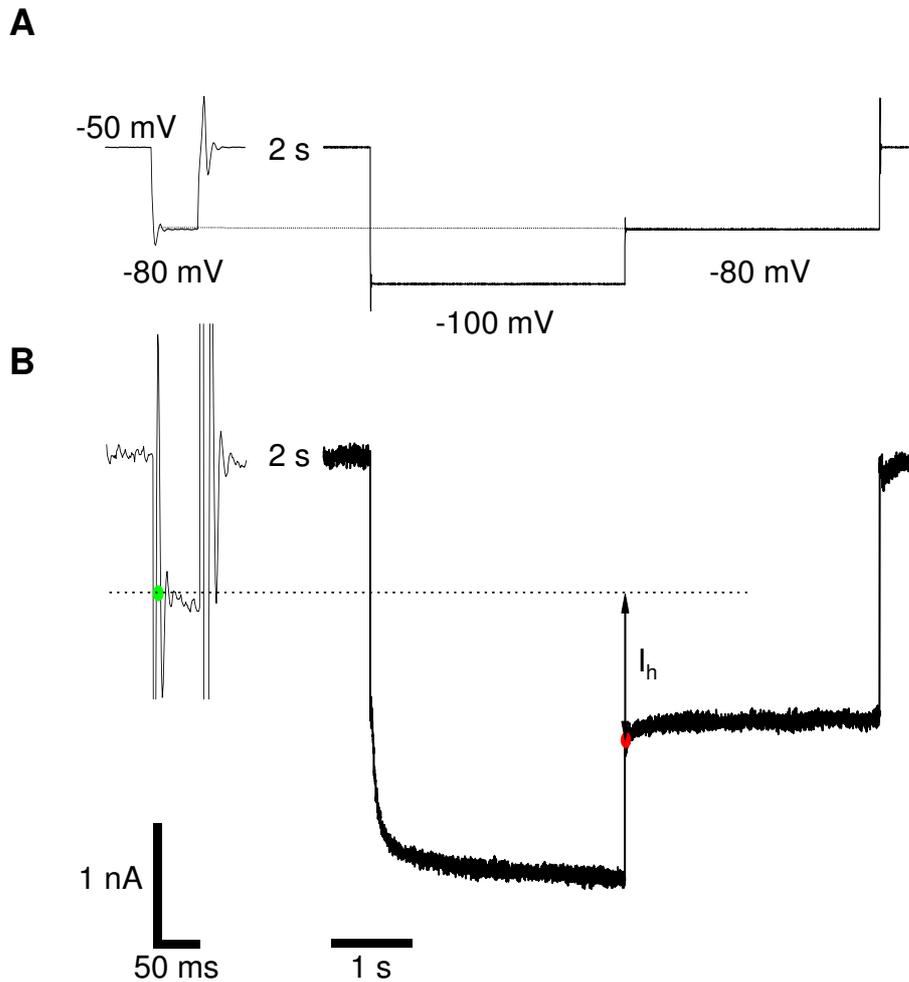


Abbildung 12

Experimentelles Protokoll zur Bestimmung des Umkehrpotentials des I_h -Stroms

Zur Ermittlung des I_h -unabhängigen, passiven Membranstroms bei einem gegebenen Testpotential (hier -80 mV) wurde das Haltepotential für 50 ms entsprechend verstellt (A). Der Haltestrom nahm in dieser Zeit geringfügig zu (B), vermutlich bedingt durch die bereits einsetzende Aktivierung der I_h -Kanäle. Der passive Membranstrom wurde durch visuelle Extrapolation der Stromkurve auf den Beginn des Potentialprungs bestimmt (grüner Punkt in B). Nach 2 s wurde das Haltepotential für 3 s auf -100 mV verstellt, um die I_h -Kanäle vollständig zu aktivieren. Anschließend wurde das Haltepotential erneut auf das Testpotential gebracht, um nun den Membranstrom bei vollständig aktivierten I_h -Kanälen zu ermitteln (roter Punkt). Die Differenz zwischen diesem Strom und dem I_h -unabhängigen Membranstrom (gestrichelte Linie) ergibt den maximalen I_h -Strom bei einem Haltepotential von -80 mV.

Dieses Pulsprogramm wurde im Abstand von 10 s wiederholt durchlaufen, um den maximalen I_h -Strom bei Testpotentialen von -30 , -40 ... -90 mV zu bestimmen (siehe Abb. 13).

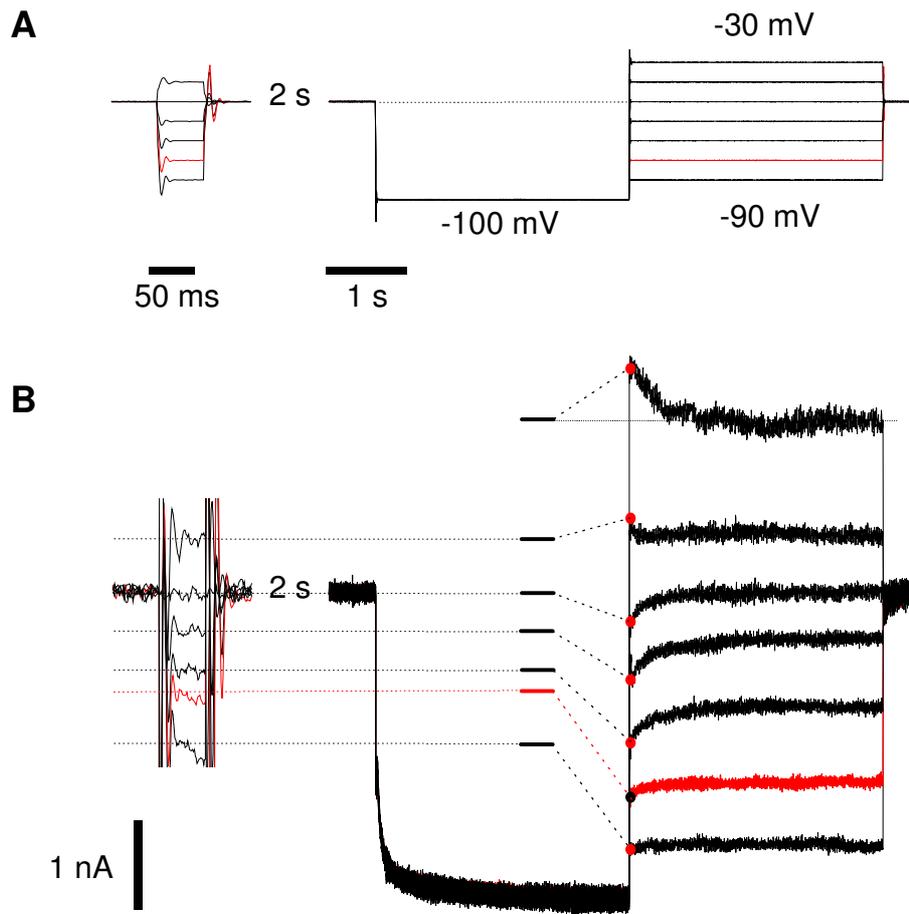


Abbildung 13

Registrierbeispiel zur Bestimmung des Umkehrpotentials des I_h -Stroms

Wiedergegeben sind die überlagerten Pulsprotokolle (A) und die zugeordneten Halteströme (B) zur Bestimmung des maximalen I_h -Stroms bei unterschiedlichen Haltepotentialen. Das zur Ermittlung des I_h -Stroms bei -80 mV verwendete Protokoll und der zugeordnete Haltestrom sind rot hervorgehoben (vergl. Abb. 12). Die horizontalen Balken in B bezeichnen die durch die 50 ms-Vorpulse ermittelten passiven Membranströme.

Bei einem Haltepotential von -30 mV konnte der passive Membranstrom wegen ausgeprägter Oszillation des Haltestroms nicht durch einen Vorpuls bestimmt werden. Der passive Membranstrom bei einem Haltepotential von -30 mV ist jedoch identisch mit dem Haltestrom nach Abklingen des Tail-Stroms, da bei diesem Potential die I_h -Kanäle vollständig deaktivieren (siehe Abb. 11). Die anhand der wiedergegebenen Registrierungen ermittelten I_h -Ströme sind in Abb. 14 hervorgehoben.

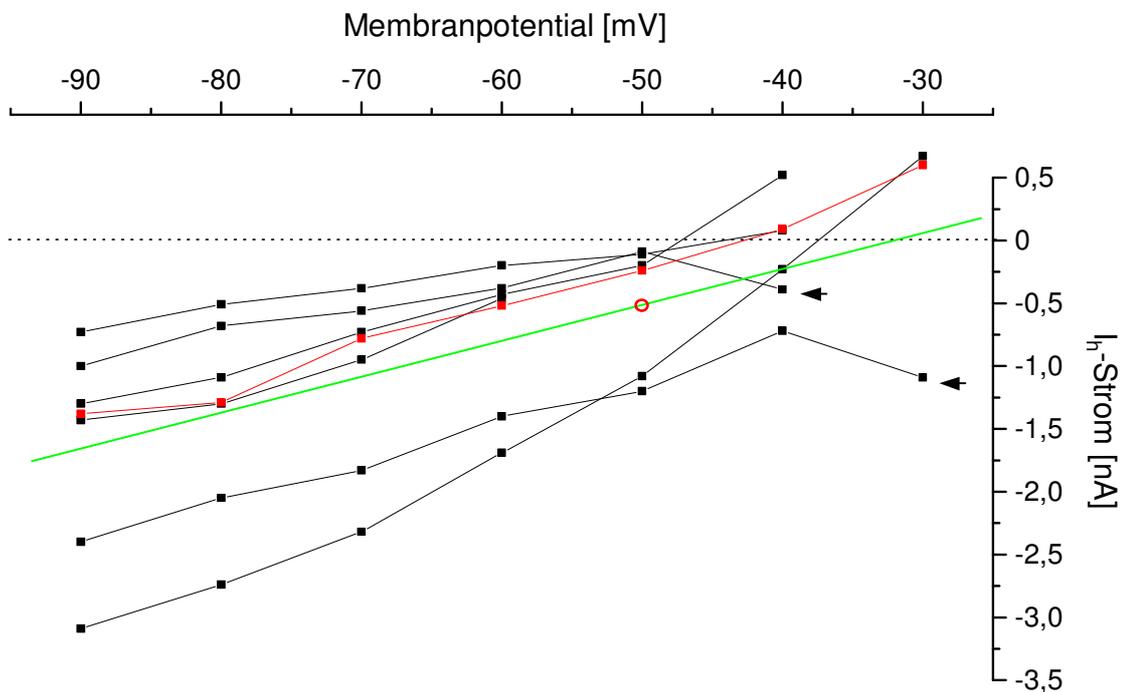


Abbildung 14

Auftragung der Strom-Spannungskennlinien zur Bestimmung des Umkehrpotentials des I_h -Stroms

Aufgetragen sind die bei sieben P-Neuronen bestimmten maximalen I_h -Ströme in Abhängigkeit vom Membranpotential sowie der maximale Tail-Strom bei einem Haltepotential von -50 mV ($-0,5$ nA, offener roter Kreis; siehe Abb. 11). Die aus dem in Abb. 13 dargestellten Experiment erhaltenen Meßwerte sind rot hervorgehoben. Bei zwei Zellen wurde keine Umkehr des I_h -Stroms beobachtet (Pfeile), bei einer Zelle konnte der I_h -Strom nur zwischen -90 und -60 mV bestimmt werden. Bei den übrigen Zellen kehrte der I_h -Strom zwischen -38 und -47 mV seine Richtung um (Mittelwert: -42 ± 5 mV, $n = 4$). Da bei drei dieser Zellen der Tail-Strom bei einem Haltepotential von -50 mV im Vergleich zu den in Abb. 11 gezeigten Strömen sehr klein war, wurden zur Bestimmung des Umkehrpotentials auch die Messungen hinzugezogen, bei denen keine Stromumkehr beobachtet wurde. Insgesamt ergab sich das Umkehrpotential des I_h -Stroms zu -32 ± 7 mV ($n = 7$; grüne Linie).

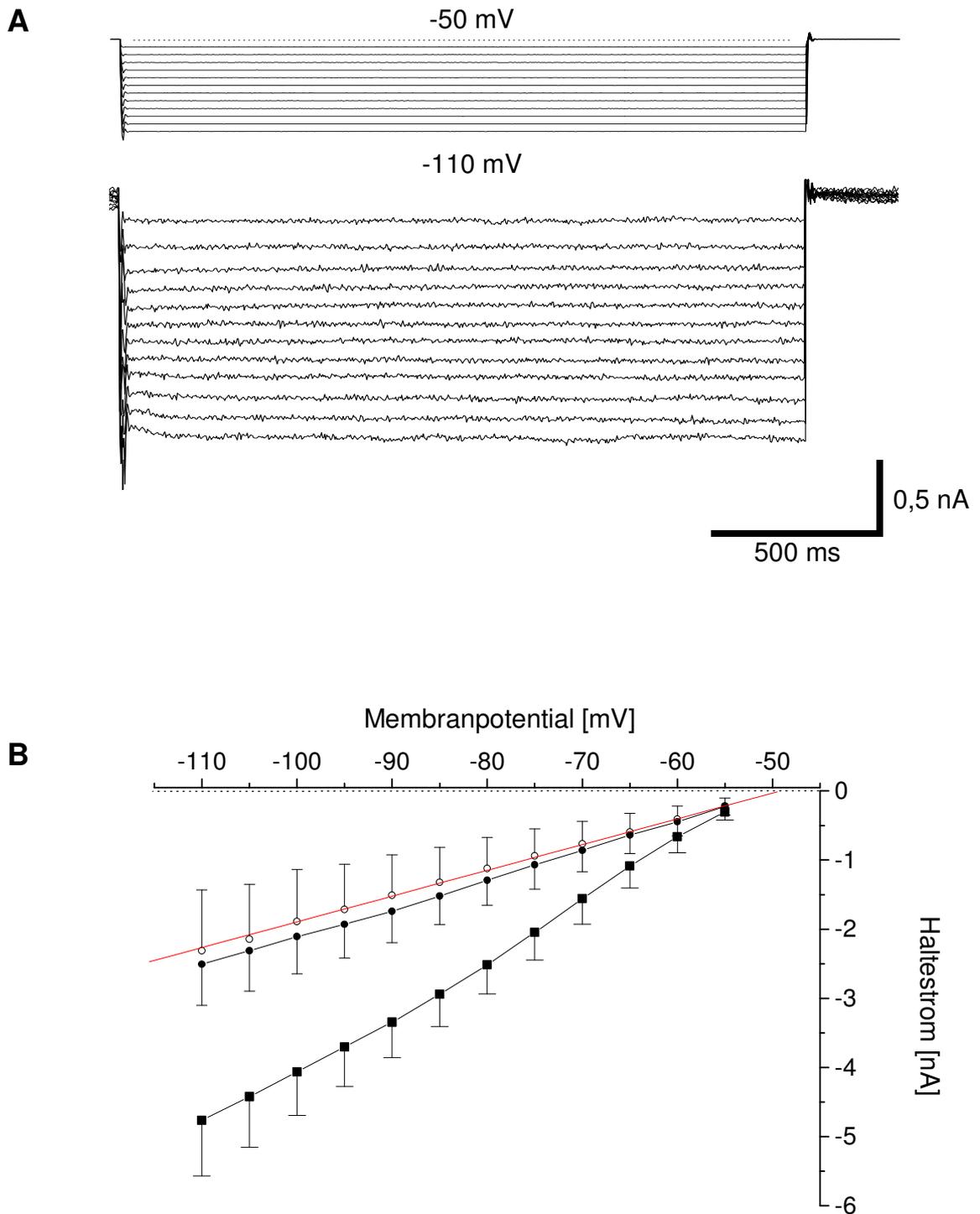


Abbildung 15

Unterdrückung des I_h -Stroms in Na^+ -freier Lösung

A) Registrierbeispiel der Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 mV auf -55, -60 ... -100 mV für 2 s, aufgenommen im Abstand von 30 s. Mit den Registrierungen wurde 3 min nach Austausch des extrazellulären Na^+ durch NMDG $^+$ begonnen.

B) Auftragung des Zusammenhangs zwischen Membranpotential und Haltestrom in Na^+ -freier Lösung zu Beginn des Potentialsprungs (○) und kurz vor dessen Ende (●, Mittelwerte \pm SD, $n = 5$). Die Standardabweichungen sind zur besseren Übersicht nur in eine Richtung aufgetragen. Die Werte zu Beginn des Potentialsprungs wurden durch eine Gerade approximiert. Zum Vergleich ist der Haltestrom zum Ende von Potentialsprüngen in physiologischer Lösung dargestellt (■, $n = 7$; vergl. Abb. 8 B).

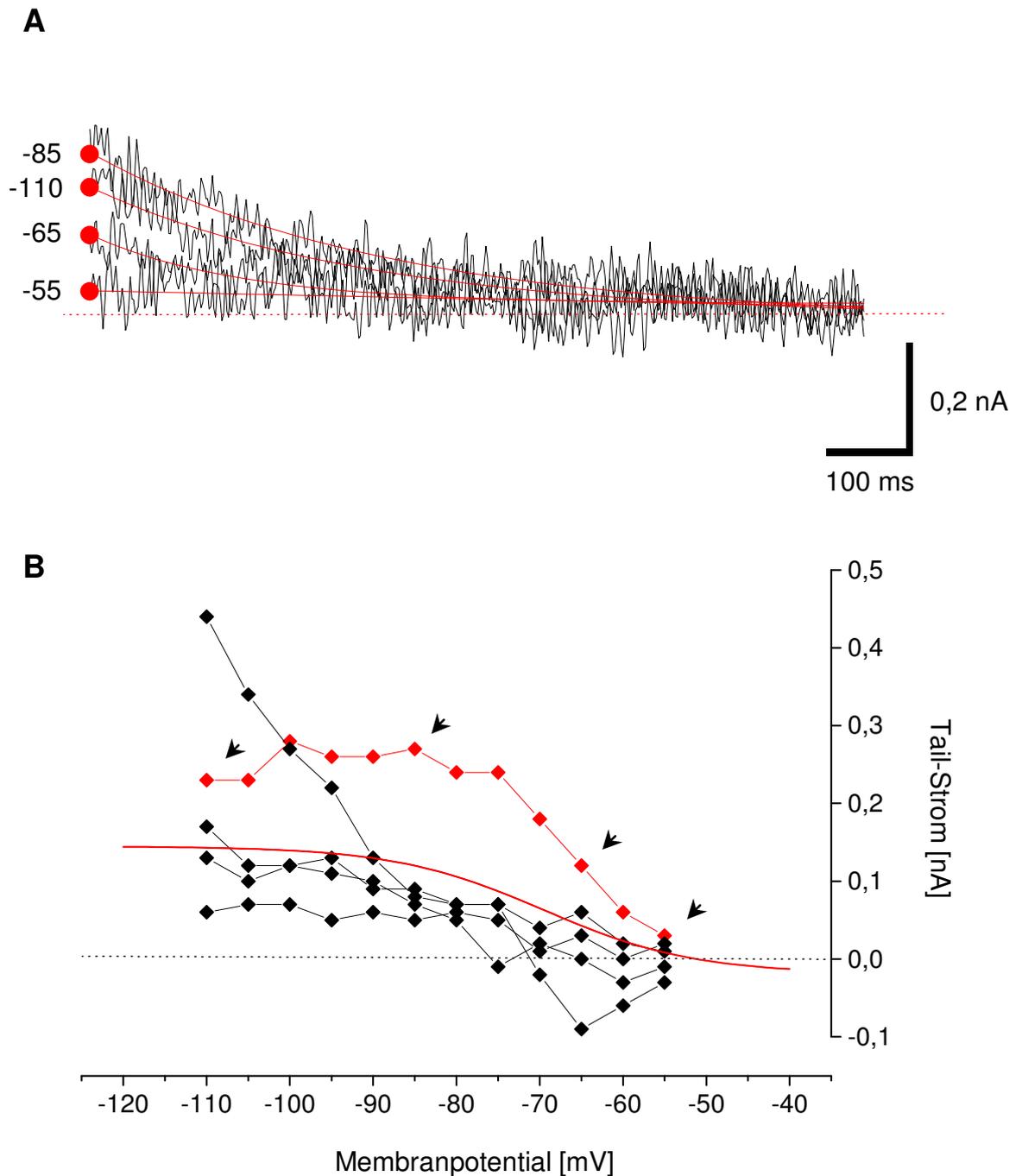


Abbildung 16

Tail-Ströme in Na^+ -freier Lösung

A) Registrierbeispiel der überlagerten Tail-Ströme nach Verstellen des Haltepotentials auf -55 , -65 , -85 und -110 mV für 3 s und nachfolgendem Rücksprung auf -50 mV. Die Spuren wurden 3 min nach Austausch des extrazellulären Na^+ gegen NMDG^+ im Abstand von 10 s an derselben P-Zelle aufgenommen. In Na^+ -freier Lösung kehrte sich die Richtung des Tail-Stroms um (vergl. Abb. 10, 11). Die roten Kurven geben die Approximation der jeweiligen Spur mit Hilfe einer e-Funktion wieder ($\tau \sim 250 - 400$ ms). Die an dieser Zelle gewonnenen Meßdaten sind in B rot wiedergegeben.

B) Auftragung der Abhängigkeit des Tail-Stroms ($E_h = -50$ mV) in Na^+ -freier Lösung vom zuvor eingestellten Membranpotential, gemessen bei 5 verschiedenen Zellen. Die aus den in A gezeigten Registrierungen gewonnenen Daten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die durchgezogene Linie stellt eine Approximation sämtlicher Meßpunkte mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dar. Die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle erfolgte ähnlich wie in physiologischer Lösung bei -69 mV (vergl. Abb. 11).

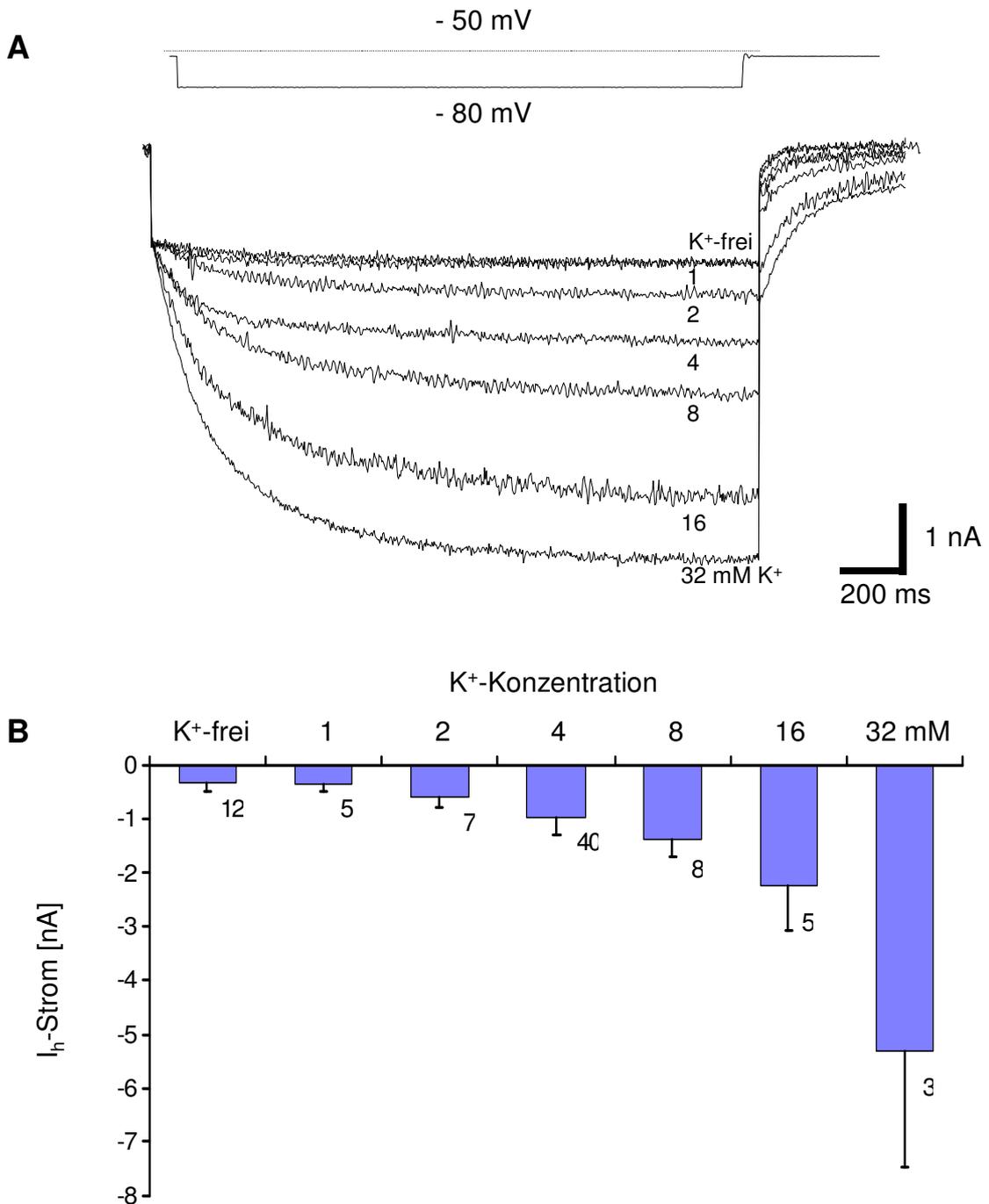


Abbildung 17

Abhängigkeit des I_h-Stroms von der K⁺-Konzentration der Badlösung

Bei Verminderung der K⁺-Konzentration der Badlösung auf 2 oder 1 mM sowie in K⁺-freier Lösung nahm die Amplitude des I_h-Stroms ab, während sie bei Erhöhung auf 8, 16 oder 32 mM zunahm. Der Haltestrom bei -50 mV verschob sich bei Erniedrigung der K⁺-Konzentration in positive Richtung, bei Erhöhung der K⁺-Konzentration in negative Richtung.

A) Registrierbeispiel der überlagerten Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV für 1 s bei unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen in der Badlösung, gemessen an derselben P-Zelle. Die einzelnen Spuren wurden 5 min nach Einstellung der jeweiligen K⁺-Konzentration aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spuren vertikal so verschoben, daß die passiven Ströme direkt nach Beginn des Potentialsprungs auf demselben Wert lagen. Dabei wurde die bei 32 mM K⁺ gemessene Spur um +4,1 nA verschoben; die Verschiebung der übrigen Spuren variierte zwischen -0,3 und +0,9 nA.

B) Auftragung der Amplituden des I_h-Stroms bei verschiedenen K⁺-Konzentrationen in der Badlösung. Mittelwerte ± SD aus n = 3 – 40 Messungen.

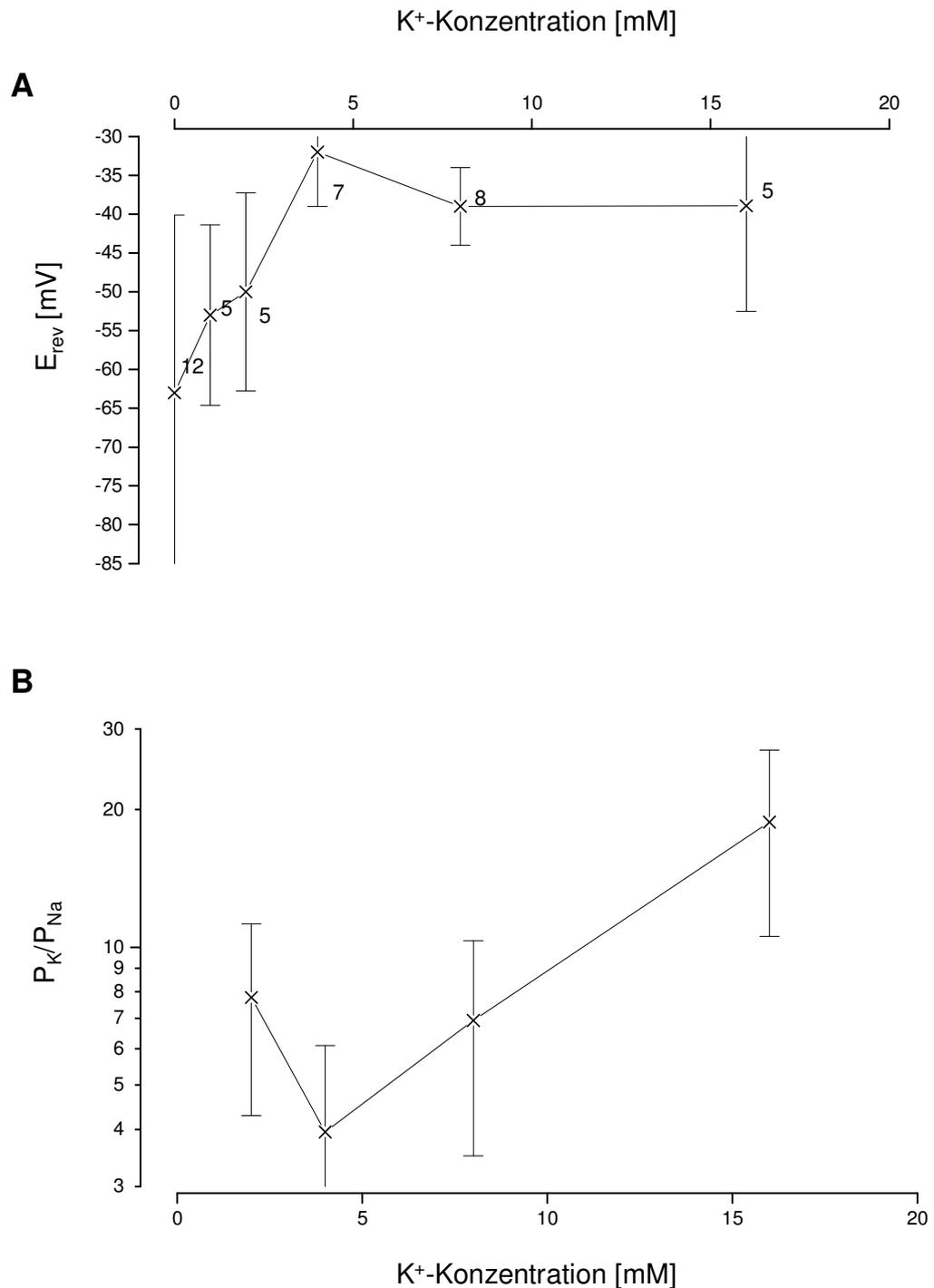


Abbildung 18

Einfluß der K^+ -Konzentration der Badlösung auf das Umkehrpotential des I_h -Stroms und die Ionenselektivität der I_h -Kanäle

A) Abhängigkeit des Umkehrpotentials des I_h -Stroms von der K^+ -Konzentration der Badlösung. Mittelwerte (\pm SD) aus $n = 5 - 12$ Messungen. Die Bestimmung des Umkehrpotentials erfolgte anhand der Tail-Ströme bei verschiedenen Haltepotentialen nach vollständiger Aktivierung der I_h -Kanäle bei einem Haltepotential von -100 mV (siehe Abb. 12-14).

B) Abhängigkeit des Permeabilitätsverhältnisses zwischen K^+ und Na^+ (P_K/P_{Na}) von der K^+ -Konzentration der Badlösung. P_K/P_{Na} wurde aus den Umkehrpotentialen des I_h -Stroms (A) und den experimentell bestimmten intra- und extrazellulären Konzentrationen von K^+ und Na^+ mit Hilfe der Goldman-Gleichung ermittelt (siehe 2.8). Die bei 1 mM K^+ und in K^+ -freier Lösung ermittelten Umkehrpotentiale wurden nicht ausgewertet, da keine zuverlässigen Daten bezüglich der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentration vorlagen.

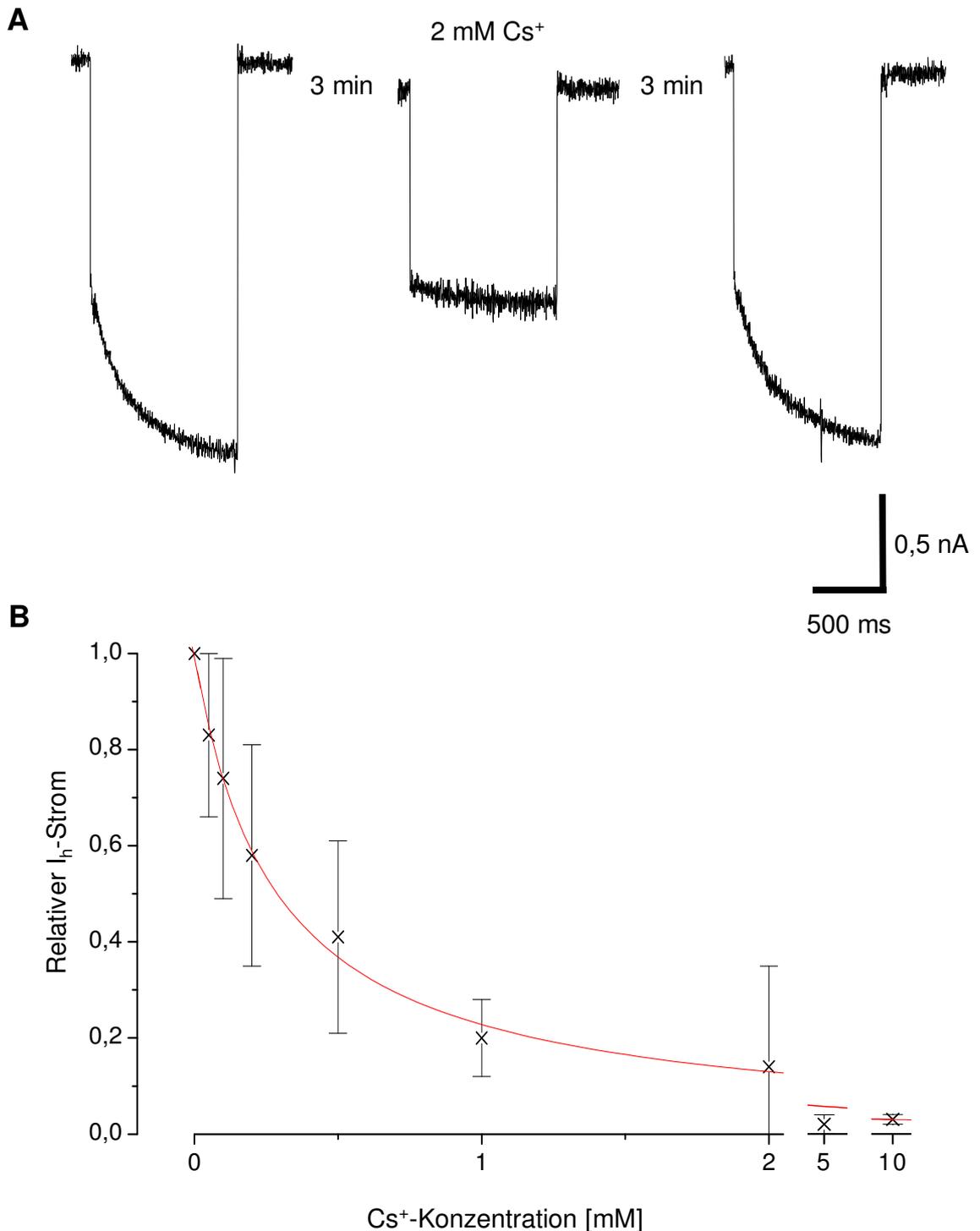


Abbildung 19

Blockierung des I_h-Stroms durch extrazelluläres Cs⁺

A) Registrierbeispiel der Membranströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV für 1 s vor, während und nach Zugabe von 2 mM Cs⁺ zur Badlösung. In Gegenwart von Cs⁺ war der I_h-Strom weitgehend unterdrückt. Gleichzeitig erhöhte sich der Haltestrom zur Klemmung auf das Bezugspotential (-50 mV) geringfügig. Diese Cs⁺-Wirkungen waren innerhalb von wenigen Minuten vollständig reversibel (vergl. Abb. 6).

B) Auftragung der Amplitude des I_h-Stroms bei -80 mV in Abhängigkeit von der Cs⁺-Konzentration der Badlösung, jeweils normiert auf die Amplitude in Cs⁺-freier Lösung. Mittelwerte ± SD aus n = 4 - 6 Messungen. Die durchgezogene Linie stellt eine Approximation der Meßdaten mit Hilfe der Hill-Funktion dar. Danach war die halbmaximale Wirkung bei einer Cs⁺-Konzentration von 0,3 mM erreicht; der Hill-Koeffizient betrug 0,98.

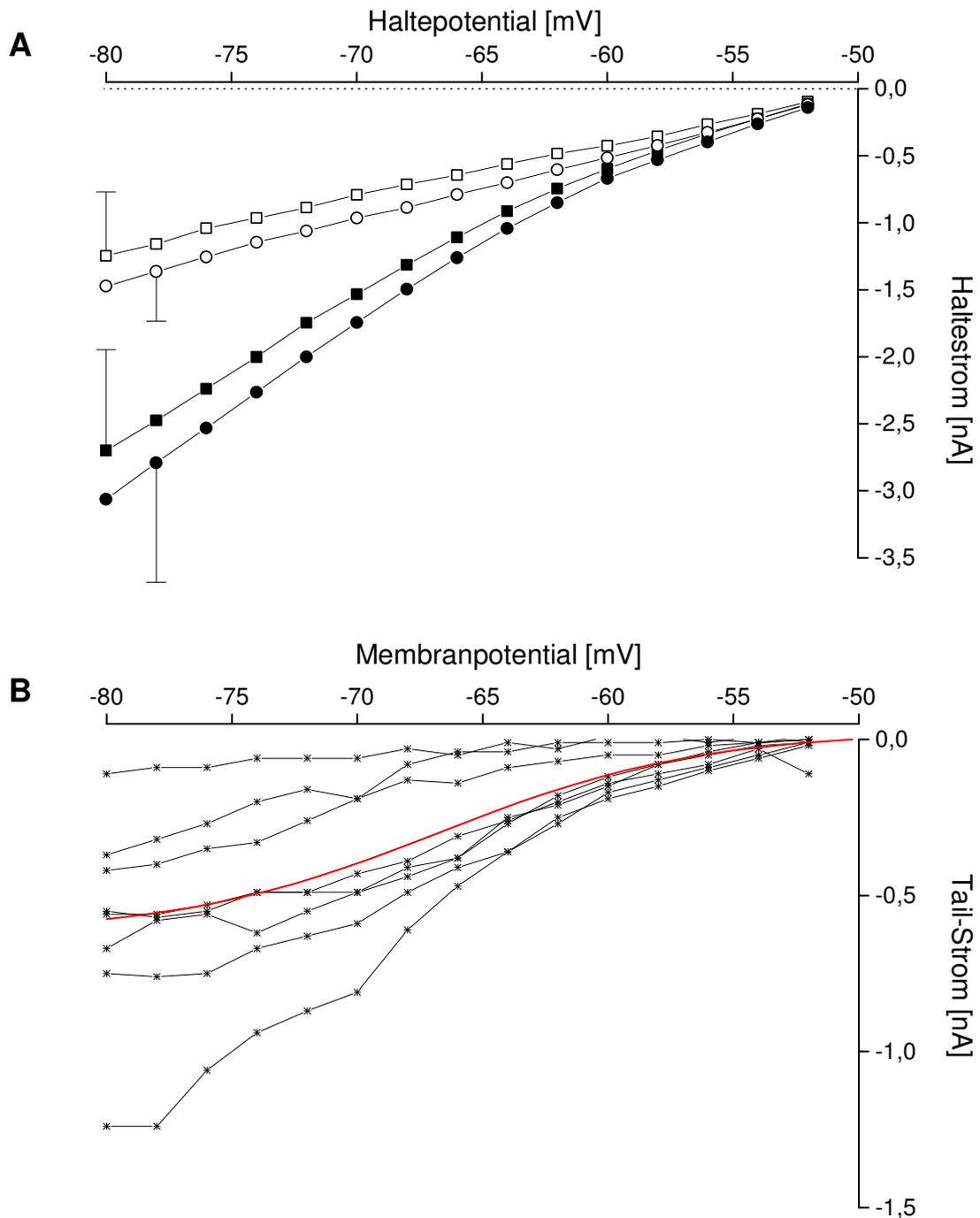


Abbildung 20

Wirkung von IBMX auf Amplitude und Aktivierung des I_h -Stroms

A) Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 auf -52, -54 ... -80 mV für jeweils 1 s, aufgenommen im Abstand von 10 s in physiologischer Lösung (\square , \blacksquare ; $n = 23$) sowie in Gegenwart von 1 mM IBMX (\circ , \bullet ; $n = 8$). Die offenen Symbole kennzeichnen den I_h -unabhängigen, passiven Membranstrom zu Beginn des Potentialsprungs, die geschlossenen Symbole den Strom an dessen Ende, nach Aktivierung der I_h -Kanäle. IBMX führte zu einer leichten Vergrößerung des passiven Membranstroms und auch des Gesamtstroms nach Aktivierung der I_h -Kanäle. Die Standardabweichungen sind der Übersicht halber nur exemplarisch dargestellt. Mit den Experimenten in Gegenwart von IBMX wurde nach einer Inkubationszeit von 10 min begonnen.

B) Abhängigkeit des Tail-Stroms bei einem Haltepotential von -50 mV vom zuvor eingestellten Membranpotential, gemessen in Gegenwart von 1 mM IBMX bei acht verschiedenen Zellen. Die durchgezogene Linie stellt die Approximation sämtlicher Meßdaten mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dar. Danach erfolgt die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle bei -67 mV, ähnlich wie in physiologischer Lösung (Abb. 11) bzw. in Gegenwart von dBcAMP (Abb. 21).

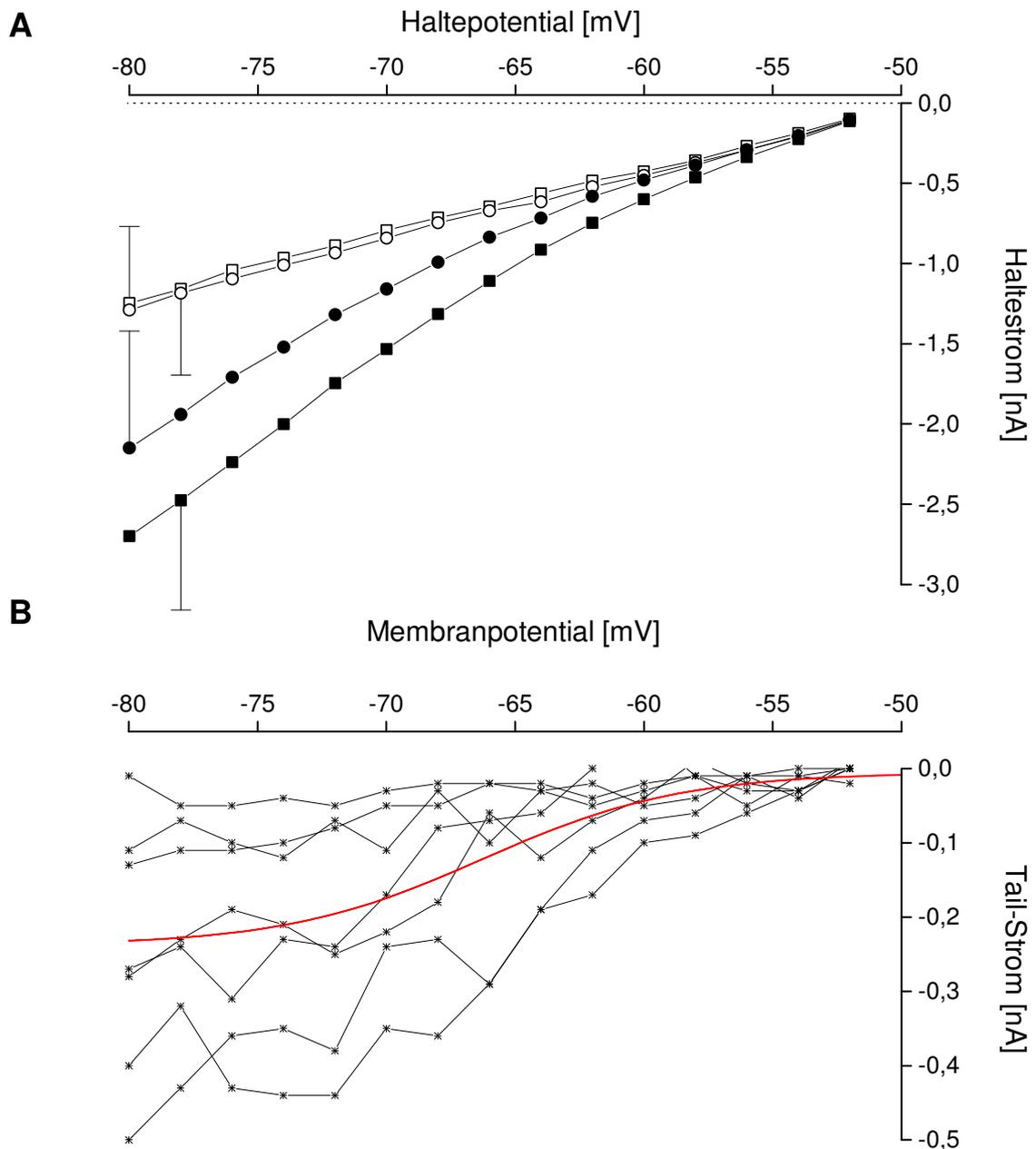


Abbildung 21

Wirkung von dBcAMP auf Amplitude und Aktivierung des I_h -Stroms

A) Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 auf -52, -54 ... -80 mV für jeweils 1 s, aufgenommen im Abstand von 10 s in physiologischer Lösung (\square , \blacksquare ; $n = 23$) sowie in Gegenwart von 1 mM dBcAMP (\circ , \bullet ; $n = 7$). Die offenen Symbole kennzeichnen den I_h -unabhängigen, passiven Membranstrom zu Beginn des Potentialsprungs, die geschlossenen Symbole den Strom an dessen Ende, nach Aktivierung der I_h -Kanäle. Der passive Membranstrom wurde durch dBcAMP nicht beeinflusst, der Strom nach Aktivierung der I_h -Kanäle war jedoch reduziert. Die Standardabweichungen sind der Übersicht halber nur exemplarisch dargestellt. Mit den Messungen in dBcAMP wurde nach einer Inkubationszeit von 10 min begonnen.

B) Abhängigkeit des Tail-Stroms bei einem Haltepotential von -50 mV vom zuvor eingestellten Membranpotential, gemessen in Gegenwart von 1 mM dBcAMP bei sieben verschiedenen Zellen. Die durchgezogene Linie stellt die Approximation sämtlicher Meßdaten mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dar. Danach erfolgte die halbmaximale Aktivierung der I_h -Kanäle bei -66 mV, ähnlich wie in physiologischer Lösung (Abb. 11) bzw. in Gegenwart von IBMX (vergl. Abb. 20).

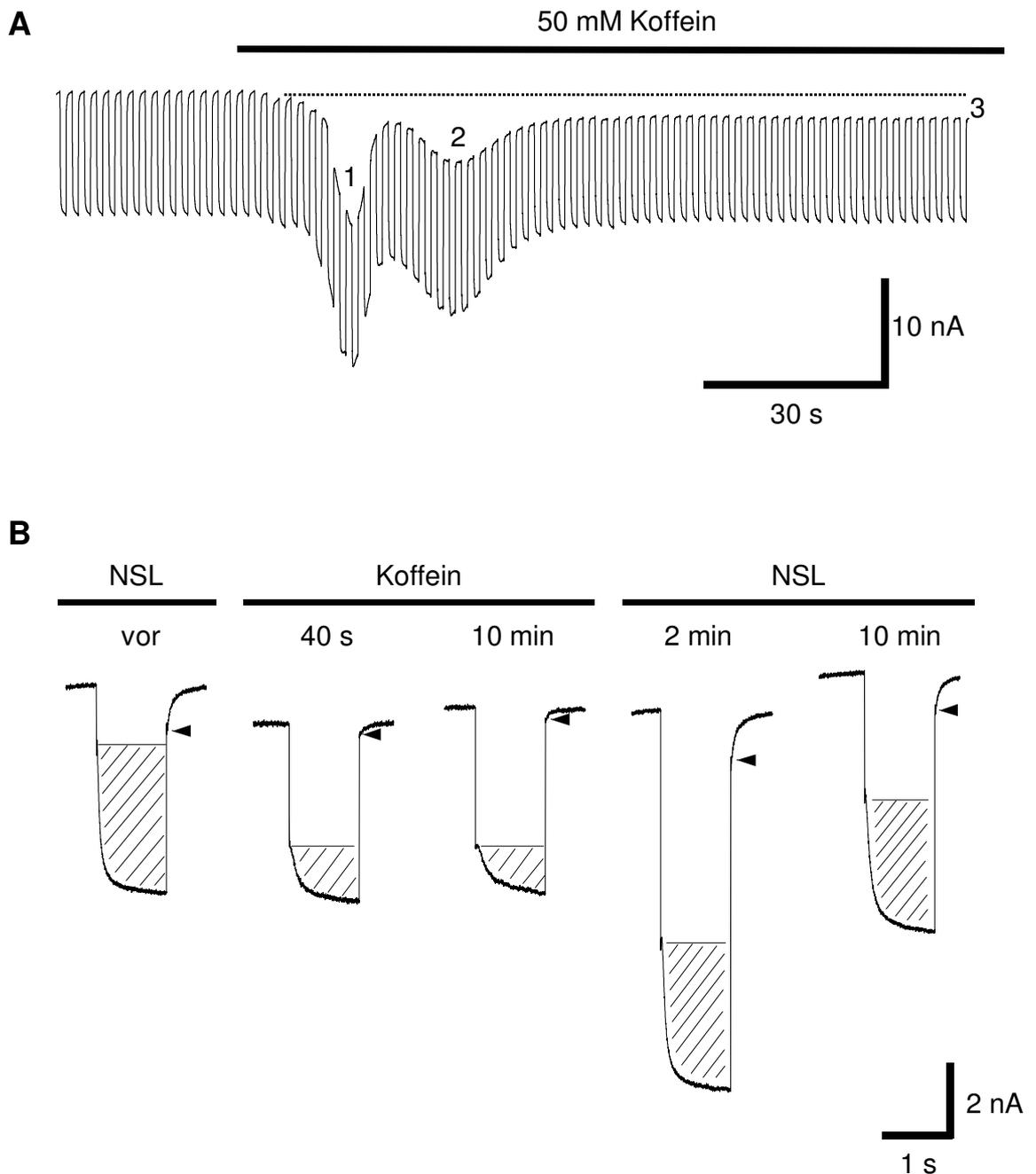


Abbildung 22

Wirkung von Koffein auf den I_h -Strom

A) Um die Wirkung von Koffein auf den I_h -Strom zu prüfen, wurde das Haltepotential im Sekundentakt von -50 auf -80 mV und wieder zurück verstellt. Koffein induzierte zwei transiente Membranströme (1, 2) und einen anhaltenden Membranstrom (3), die bei einem Haltepotential von -50 mV einwärts gerichtet waren.

B) Halteströme bei einem Potentialsprung von -50 auf -80 mV vor der Koffein-Applikation, 40 s und 10 min nach Beginn der Applikation sowie 2 und 10 min nach Auswaschen des Koffeins. In Gegenwart von Koffein stieg der Haltestrom zur Klemmung auf ein Haltepotential von -50 mV auf $-1,0 \pm 0,6$ nA an bedingt durch die Aktivierung des anhaltenden Stroms. Der passive Membranstrom zu Beginn der Hyperpolarisation war ebenfalls vergrößert. Der I_h -Strom (schraffierte Flächen) hingegen und entsprechend der Tail-Strom (Pfeile) nahmen während der Koffein-Applikation ab. Nach Auswaschen des Koffeins kehrten I_h - und Tail-Strom rasch auf die Ausgangswerte zurück. Der passive Membranstrom stieg zunächst weiter an, nahm dann aber wieder ab, war jedoch auch nach 10 min noch nicht auf den normalen Wert zurückgekehrt.

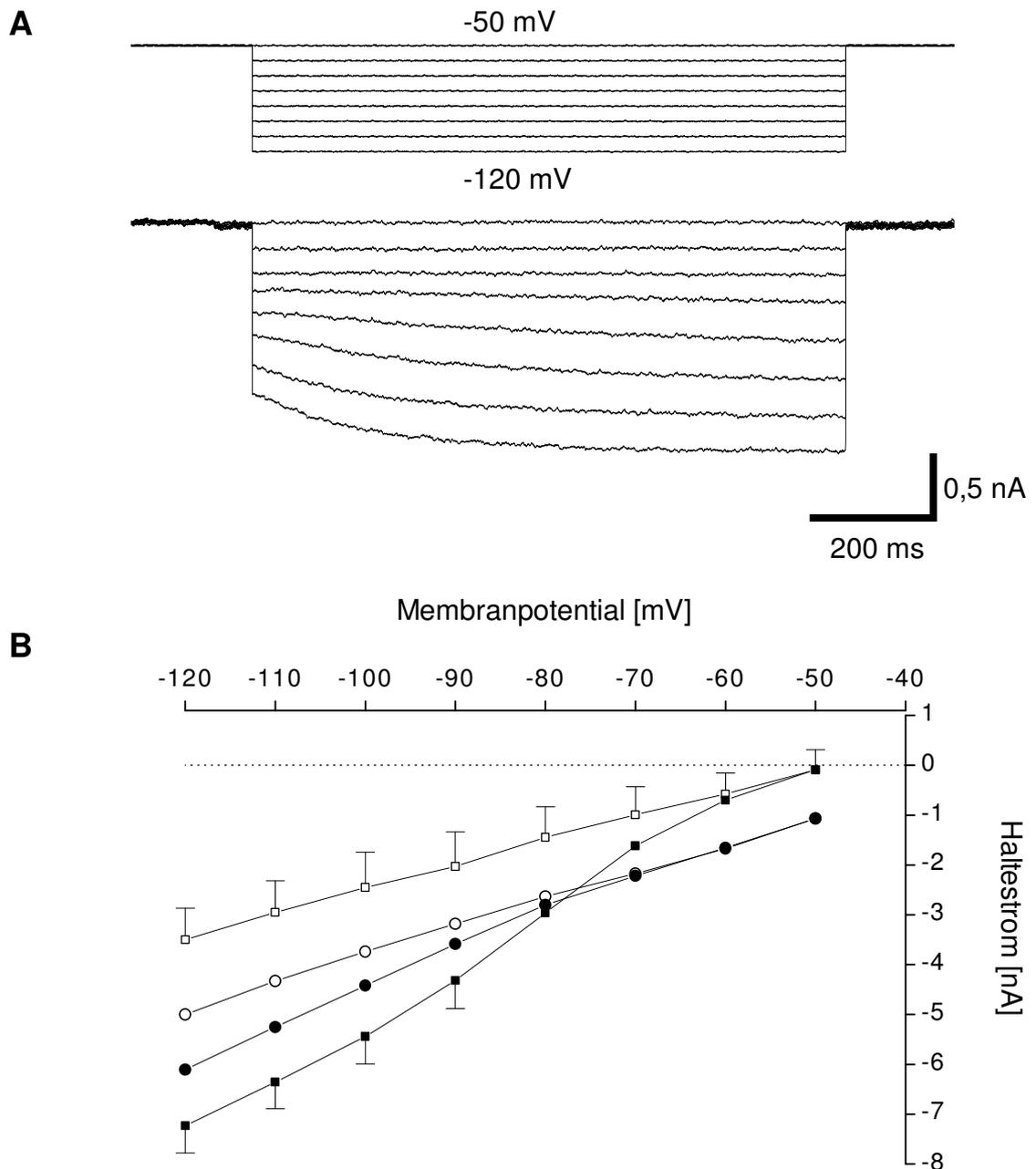


Abbildung 23

I_h -Strom in Gegenwart von Koffein

A) Registrierbeispiel der Halteströme bei sprunghafter Verstellung des Haltepotentials von -50 mV auf 60, -70 ... -120 mV für jeweils 1 s, aufgenommen im Abstand von 30 s. Mit den Registrierungen wurde 3 min nach Beginn der Applikation von 50 mM Koffein begonnen. Der I_h -Strom bei einem Haltepotential von -120 mV betrug nur etwa 0,5 nA. Ein Tail-Strom nach Rücksprung auf -50 mV war nicht erkennbar.

B) Auftragung des Zusammenhangs zwischen Membranstrom und Haltestrom bei Verstellung von E_h in physiologischer Lösung (\square , \blacksquare ; $n = 6$) sowie in Gegenwart von 50 mM Koffein (\circ , \bullet ; $n = 5$). Die offenen Symbole kennzeichnen den I_h -unabhängigen, passiven Membranstrom zu Beginn des Potentialsprungs, die geschlossenen Symbole den Strom an dessen Ende, nach Aktivierung der I_h -Kanäle. Koffein führte zu einer Vergrößerung des passiven Membranstroms. Dagegen war der Gesamtstrom nach Aktivierung der I_h -Kanäle deutlich verkleinert. Die Standardabweichungen sind der Übersicht halber nur exemplarisch für die in physiologischer Lösung gemessenen Ströme dargestellt; die Standardabweichungen der während der Koffeingabe gewonnenen Daten waren ungefähr 4 mal so groß.

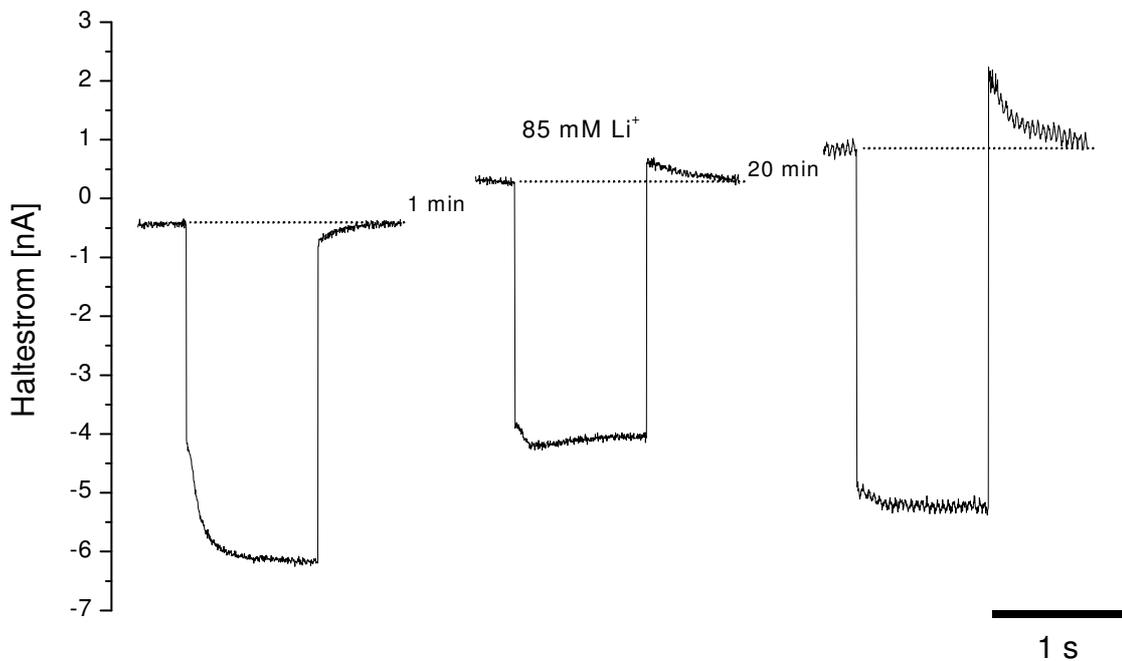


Abbildung 24

Registrierbeispiele des I_h -Stroms nach Austausch des extrazellulären Na^+ gegen Li^+

Membranströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV für 1 s vor, während und nach dem Ersatz des extrazellulären Na^+ durch Li^+ . Nach dem Austausch war der I_h -Strom vollständig unterdrückt und der Tail-Strom kehrte wie nach Ersatz des Na^+ durch NMDG^+ seine Richtung um (siehe Abb. 16). Außerdem stieg der Haltestrom zur Klemmung auf -50 mV auf $+1,3 \pm 0,6$ nA an ($n = 6$). Die durch den Austausch des Na^+ gegen Li^+ induzierten Veränderungen waren weitgehend irreversibel. So blieb nach Übergang in physiologische Lösung der Haltestrom bei einem Haltepotential von -50 mV erhöht ($+0,9 \pm 1,9$ nA, $n = 5$). Der Membranstrom bei einem Haltepotential von -80 mV nahm zwar wieder zu, es fehlte jedoch das typische Aktivierungsprofil des I_h -Stroms. Außerdem blieb der Tail-Strom beim Rücksprung auf -50 mV auswärts gerichtet.

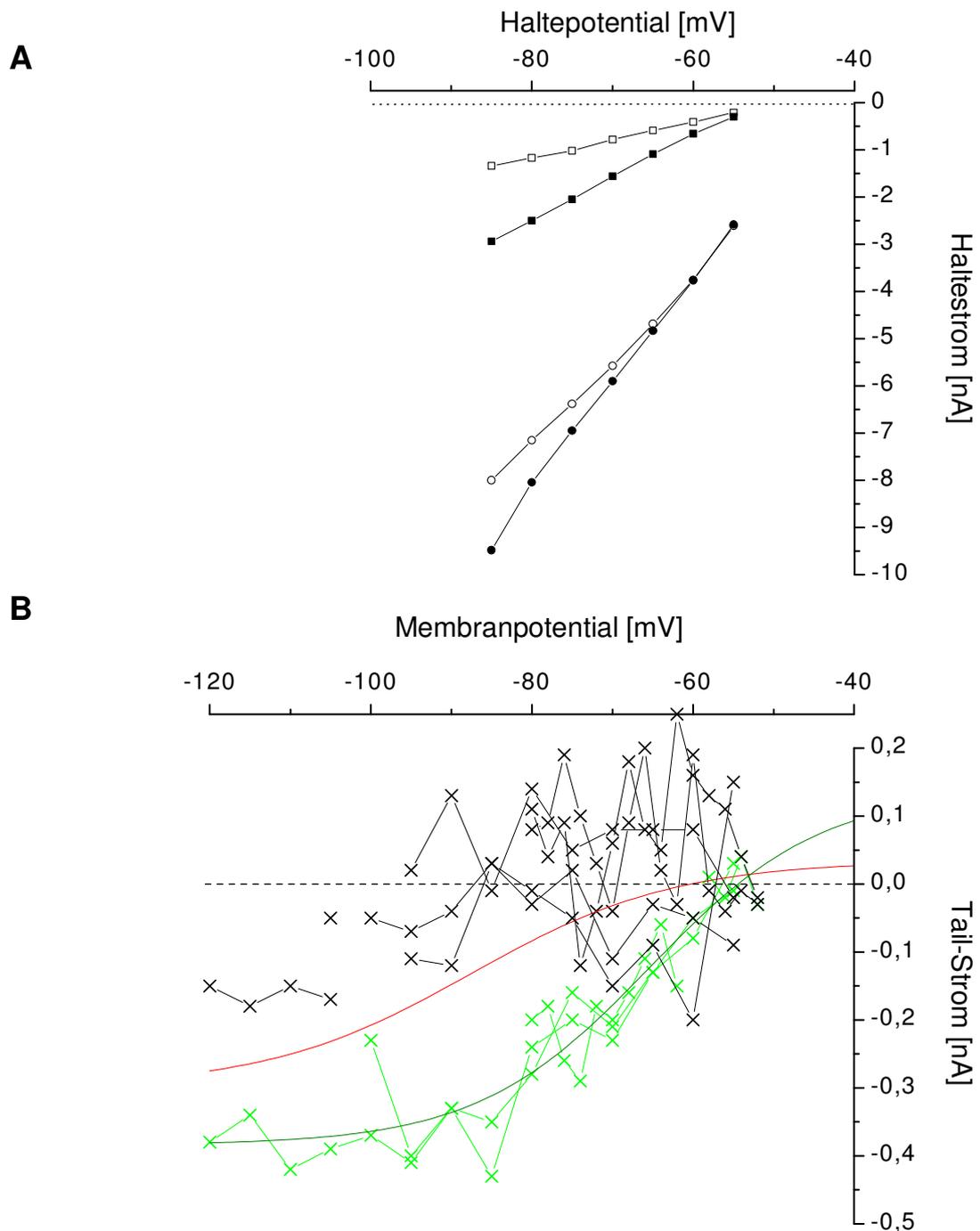


Abbildung 25

Wirkung einer extrazellulären Ansäuerung auf Amplitude und Aktivierung des I_h -Stroms

A) Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 mV auf -55, -60 ... -85 mV für jeweils 1 s. Die Messungen wurden in physiologischer Lösung (Quadrate, $n = 8$) und bei einem Bad-pH von 6,8 (Kreise, $n = 6$) durchgeführt. Die offenen Symbole kennzeichnen den I_h -unabhängigen, passiven Haltestrom zu Beginn des Potentialsprungs, die geschlossenen Symbole den Strom an dessen Ende, nach Aktivierung der I_h -Kanäle. Der passive Membranstrom wurde durch die extrazelluläre Ansäuerung stark vergrößert, der I_h -Strom wurde dagegen leicht reduziert. Vor den Messungen waren die Präparate für mindestens 10 min bei pH 6,8 inkubiert. Die Standardabweichungen variierten zwischen 3,8 und 8,3 nA. Die wiedergegebenen Meßwerte stammen aus Experimenten, in denen die jeweiligen Halteströme sowohl in physiologischer Lösung als auch bei pH 6,8 gemessen werden konnten. Dies war bei pH 6,8 wegen der hohen Halteströme häufig nicht der Fall, so daß Meßdaten für Haltepotentiale negativer als -90 mV nicht dargestellt sind.

B) Abhängigkeit des Tail-Stroms bei einem Haltepotential von -50 mV vom zuvor eingestellten Membranpotential bei einem Bad-pH von 6,8 (8 Zellen). Nur bei 3 Zellen waren Tail-Ströme deutlich erkennbar (grüne Meßpunkte). Die rote Kurve stellt die Approximation sämtlicher Meßdaten mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dar. Danach erfolgte die halbmaximale Aktivierung des I_h -Stroms bei -88 mV. Bei den Zellen mit deutlich erkennbarem Tail-Strom trat die halbmaximale Aktivierung dagegen bei -65 mV auf (grüne Kurve).

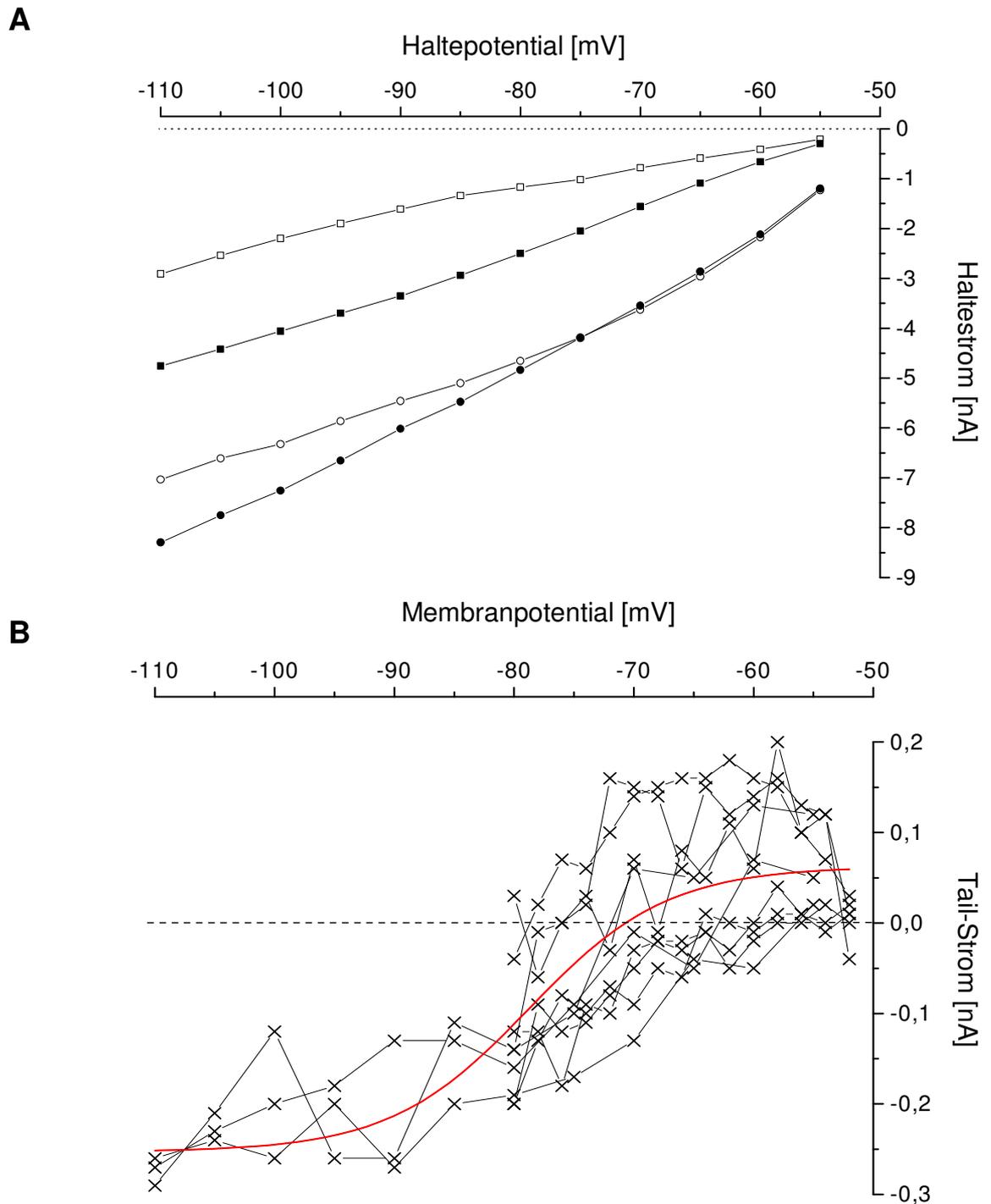


Abbildung 26

Wirkung einer extrazellulären Alkalinisierung auf Amplitude und Aktivierung des I_h -Stroms

A) Halteströme bei Verstellung des Haltepotentials von -50 mV auf -55, -60 ... -110 mV für jeweils 1 s. Die Messungen wurden in physiologischer Lösung (Quadrats, $n = 7$) und bei einem Bad-pH von 8,0 (Kreise, $n = 3$) durchgeführt. Die offenen Symbole kennzeichnen den I_h -unabhängigen, passiven Haltestrom zu Beginn des Potentialsprungs, die geschlossenen Symbole den Strom an dessen Ende. Der passive Membranstrom wurde durch die extrazelluläre Alkalinisierung stark vergrößert, der I_h -Strom wurde dagegen deutlich reduziert. Die Präparate wurden vor den Messungen für mindestens 10 min bei pH 8,0 inkubiert.

B) Abhängigkeit des Tail-Stroms bei einem Haltepotential -50 mV vom zuvor eingestellten Membranpotential bei einem Bad-pH von 8,0 ($n = 7$). Die durchgezogene Kurve stellt die Approximation der Meßdaten mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion dar. Danach trat die halbmaximale Aktivierung des I_h -Stroms bei -79 mV auf.

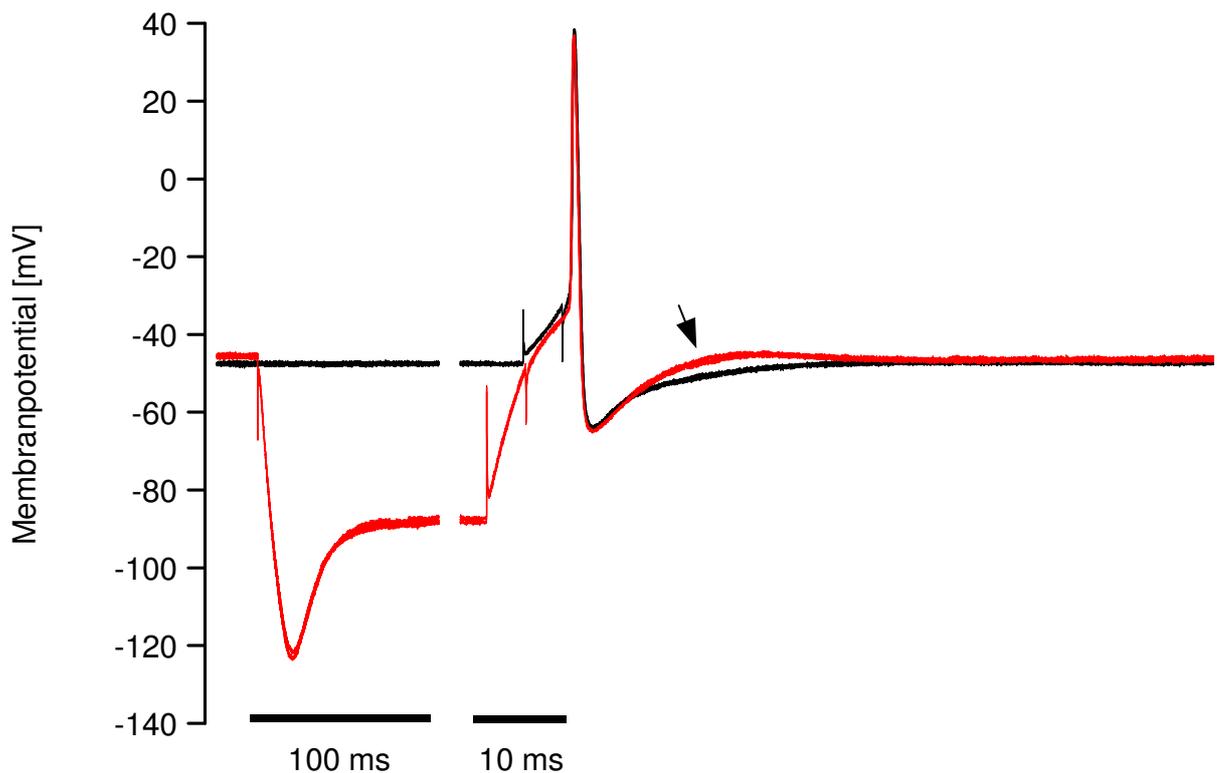


Abbildung 27

Registrierbeispiele von Aktionspotentialen mit und ohne aktiviertem I_h -Strom

Nach Aktivierung der I_h -Kanäle durch eine Vorhyperpolarisation (-3 nA für 300 ms, rote Meßspuren) kehrte das Membranpotential nach Abklingen des Aktionspotentials beschleunigt auf das Ruhepotential zurück, wobei stets ein Überschießen auftrat (Pfeil). Dieser Effekt wurde ohne Aktivierung der I_h -Kanäle nie beobachtet (schwarze Spuren). Zur Aktionspotential-Auslösung wurde ein depolarisierender Strom von +2 nA für die Dauer von 5 ms injiziert.

Die Spuren stellen jeweils fünf superponierte Einzelmessungen dar, die zur besseren Vergleichbarkeit und zur Veranschaulichung der hohen Reproduzierbarkeit zeitlich so angeordnet wurden, daß sich die Aktionspotentiale überlagern. Die Spitzen in den Meßspuren sind Reizartefakte und markieren Beginn bzw. Ende des Reizes.

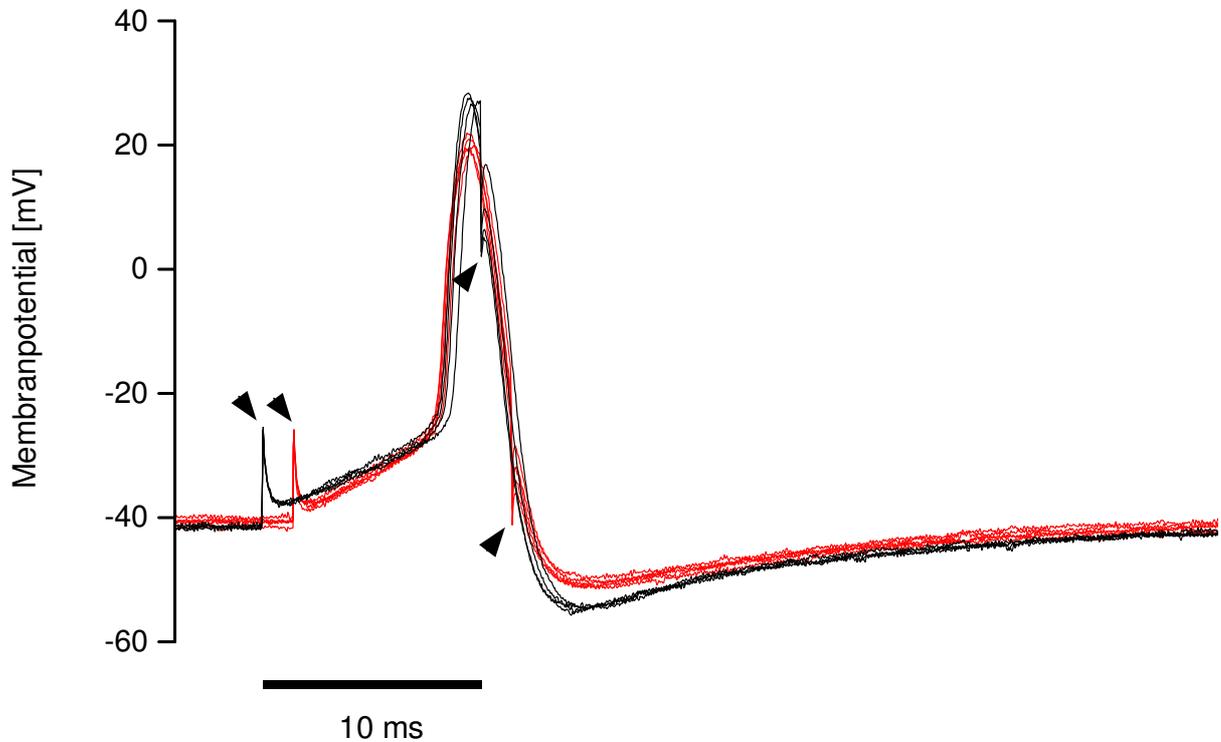


Abbildung 28

Registrierbeispiele zur Wirkung von Cs⁺ auf das Aktionspotential

Dargestellt sind überlagerte Aktionspotentiale in physiologischer Lösung (schwarz) und in Gegenwart von 1 mM Cs⁺ (rot). In Gegenwart von Cs⁺ waren die Amplituden der Aktionspotentiale und der Nachhyperpolarisationen reduziert. Die Zeit zwischen Reizbeginn und Auslösung des Aktionspotentials war um ca. 1,3 ms verkürzt.

Um die hohe Reproduzierbarkeit zu demonstrieren, wurden unter den beiden Versuchsbedingungen jeweils fünf Aktionspotentiale nacheinander registriert und so überlagert, daß deren Maxima zur Deckung kamen. Die Aktionspotentiale wurden durch Strominjektion ausgelöst (+2 nA für 10 ms). Die kurzen, mit Pfeilen gekennzeichneten Spitzen stellen Reizartefakte dar und markieren Beginn und Ende der Strominjektion. Die Wirkung des Cs⁺ war innerhalb weniger Minuten vollständig reversibel. Identische Registrierungen wurden bei vier weiteren Zellen erhalten.

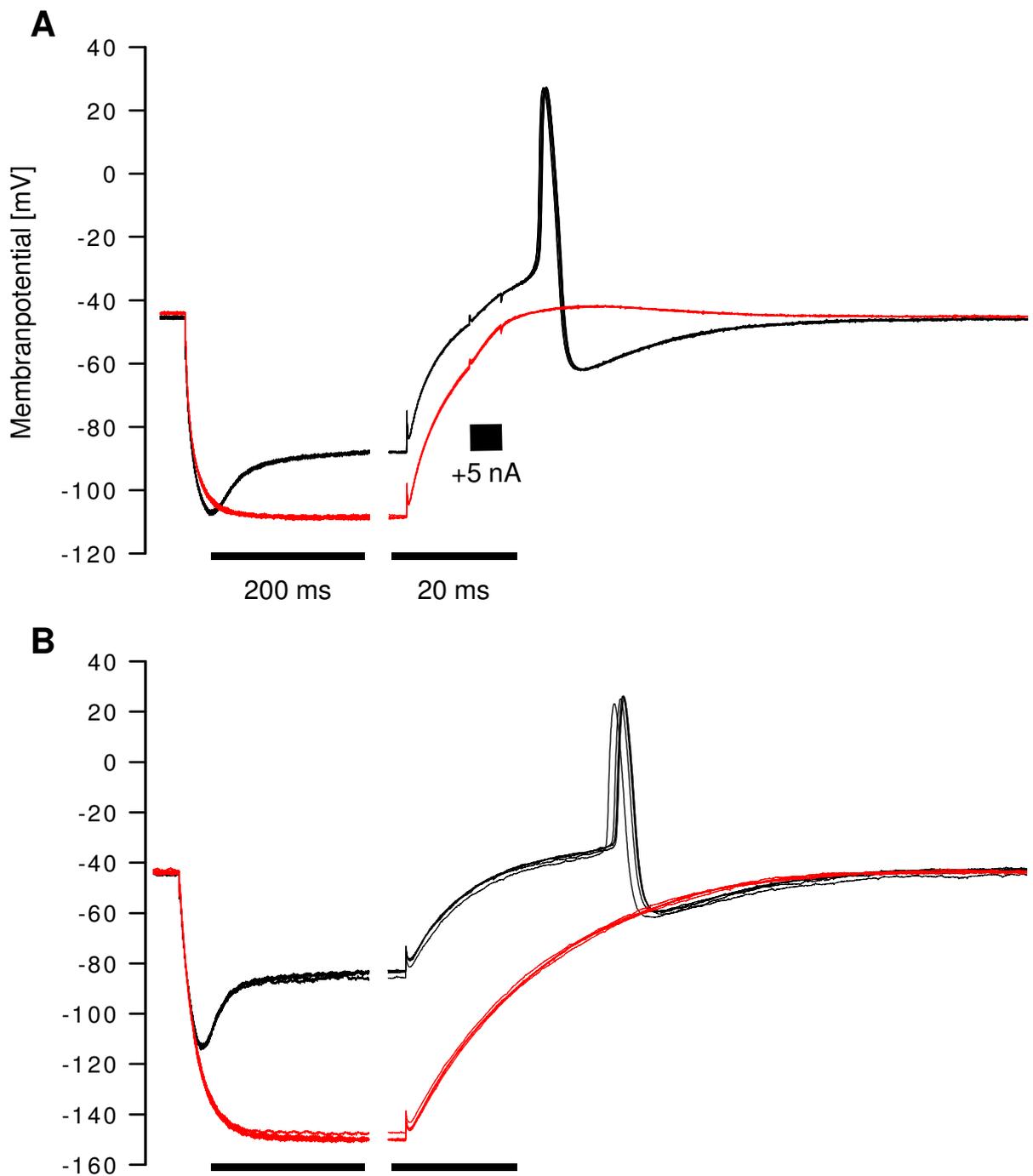


Abbildung 29

Registrierbeispiele zur Erregbarkeit von P-Neuronen mit und ohne aktiviertem I_h -Strom

Wiedergegeben sind überlagerte Meßspuren in physiologischer Lösung (schwarz) und in Gegenwart von 1 mM Cs^+ (rot) nach vorangegangener Hyperpolarisation (-3 nA für 300 ms).

A) In physiologischer Lösung löste ein depolarisierender Strom von +5 nA ein Aktionspotential aus, in Gegenwart von Cs^+ dagegen nicht. Der Cs^+ -Effekt war innerhalb weniger Minuten vollständig reversibel.

B) In physiologischer Lösung lösten ca. 30% der P-Neuronen nach einer Hyperpolarisation (-3 nA für 300 ms) ein Aktionspotential aus. Dieser Effekt wurde in Gegenwart von Cs^+ nie beobachtet.

Die Messungen in A und B wurden jeweils an derselben Zelle durchgeführt. Die Spuren entsprechen jeweils fünf übereinander gelegten Einzelmessungen. Die Spitzen in den Meßspuren sind Reizartefakte und markieren Beginn und Ende des Reizes.

Identische Ergebnisse wie in A und B wurden bei vier weiteren Zellen erhalten.

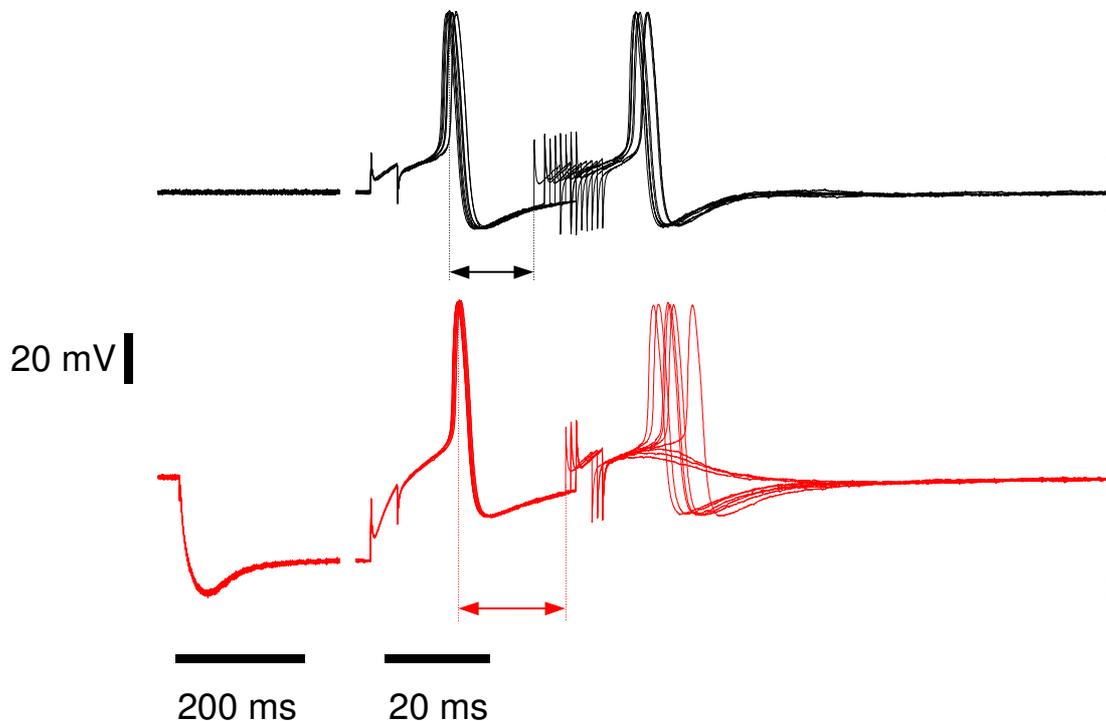


Abbildung 30

Registrierbeispiele zum Einfluß des I_h -Stroms auf die wiederholte Aktivierbarkeit von P-Neuronen

Nach der Auslösung eines ersten Aktionspotentials wurde versucht, in möglichst kurzem Zeitabstand erneut ein Aktionspotential auszulösen. Nach vorangegangener Hyperpolarisation (-3 nA für 300 ms, unten) war die Refraktärperiode nach dem ersten Aktionspotential vergrößert, verdeutlicht durch die gepunkteten Linien, die den Beginn des ersten Aktionspotentials und den Beginn des frühesten Aktionspotential-auslösenden Folgeizes markieren.

Unter den beiden Versuchsbedingungen wurden jeweils 10 erste Aktionspotentiale ausgelöst ($+5$ nA für 5 ms). Die Reize für das nachfolgende Aktionspotential ($+10$ nA für 5 ms) wurden jeweils um 1 oder 2 ms zeitlich verschoben. In der oberen Teilabbildung überlagerten sich die Aktionspotentiale größtenteils, obwohl der Zeitpunkt des Reizes relativ stark variierte. In der unteren Teilabbildung dagegen lagen die Aktionspotentiale zeitlich relativ weit gestreut, obwohl die Reize in einem engen Zeitbereich appliziert wurden. Die kurzen Spitzen stellen Reizartefakte dar und markieren Beginn und Ende der Strominjektion.

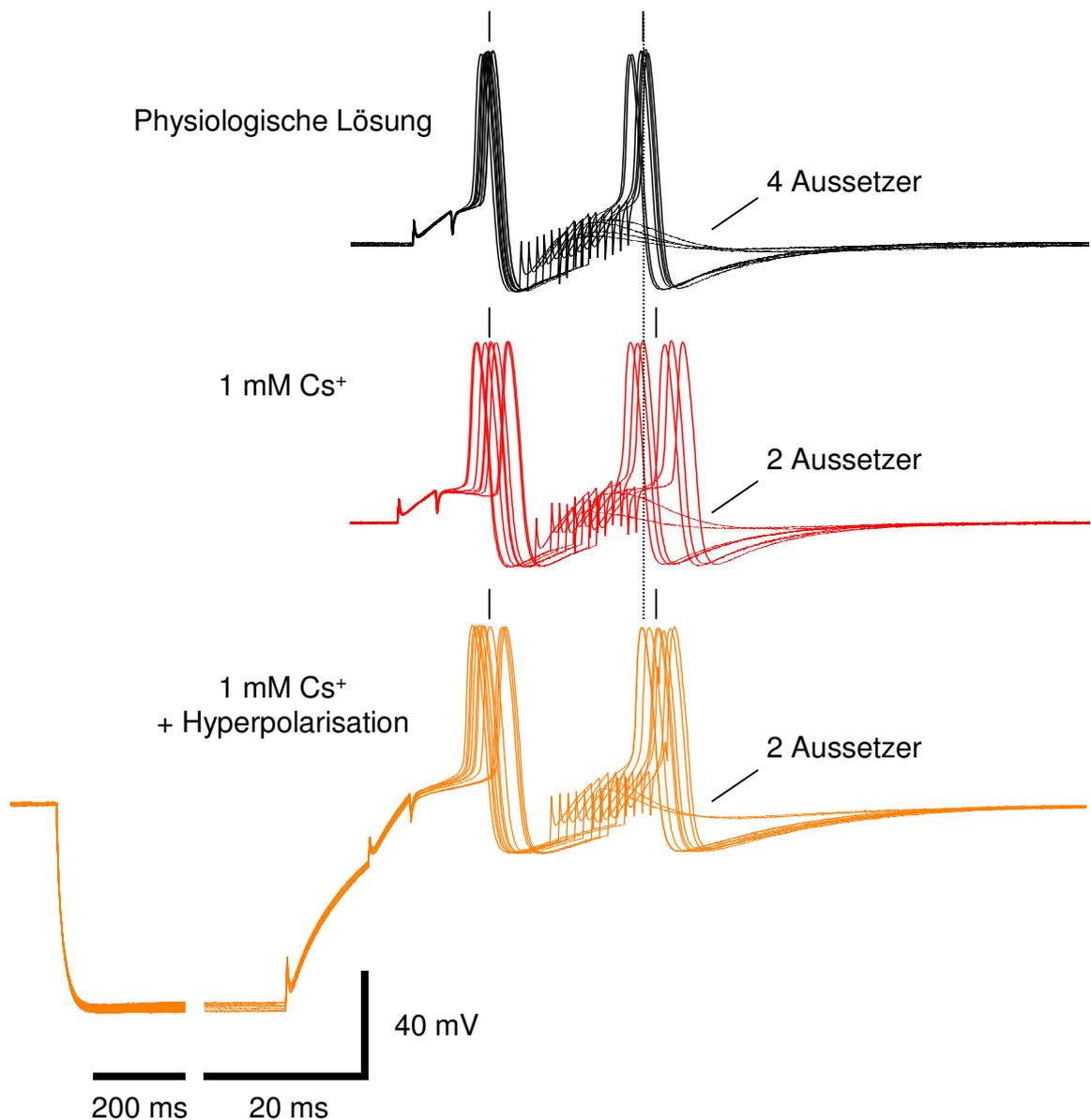


Abbildung 31

Registrierbeispiele zum Einfluß von Cs⁺ auf die wiederholte Aktivierbarkeit von P-Neuronen

Zunächst wurde ein Aktionspotential ausgelöst und danach versucht, in möglichst kurzem Abstand erneut ein Aktionspotential auszulösen. In physiologischer Lösung betrug die Refraktärperiode etwa 18 ms. In Gegenwart von extrazellulärem Cs⁺ war eine leichte Zunahme der Refraktärperiode zu beobachten, unabhängig davon, ob dem ersten Aktionspotential eine Hyperpolarisation vorausging oder nicht. Die kurzen schwarzen Linien markieren jeweils den Zeitpunkt, zu dem im Mittel das Maximum der Aktionspotentiale auftrat. Die punktierte Linie markiert zur Verdeutlichung den Zeitpunkt, zu dem das zweite Aktionspotential in physiologischer Lösung frühestens gebildet wurde.

Unter den drei Versuchsbedingungen wurden jeweils 8 bis 10 Durchläufe im Abstand von 5 s durchgeführt. Die Aktionspotentiale wurden durch Strominjektion ausgelöst (+5 nA für 5 ms für das erste Aktionspotential, +10 nA für das zweite). Die kurzen Spitzen stellen Reizartefakte dar und markieren Beginn und Ende der Strominjektion.