

**Subtypspezifische Hemmung einzelner, humaner,
rekombinanter T-Typ-Calcium-Kanäle durch das
Inhalationsnarkotikum Distickstoffmonoxid (Lachgas) als
Ansatzpunkt für ein neues analgetisches Wirkprinzip.**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kerstin Behnke

aus

Köln

Bonn 2007

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. S. Herzig
2. Referent: Prof. Dr. K. Mohr

Tag der Promotion: 06.07.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch 2007 publiziert.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Schmerz und Analgesie | |
| 1.1.1 Schmerz | |
| 1.1.2 Analgesie | 2 |
| 1.1.2.1 Nicht-Opioidanalgetika | 3 |
| 1.1.2.2 Opioidanalgetika der Stufe II | 4 |
| 1.1.2.3 Opioidanalgetika der Stufe III | |
| 1.1.2.4 Co-Analgetika | |
| 1.1.2.4.1 Antidepressiva | |
| 1.1.2.4.2 Antiepileptika | 5 |
| 1.2 Stand der Forschung | |
| 1.2.1 Ionenkanäle | 6 |
| 1.2.2 Spannungsabhängige Calcium-Kanäle | |
| 1.2.3 Hoch- und niedrigspannungsregulierte Calcium-Kanäle | 8 |
| 1.2.4 L-Typ-Calcium-Kanäle | |
| 1.2.5 Non-L-Typ-Calcium-Kanäle | 9 |
| 1.2.6 T-Typ-Calcium-Kanäle | 10 |
| 1.2.7 Ethosuximid | 12 |
| 1.2.8 Mibefradil | |
| 1.2.9 Nickel | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 1.2.10 Anandamid | |
| 1.2.11 Lachgas | 14 |
| 1.3 Fragestellung | 15 |
| ----- | |
| 2. Material und Methoden | 17 |
| 2.1 Material | |
| 2.1.1. Arbeitsgeräte | |
| 2.1.2 Computer-Software | 19 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterial | 20 |
| 2.1.4 Chemikalien / Reagenzien / Enzyme | 21 |
| 2.2 Methoden | 23 |
| 2.2.1 Zellkultur | |
| 2.2.1.1 Auftauen | 24 |
| 2.2.1.2 Subkultivierung | |
| 2.2.1.3 Einfrieren | 25 |
| 2.2.1.4 Medienzusammensetzung | 26 |
| 2.2.2 Plasmidvermehrung und –aufreinigung | 28 |
| 2.2.2.1 Materialien für die Mikrobiologie | 29 |
| 2.2.2.2 Herstellung elektrokompetenter E. coli | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.2.2.3 Elektroporation von Cav3.1, Cav3.2 und Cav3.3 | 31 |
| 2.2.2.4 Plasmidpräparation mit Quiagen Plasmid Maxi Kit | |
| 2.2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spot-Test | 32 |
| 2.2.2.6 UV-VIS-Spektroskopie | 33 |
| 2.2.2.7 Identifikation der präparierten Plasmide mittels Gelelektrophorese | 34 |
| 2.2.3 Transiente Transfektion | |
| 2.2.4 Patch-Clamp-Technik | 37 |
| 2.2.4.1 Messkonfigurationen | 38 |
| 2.2.4.2 Versuchsaufbau | 40 |
| 2.2.5 Versuchsdurchführung | 43 |
| 2.2.5.1 Herstellung der Glaspipetten | |
| 2.2.5.2 Materialien für die Patch-Clamp-Versuche | 44 |
| 2.2.5.3 Einzelkanalmessungen | 45 |
| 2.2.5.4 Auswertung der Einzelkanalmessungen | 47 |
| 2.2.5.5 Einzelkanalparameter des sehr schnellen Schaltverhaltens | 49 |
| 2.2.5.6 Einzelkanalparameter des schnellen Schaltverhaltens | |
| 2.2.5.7 Einzelkanalparameter des langsamen Schaltverhaltens | 52 |
| 2.2.5.8 Mittlerer Summenstrom | |
| 2.2.5.9 Korrektur von Mehrkanalexperimenten | 53 |
| 2.2.6 Lachgas | 54 |
| 2.2.7 Lachgas-Bestimmung | 55 |
| 2.2.8 Statistik | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Ergebnisse | 57 |
| 3.1 gaschromatographische N₂O-Bestimmung | |
| 3.1.1 Validierung | |
| 3.1.2 N ₂ O-Konzentrations-Zeit-Verläufe | 61 |
| 3.1.3. Tabellarische Zusammenfassung der N ₂ O-Konzentrationsbestimmung | 62 |
| 3.2 Vermessung der stabil transfizierten HEK-293-Zellen | 64 |
| 3.2.1 Haltepotential -90 mV | |
| 3.2.1.1 stabil transfizierte, rekombinante Ca _v 3.2 | 65 |
| 3.2.1.2 stabil transfizierte, rekombinante Ca _v 3.1 | 66 |
| 3.2.1.3 stabil transfizierte, rekombinante Ca _v 3.3 | 69 |
| 3.2.2 Stabil transfizierte, rekombinante Ca _v 3.2 auf Einzelkanalebene unter 100% N ₂ O | 72 |
| 3.2.3 Stabil transfizierte, rekombinante Ca _v 3.2 auf Einzelkanalebene unter 80% N ₂ O | 76 |
| 3.3 Vermessung der transient transfizierten HEK-293-Zellen | 79 |
| 3.3.1 Ca _v 3.1 und Ca _v 3.2 transient transfiziert | |
| 3.3.1.1 Ca _v 3.1 und Ca _v 3.2 unter 100% N ₂ O und V _H = -90 mV | |
| 3.3.1.2 Ca _v 3.1 und Ca _v 3.2 unter 80% N ₂ O und V _H = -90 mV | 81 |
| 3.3.1.3 Ca _v 3.1 und Ca _v 3.2 unter 100 % N ₂ O und V _H = -50 mV | 84 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.1.4 $\text{Ca}_v3.1$ und $\text{Ca}_v3.2$ unter 80 % N_2O und $V_H = -50$ mV | 86 |
| 3.3.2 Konstrukte | 89 |
| 3.3.2.1. Identifikation der plasmidischen Konstrukte | |
| 3.3.2.1.1 Identifikation von Konstrukt I | |
| 3.3.2.1.2 Identifikation von Konstrukt II | 90 |
| 3.3.2.2 Vermessung der plasmidischen Konstrukte | 91 |
| ----- | |
| 4. Diskussion | 93 |
| 4.1 Gaschromatographische Bestimmung | |
| 4.2 Gaschromatographische Auswertung | |
| 4.3 Quantitative N_2O-Bestimmung | 94 |
| 4.4 Hypoxie | 95 |
| 4.5 „whole-cell-artige“ Ströme im stabilen Expressionssystem | |
| 4.6 Einzelkanalmessungen im stabilen Expressionssystem | 97 |
| 4.7 Einzelkanalmessungen im transienten Expressionssystem | |
| 4.7.1 Einzelkanalparameter Verfügbarkeit | 98 |
| 4.7.2 Einzelkanalparameter mittlerer Spitzenstrom | 99 |
| 4.7.3 Einzelkanalparameter Verweildauer | 100 |
| 4.8 Ausblick | 101 |
| ----- | |

| | |
|---------------------------|------------|
| 5. Zusammenfassung | 103 |
|---------------------------|------------|

| | |
|--------------------------------|------------|
| 6. Literaturverzeichnis | 105 |
|--------------------------------|------------|

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| $A_{260/280}$ | Absorption bei 260/280 nm Lichtwellenlänge |
| avl | Verfügbarkeit |
| avl' | korrigierte Verfügbarkeit |
| $b_{0,5}$ | Halbwertsbreite |
| Ba^{2+} | zweiwertiges Barium-Kation |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| Ca^{2+} | zweiwertiges Calcium-Kation |
| Ca_v | spannungsabhängige Calcium-Kanäle |
| CB | Cannabinoid |
| CO_2 | Kohlendioxid |
| d.h. | das heißt |
| E. coli | Escherichia coli |
| et al. | et alii |
| fA | Femtoampere (10^{-15} Ampere) |
| GABA | gamma-amino-Buttersäure |
| GFP | green fluorescent protein |
| $G\Omega$ | Gigaohm (10^9 Ohm) |
| IC_{50} | halbmaximale Hemmkonzentration |
| HEK | human embryonic kidney |
| HVA | high voltage activated |
| I_{peak} | mittlerer Spitzenstrom |
| I_{sum} | Summenstromfunktion |
| kb | Kilobasen (10^3 Basenpaare) |

| | |
|----------------------|---|
| kHz | Kilohertz (10^3 Hertz) |
| kV | Kilovolt (10^3 Volt) |
| LVA | low voltage activated |
| μF | Mikrofarad (10^{-6} Farad) |
| M_0 | Anzahl aller auswertbaren Spuren |
| MAC | minimale alveoläre Konzentration |
| M_{active} | Anzahl aktiver Spuren |
| ml | Milliliter (10^{-3} Liter) |
| mot | mittlere Offenzeit |
| mP_{open} | mittlere Offenwahrscheinlichkeit |
| mP_{open}' | korrigierte Offenwahrscheinlichkeit |
| mRNA | messenger-Ribonukleinsäure |
| mV | Millivolt (10^{-3} Volt) |
| $M\Omega$ | Megaohm (10^6 Ohm) |
| n | Anzahl der Kanäle im Experiment |
| NMDA | N-methyl-D-aspartat |
| N_2O | Distickstoffmonoxid |
| N_{open} | Anzahl der Öffnungen |
| OPA | Operationsverstärker |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| pA | Pikoampere (10^{-12} Ampere) |
| pcDNA | plasmidische, komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| P_{CMV} | Zytomegalievirus-Promoter |
| pH | negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration |
| p_i | Gewichtung |

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| pS | Pikosiemens (10^{-12} Siemens) |
| R | Auflösung |
| R _f | Rückkopplungswiderstand |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| S _s | Peaksymmetrie |
| t ₀ | Pulsdauer |
| t _{m+s} | Bruttoretentionszeit |
| t _{open} | totale Offenzeit |
| USP | United States Pharmacopeia |
| UV | ultraviolett |
| V _H | Haltepotential |
| VIS | visuell |
| WHO | World Health Organization |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

1.1 Schmerz und Analgesie

1.1.1 Schmerz

Schmerz ist eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die mit einer aktuellen oder möglichen Gewebeerletzung einhergeht oder in Begriffen eines solchen Schadens beschrieben wird (International Association for the Study of Pain, <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>). Schmerz übernimmt im Körper eine Warnfunktion (Scholz und Woolf, 2002). Fässt man versehentlich in einen Topf kochenden Wassers, lässt einen der eintretende Schmerz die Hand sofort zurückziehen, um eine Gewebeerletzung zu verhindern. Demgegenüber gibt es chronische Schmerzzustände, die für den Betroffenen keine sinnvolle Funktion mehr erfüllen. Durch anhaltende Erregung der schmerzvermittelnden Nervenfasern werden diese sensibilisiert und können lernen, auch auf normalerweise nicht gewebeerletzende Eingriffe, wie z.B. harmlose Berührungen, mit Schmerzen zu reagieren (Allodynie). Dem aufsteigenden, nozizeptiven, schmerzaufnehmenden System steht das absteigende, antinozizeptive, schmerzhemmende System gegenüber. Man unterscheidet Nozizeptor- und neuropathischen Schmerz (*Tabelle 1*). Nozizeptorschmerz geht von Weichteilen, Knochen, Eingeweiden und ischämischen Regionen aus und lässt sich als tiefer, dumpfer oder auch krampfartig stechender Schmerz charakterisieren. Neuropathischer Schmerz geht von den betroffenen Nerven aus und ist anhaltend oder auch einschneidend brennend. (Steinberger M./Beyer A. , 2005).

Tabelle 1: Schmerzarten (aus: Deutsche Krebsgesellschaft: Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2002, 3. Auflage 2002: Medikamentöse Schmerztherapie)

| Schmerztyp | Schmerzursache | Attributierung | Lokalisation | Besonderheit |
|---------------|--|--|---|--|
| nozizeptiv | in Knochen, in Weichteilen | dumpf, drückend, pochend, bohrend | gut lokalisierbar | Dauerschmerz, oft mit bewegungsabhängigem Durchbruchschmerz |
| | in Viszera | dumpf, krampfartig, oft kolikartig | schlecht lokalisierbar | vegetative Begleitsymptome |
| | Ischämie | hell, pochend | Extremität, auch viszeral möglich | belastungsabhängig; abhängig von Nahrungsaufnahme |
| neuropathisch | Schädigung oder Irritation des Nervensystems | einschießend, elektrisierend, brennend, heiß | im Versorgungsgebiet der betroffenen Nervenstruktur | meist mit neurologischen Störungen einhergehend: z.B. Hypästhesie, Anästhesie, Parästhesie, Dysästhesie, Allodynie |

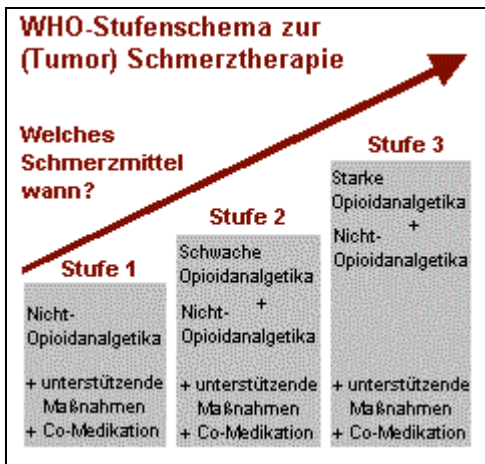
1.1.2 Analgesie

Analgesie ist die Abwesenheit von Schmerz als Folge von einem Stimulus, der normalerweise schmerzhaft wäre (International Association for the Study of Pain, <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>).

Hinsichtlich ihrer Therapiemöglichkeiten unterscheiden sich Nozizeptor- und neuropathischer Schmerz. Während der Nozizeptorschmerz gemäß dem WHO-

Stufenschema (Abbildung 1) zunächst mit nicht-opioiden, bei unzureichender Schmerz Eindämmung mit opioiden Analgetika behandelt wird, spricht der neuropathische Schmerz gut auf sog. Co-analgetika wie trizyklische Antidepressiva und Antiepileptika an (Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft 2002 und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2002) . Die Opioide kommen erst neuerdings auch beim neuropathischen Schmerz vermehrt zum Einsatz (Kulm A. et al, 2004).

Abbildung 1:



1.1.2.1 Nicht-Opioidanalgetika:

Hierzu zählen die nicht-steroidalen Antirheumatika wie Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac, aber auch das spasmolytische Metamizol und antipyretische Paracetamol. Diese „kleinen“ Analgetika reichen in ihrer schmerzhemmenden Potenz zur Behandlung von starken, insbesondere chronischen Schmerzen meist nicht aus.

1.1.2.2 Opioidanalgetika der Stufe II (mäßig starke bis starke Schmerzen):

Codein, Dihydrocodein, Tilidin/Naloxon, Tramadol

1.1.2.3 Opioidanalgetika der Stufe III (starke bis stärkste Schmerzen) :

Morphin, Fentanyl, L-Methadon, Oxycodon, Hydromorphonon, Buprenorphin. Hier sind die bekannten unerwünschten Arzneimittelwirkungen Verstopfung, Sedation und Suchtpotential neben einem Wirkungsverlust aufgrund von Gewöhnung zu beachten (Vanegas G. R. N. et al., 1998).

1.1.2.4 Co-Analgetika:

1.1.2.4.1 Antidepressiva:

Die Wirksamkeit von Antidepressiva zur Behandlung von Schmerzen ist gut belegt (Fishbain D., 2000). Sie gelten für die Behandlung neuropathischer Schmerzen als Mittel der ersten Wahl (Block F., Habermeyer B., 2003). Als mögliche Wirkungsmechanismen kommen eine Blockade von Natriumkanälen, eine Antagonisierung von NMDA-Rezeptoren und eine Einflussnahme auf das monoaminerge System in Betracht (Kulm A. et al., 2004).

1.1.2.4.2 Antiepileptika:

Lamotrigin, ein Natriumkanal-blockierendes Antiepileptikum, wurde erfolgreich in der Therapie verschiedenster neuropathischer Schmerzzustände geprüft (Block F./Habermeier B., 2003; Dickinson T. et al., 2003).

Neben den älteren Substanzen Carbamazepin und Phenytoin werden insbesondere Gabapentin (Wiffen P. et al., 2005) und dessen Analogon Pregabalin (Dworkin R.H. et al., 2003) in der Therapie neuropathischer Schmerzen eingesetzt. Gabapentin bindet an die $\alpha_2\delta-1$ - bzw. weniger stark ausgeprägt an die $\alpha_2\delta-2$ -Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle und hemmt diese. Ob diese Interaktion und/oder ein agonistischer Effekt an GABA_B-Rezeptoren für die Wirksamkeit verantwortlich ist, ist noch nicht abschliessend geklärt (Klugbauer N. et al., 2003). Zumindest wird in Tiermodellen des neuropathischen Schmerzes die $\alpha_2\delta-1$ -Untereinheit heraufreguliert (Luo Z. D. et al., 2002). Interessanterweise stimuliert die $\alpha_2\delta-1$ -Untereinheit die membranäre Expression von spannungsabhängigen T-Typ-Calcium-Kanälen (Dubel S. J. et al., 2004). Gabapentin ist zusammen mit Pregabalin die einzige Substanz, die bisher für die Indikation neuropathischer Schmerz zugelassen wurde.

1.2 Stand der Forschung

Ungenügendes Ansprechen auf die beschriebenen Pharmaka und erhebliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen der eingesetzten Substanzen lassen die Bemühungen, neue analgetische Wirkprinzipien zu finden bzw. zu verbessern, nicht ruhen (Scholz und Woolf, 2002). In den Focus des Interesses sind in den letzten Jahren auch insbesondere spannungsabhängige Calciumkanäle gerückt (Bourinet E./Zamponi G. W., 2005).

1.2.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle in der Zellmembran ermöglichen den Ionenaustausch zwischen Extra- und Intrazellulärraum. Ein spannungsabhängiger Ionenkanal richtet sein Öffnungsverhalten am Membranpotential aus. Demgegenüber öffnet ein ligandengesteuerter Ionenkanal erst nach Bindung einer spezifischen Substanz an den innerhalb des Ionenkanal-Proteins liegenden Rezeptor. Das Ruhemembranpotential oder auch Standardmembranpotential, bei dem die meisten spannungsabhängigen Ionenkanäle im geschlossenen Zustand vorliegen, liegt bei ca. -90mV . Wird die Membran depolarisiert, das Potential also auf einen gewissen Schwellenwert angehoben, öffnet sich der Kanal und ermöglicht Ioneneinstrom oder -ausstrom. Darüber nimmt dieser Kanal an der Weiterleitung des Aktionspotentials aktiv teil. Über die Öffnung des Kanals und den daraufhin erfolgenden Ionenaustausch wird die jeweilige Information weitergeleitet.

1.2.2 Spannungsabhängige Calcium-Kanäle

Spannungsabhängige Calcium-Kanäle spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Calcium-Homöostase und sind darüber an Muskelkontraktionen, Chemotaxis, Genexpression, synaptischer Plastizität und der Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern beteiligt (Bootman M. D., 2001). Spannungsabhängige Calcium-Kanäle (Ca_v) lassen sich nach ihrer porenbildenden $\alpha 1$ -Untereinheit in drei Familien einteilen (Ca_v1-3). Innerhalb einer Familie besteht mehr als 70% Aminosäuresequenz-Identität. Hingegen sind die Familien untereinander weniger als 40% identisch (Ertel et al., Neuron 2000; 25: S. 533-535). Eine bildliche Darstellung für die konservierten Bereiche der Transmembranspannen und der Porenregion enthält *Abbildung 2*. Die Aufteilung in drei Familien scheint phylogenetisch schon über 500 Millionen Jahre alt zu sein, da sich je ein Vertreter der drei Familien in dem Wurm *Caenorhabditis elegans* finden ließ (Perez-Reyes E., *Physiol Rev* 2003; 83: 117-161).

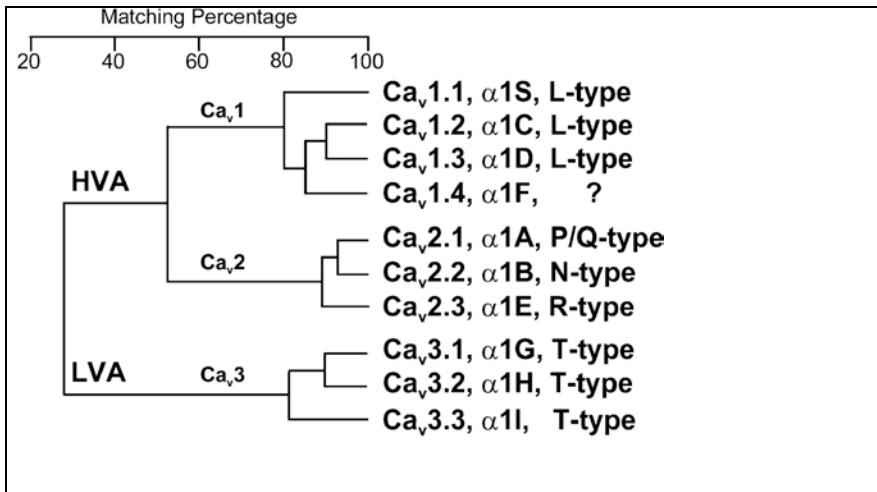


Abbildung 2: Stammbaum spannungsabhängiger Calcium-Kanäle. Zugrunde liegen die konservierten transmembranären und Poren-formenden Regionen. Zugrundelegung der vollständigen Sequenz würde den Stammbaum aufgrund des Einschlusses von nicht-konservierten Bereichen nach links verschieben. Entnommen aus Perez-Reyes E., *Physiol Rev* 2003; 83: 117-161.

Die porenbildende $\alpha 1$ -Untereinheit spannungsabhängiger Calcium-Kanäle besteht aus vier Domänen, die ihrerseits jeweils aus sechs transmembranären, α -helikalen Segmenten bestehen (*Abbildung 3*). Amino- und Carboxyterminus sind cytosolisch orientiert. Das jeweils vierte Segment ist durch die hier stark vertretenen Aminosäuren Lysin und Arginin positiv geladen und dient als Spannungssensor. Bei einer Depolarisation der umgebenden Zellmembran kommt es durch die veränderten Ladungsverhältnisse zu einer Konformationsänderung und damit Öffnung der Kanalpore (Bezanilla F., 2000). Zwischen den Segmenten fünf und sechs existiert pro Domäne eine sogenannte P-Region, die die Kanalpore nach innen auskleidet (Varadi et al., 1999).

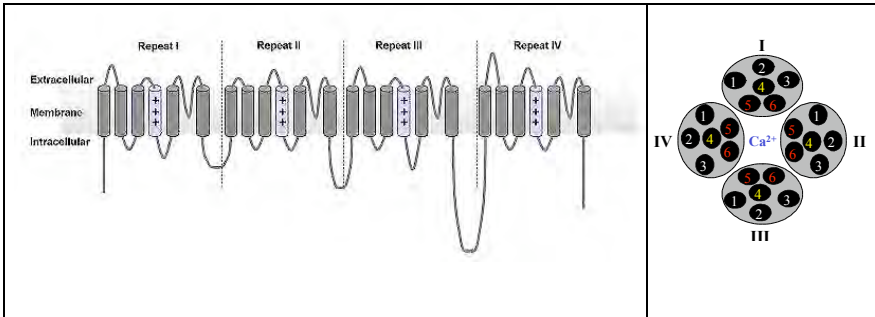


Abbildung 3: Dargestellt sind die 4 Domänen mit je sechs Transmembranspannungen und zwischen den Segmenten 5 und 6 die Porenregion, links in der Seitenansicht, rechts in der Aufsicht.

1.2.3 Hoch- und niedrigspannungsregulierte Calcium-Kanäle

Daneben werden bereits seit 1975 hoch- und niedrigspannungsregulierte Calcium-Kanäle unterschieden (Hagiwara S. /Byerly L., 1981). Die Familien Ca_v1 und Ca_v2 werden als hochspannungsreguliert, die Familie Ca_v3 als niedrigspannungsreguliert bezeichnet. Das bedeutet, dass die niedrigspannungsregulierten Calcium-Kanäle bereits bei Membranpotentialen, die nahe dem Ruhemembranpotential liegen, öffnen, während die hochspannungsregulierten starke Depolarisationen zum Öffnen benötigen. Die hochspannungsregulierten werden unterteilt in den „L-Typ“ (Ca_v1) und den „non-L-Typ“ (Ca_v2), die niedrigspannungsregulierten werden als „T-typ“ (Ca_v3) bezeichnet. L steht für „long lasting“, T für „transient“ oder auch „tiny“ und charakterisiert das Inaktivierungsverhalten bzw. die Leitfähigkeit der Kanäle (Tsien et al., 1985).

1.2.4 L-Typ-Calcium-Kanäle

Vier porenbildende $\alpha1$ -Untereinheiten bilden die Gruppe der L-Typ-Calcium-Kanäle, die durch die klassischen Calcium-Kanal-Blocker (Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine) inhibiert werden können. Ein Calciumeinwärtsstrom durch diese

Ionenkanäle vermittelt intrazellulär unterschiedliche Effekte wie Muskelkontraktion oder auch Hormonsekretion (Perez-Reyes E., 2003). So wird z.B. in der Skelettmuskulatur über $Ca_v1.1$ die elektromechanische Kopplung vermittelt, in Herzmuskelzellen reguliert der über $Ca_v1.2$ initiierte Calciumeinwärtsstrom die Calciuminduzierte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Bers D. M./Perez-Reyes E., 1999).

1.2.5 Non-L-Typ-Calcium-Kanäle

Die „Non-L-Typ“ hochspannungsregulierten Calcium-Kanäle Ca_v2 werden durch die oben erwähnten klassischen Calcium-Kanal-Blocker nicht beeinflusst. Sie werden hingegen durch peptidische Gifte aus Spinnen bzw. Meeresschnecken blockiert. So hemmt das Spinnengift ω -Agatoxin-IVA den P/Q-Typ, die Schneckengifte ω -conotoxin GVIA und ω -conotoxin MVIIA den N-Typ-Calcium-Kanal durch Verschluss der Kanalpore (Altier C. und Zamponi G. W., 2004). Vorrangig reguliert diese Kanal-Familie über den präsynaptischen Calcium-Einstrom die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt und damit die neuronale Erregungsweiterleitung. Die gegenwärtige Forschung konzentriert sich auf die Derivatisierung der blockierenden, hochpotenten Naturstoffe mit dem Ziel besser verträgliche Substanzen zum Einsatz bringen zu können. Insbesondere $Ca_v2.2$ ist in den Focus der Analgetika-Forschung gelangt. Diese N-Typ-Calcium-Kanäle lassen sich in großer Anzahl in den Bereichen des Rückenmarks finden, die für die Schmerzperzeption zuständig sind. Dort treten sie im Verbund mit der Opioid-Rezeptor-Familie auf (Bourinet E./Zamponi G. W., 2005). Eine Blockade der N-Typ-Calcium-Kanäle verringert die Freisetzung von Substanz P (Smith M. T. et al., 2002), einem neuronalen Peptid, das an der Weiterleitung von Schmerzimpulsen beteiligt ist. Auch werden N-Typ-Calcium-Kanäle durch μ -Opioid-Agonisten wie Morphin über eine Aktivierung von Opioid- und Opioid-Rezeptor-ähnliche Rezeptoren gehemmt (Altier C./Zamponi G. W., 2004). $Ca_v2.2$ -knockout-Mäuse sind gegenüber neuropathischem und entzündlichem Schmerz unempfindlicher als Wildtypische (Saegusa H. et al., 2001).

Ziconotid (unter dem Handelsnamen Prialt[®] in den USA von der FDA und in Europa von der EMEA 2005 zugelassen), ein synthetisches Analogon von aus der Kegelschnecke *Conus magus* isoliertem ω -Conotoxin MVIIA, konnte bereits zeigen, dass es intrathekal appliziert bei Tier und Mensch zur Analgesie führt (Scott D. A. et al., 2002; Staats P. S. et al., 2004). Eine amerikanische Firma prüft derzeit einen oral verfügbaren N-Typ-Calcium-Kanal-Blocker in klinischen Prüfungen der Phase II (www.neuromed.com). Diese hierüber stattfindende direkte Hemmung des präsynaptischen Calcium-Einstroms soll gegenüber der über den Opioidrezeptor vermittelten Hemmung den Vorteil haben, dass keine Toleranzentwicklung stattfindet (Bourinet E./Zamponi G. W., 2005). Das bereits erwähnte Gabapentin scheint seine Wirkung über eine Bindung an $\alpha_2\delta$ -1 und darauffolgende Hemmung präsynaptischer N-Typ-Calcium-Kanäle zu vermitteln. Eine Beteiligung der Ca_v2 -Familie am Schmerzgeschehen legt auch die Tatsache nahe, dass der P/Q-Subtyp bei einer speziellen Form der Migräne, der familiären hemiplegischen Migräne, einen Gendefekt aufweist (Ophoff R. A. et al., 1997).

1.2.6 T-Typ-Calcium-Kanäle

T-Typ-Calcium-Kanal blockierende Substanzen sind in den letzten Jahren ebenfalls in das Interesse der Analgetikaforschung vorgerückt (Priest B. et al., 2006). Die T-Kanalsubtypen spielen im peripheren Schmerzgeschehen eine Rolle (Todorovic S. M. et al., 2004b). Flunarizin, ein L- und T-Typ-Calcium-Kanalblocker, wird erfolgreich zur Migräneprophylaxe eingesetzt (Kuga T. et al., 1990; Tytgat J. et al., 1996).

T-Typ-Calcium-Kanäle öffnen ab einem Schwellenpotential von -70mV und inaktivieren schnell und vollständig bei Haltepotentialen, die größer als -40mV sind. Sie schliessen/deaktivieren demgegenüber verhältnismäßig langsam. T-Typ-Kanäle leiten Barium und Calcium ungefähr gleich gut, wobei ihre Leitfähigkeit von 5 bis 11 pS insgesamt gering ist (Zamponi G. W., 2005; Perez-Reyes E., 2003). $Ca_v3.3$ läßt sich von $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ dadurch unterscheiden, dass $Ca_v3.3$ größere Depolarisationen zum Öffnen benötigt und dass die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik dieses Kanals

wesentlich langsamer als die der anderen beiden T-Typ-Calcium-Kanäle ist (Lee J.-H. et al., 1999). Darüber hinaus wird $\text{Ca}_v3.3$ von dem Skorpiengift Kurtoxin, im Gegensatz zu den anderen beiden Subtypen, nicht blockiert (Lacinová L., 2004)

Man findet T-Typ-Calcium-Kanäle in großer Anzahl im ZNS und darüber hinaus in Geweben von Herz und Niere, in glatter und Skelettmuskulatur, in den Hoden und in endokrinen Geweben wie den Nebennieren, der Hypophyse und dem Pankreas (Perez-Reyes E., 2003). Aufgrund ihres niedrigen Schwellenpotentials spielen sie als Reizgeneratoren im ZNS und als Schrittmacher im Herzmuskelgewebe eine Rolle. Obwohl die klassischen Calcium-Kanal-Blocker und auch die Conotoxine T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle nicht hemmen, wurde zuletzt von Dihydropyridinderivaten berichtet, die diese prävalent hemmen sollen (Kumar P. P. et al., 2002; Furukawa T. et al., 2004). Da die Zellen des nozizeptiven Systems große Mengen an T-Typ-Calcium-Kanälen generieren (Nelson M. T. et al., 2005; Talley et al., 1999) liegt ihre Beteiligung am Schmerzgeschehen nahe (Todorovic S. M., 2001b, Todorovic S. M., 2004). So konnte das Einbringen von $\text{Ca}_v3.2$ -Antisense-Oligonukleotiden eine Abnahme an $\text{Ca}_v3.2$ -mRNA, -Protein, „ $\text{Ca}_v3.2$ -artigen“ T-Typ-Strömen und einhergehend antinozizeptive, anti-hyperalgetische und anti-allodyne Effekte bewirken (Bourinet E., 2005). Demgegenüber zeigte eine $\text{Ca}_v3.1$ -knockout-Maus keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber thermischen oder mechanischen Schmerzreizen und unterschied sich nach Einleitung von Hyperalgesie nicht von wildtypischen Mäusen, zeigte allerdings eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber viszeralem Schmerz (Kim D., 2003). Dies zusammen genommen deutet darauf hin, dass $\text{Ca}_v3.2$ eine pro-nozizeptive (Hildebrand M. E./Snutch T. P., 2006), $\text{Ca}_v3.1$ eine anti-nozizeptive Funktion zukommen könnte (Snutch T. P./David L. S., 2006). Ziel der aktuellen Forschung muss es daher sein, subtypspezifische Substanzen zu entwickeln.

Neben den genannten elektrophysiologischen Unterscheidungsmerkmalen wurden Ethosuximid, Mibefradil, Nickel, Anandamid und Lachgas als pharmakologische Werkzeuge zur Unterscheidung spannungsabhängiger T-Typ-Calcium-Kanäle herangezogen.

1.2.7 Ethosuximid

Das Antiepileptikum Ethosuximid, das vorwiegend bei Absence-Epilepsien eingesetzt wird, inhibiert alle drei Ca_v3 bei therapeutisch relevanten Konzentrationen (Gomora J. C. et al., 2001). Inwieweit auch hochspannungsregulierte Calcium-Kanäle gehemmt werden, ist bisher noch nicht ausreichend untersucht (Perez-Reyes E. et al, 2003). Es wird vermutet, dass bei einer Verdopplung der Dosis Ethosuximid auch hochspannungsregulierte Calcium-Kanäle inhibiert würden, so dass diese Substanz nur eingeschränkt zur Unterscheidung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen verwendet werden kann. Im Hinblick auf eine Beteiligung von T-Typ-Calcium-Kanälen an nozizeptiven Vorgängen, konnte gezeigt werden, dass Ethosuximid in neuropathischen Tiermodellen analgetisch wirkte (Dogrul A. et al, 2003; Flatters S. J. L., 2004).

1.2.8 Mibefradil

Mibefradil ist ein Antihypertensivum, das aufgrund zahlreicher lebensbedrohlicher Wechselwirkungen kurz nach Einführung wieder vom Markt genommen werden musste (Mullins M.E. et al., 1998; Schlingensief K.H. und Platon J., 1998; Matthes et al., 2000). Es blockiert $\text{Ca}_v3.1$ mit einem IC_{50} -Wert von $2 \mu\text{mol/l}$ (Monteil A. et al., 2000), $\text{Ca}_v3.2$ mit einem IC_{50} -Wert von $1,4 \mu\text{mol/l}$ (Cribbs L. et al., 1998) und weist zu $\text{Ca}_v3.3$ die geringste Affinität auf (Lacinová L., 2004). Es ist ein relativ unspezifischer Calcium-Kanal-Blocker (Jimenez C. et al., 2000). So werden nicht nur die T-Subtypen, sondern auch die hochspannungsregulierten Calcium-Kanäle $\alpha1A$, $\alpha1B$, $\alpha1C$ und $\alpha1E$ durch Mibefradil inhibiert (Mishra S.K./Hermsmeyer K., 1994; Bezprozvanny I./Tsien R.W., 1995). In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass $10 \mu\text{M}$ Mibefradil native T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und rekombinante $\text{Ca}_v3.2$ -Kanäle in einer zweifachen Hinsicht hemmt: Es reduziert den Anteil an aktiven Spuren, kennzeichnend für eine langanhaltende Interaktion im Bereich von Sekunden, und es reduziert daneben leicht die Dauer des offenen Kanalzustandes, was zusätzlich eine schnelle Interaktion im

Millisekundenbereich widerspiegelt (Michels. G. et al., 2002) Für das vorliegende Projekt ist insbesondere hervorzuheben, dass Mibefradil neben seiner blutdrucksenkenden Wirkung auch antinozizeptive Eigenschaften aufweist (Todorovic S. M. et al., 2001b; Todorovic S.M. et al., 2002; Todorovic S. M. et al., 2004a; Barton M. E. et al., 2005). Es verstärkt die durch Morphin hervorgerufene analgetische Wirkung und verhindert eine Toleranzentwicklung bei Dauerapplikation von Morphin (Dogrul A. et al., 2002)

1.2.9 Nickel

Nickel hemmt $Ca_v3.2$ ($IC_{50} = 13 \mu\text{mol/l}$), $Ca_v3.1$ ($IC_{50} = 250 \mu\text{mol/l}$) und $Ca_v3.3$ ($IC_{50} = 216 \mu\text{mol/l}$) (Lee J.-H. et al., 1999). Die Hemmwirkung ist jedoch spannungsabhängig. Oberhalb von -30mV ist die Blockade äußerst gering. Daneben werden auch hochspannungsregulierte Calcium-Kanäle durch Nickel gehemmt, jedoch erst bei höheren Konzentrationen als bei $Ca_v3.2$ (Zamponi et al., 1996).

1.2.10 Anandamid

Anandamid (N-arachidonoyl ethanolamin), ein endogener Ligand an Cannabinoid (CB) - Rezeptoren ahmt, vorwiegend über CB1-Rezeptoren, die Wirkungen der psychoaktiven Substanz aus *Cannabis sativa* L., Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, nach. Unabhängig von dieser CB1-Rezeptor-Aktivierung hemmt Anandamid spannungsabhängige T-Typ-, aber nicht L-Typ-Calcium-Kanäle in submicromolaren Konzentrationen, indem es die Kanäle in ihrem inaktivierten Zustand stabilisiert (Chemin J. et al., EMBO J. 2001; 20 (24): 7033-7040). Es blockiert alle drei T-Subtypen (Lacinová L., 2004). Mit Ethosuximid und Mibefradil gemeinsam hat Anandamid die analgetische Wirkkomponente. Cannabinoide werden seit geraumer Zeit erfolgreich in der Behandlung therapierefraktärer Schmerzen eingesetzt.

1.2.11 Lachgas

Lachgas (Distickstoffmonoxid, Stickoxydul, N_2O) ist ein alt bekanntes Inhalationsnarkotikum, das wegen seiner ausgeprägten analgetischen Wirkkomponente nach wie vor in der Anästhesie eingesetzt wird. Es hat daneben den Vorteil, weniger stark sedierend zu wirken (Faddy S. C. et al., 2005) und den Anteil anderer Inhalationsanästhetika am Inhalationsgemisch zu reduzieren. Seit die von Meyer und Overton formulierte und lange angenommene Theorie der unspezifischen Membranwirkung aller Inhalationsnarkotika als überholt angesehen werden muss, rücken insbesondere Ionenkanäle als mögliche Angriffspunkte von Narkotika in den Blickpunkt des Interesses (Franks N. P. and Lieb W. R., 1994; Campagna J.A. et al., 2003). So gibt es Hinweise darauf, dass Lachgas nicotinische Acetylcholin-Rezeptoren und/oder Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Subtyp inhibiert (Yamakura T. and Harris R. A., 2000; Jevtic-Todorovic et. al., 1998). Die NMDA-Rezeptorblockade wird neben Lachgas auch von dem ebenfalls analgetisch wirkenden Ketamin berichtet (Grasshoff C. et al., 2006), weswegen beide Substanzen nicht gemeinsam bei der Durchführung einer Narkose verwendet werden dürfen (Lüllmann H./Mohr K./Hein L., 2006). Todorovic und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Lachgas native T-Typ-Calcium-Kanäle von ganglionären, sensorischen Neuronen und in gleichem Ausmaß rekombinante $Ca_v3.2$, nicht jedoch rekombinante $Ca_v3.1$ subtypspezifisch hemmt (Todorovic S.M. et al., 2001a). Daneben hemmt Lachgas retikularthalamische Neuronen der Ratte, nicht jedoch rekombinante $Ca_v3.3$ (Jokovic P. M. et al., 2005). Vor dem Hintergrund, dass die Ganglien sensorischer Neurone nur $Ca_v3.2$ und $Ca_v3.3$ exprimieren (Talley E. M. et al., 1999) ergibt sich die Vermutung, dass es sich bei den durch Lachgas hemmbaren nativen T-Typ-Calcium-Kanälen um $Ca_v3.2$ handelt. Da außerdem die Zellen des schmerzverarbeitenden Systems reich an T-Typ-Calcium-Kanälen sind und eine Hemmung von T-Typ-Kanälen in den Ganglien sensorischer Neurone Analgesie vermitteln konnte (Nelson M. T. et al., 2005; Dogrul A. et al., 2003) lässt sich die Hypothese formulieren, dass Lachgas seine analgetische Wirkung über eine subtypspezifische $Ca_v3.2$ -T-Typ-Calcium-Kanal-Blockade vermittelt.

1.3 Fragestellung

Der vorliegenden Arbeit lag die elektrophysiologische Einzelkanaluntersuchung des Effektes von Lachgas auf rekombinante T-Typ-Calcium-Kanäle zu Grunde. Hierfür wurde die Patch-Clamp-Technik verwendet, die es ermöglicht, mit einer frisch hergestellten Glaspipette einen Zellmembranflecken, der sich unter der Pipettenöffnung befindet, derart gut von seiner elektrischen Umgebung abzuschirmen, dass man nach Aufzwingen eines geeigneten Testpotentials den fließenden Strom durch die Ionenkanäle innerhalb des Membranflecks aufzeichnen kann.

Ausgangs- und Arbeitshypothese war die Vermutung, dass Lachgas rekombinante $Ca_v3.2$, nicht jedoch rekombinante $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.3$ subtypspezifisch hemmt. Der zugrunde liegende Blockademechanismus sollte im Hinblick auf Schaltverhalten und Interaktionskinetik spezifiziert werden. Hierfür sollten mit Hilfe der laboreigenen Software die Einzelkanalparameter des sehr schnellen (Mikrosekunden), schnellen (Millisekunden) und langsamen (Sekunden) Schaltverhaltens bestimmt werden.

In einem zweiten Teil sollte eine Eingrenzung möglicher Bindungsstellen von N_2O mit Hilfe rekombinanter Konstrukte aus $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ stattfinden. Hierfür war zunächst vorgesehen, die benötigten Konstrukte molekularbiologisch durch Genrestriktion, Ligation und Amplifikation herzustellen (Klonierungsverfahren). Nach Erhalt der benötigten Konstrukte von zwei befreundeten Arbeitsgruppen konnte dieser Arbeitsschritt abgekürzt werden.

Nachdem sich die vermutete Subtypspezifität im stabilen Expressionssystem verifizieren ließ, wurden alle Ca_v3 auch im transienten Expressionssystem vermessen. Als Expressionssystem standen humane embryonale Nierenzellen (HEK-293-Zellen, human embryonic kidney) in Zellkultur zur Verfügung. Als Genföhre diente der plasmidische Vektor pcDNA3. Wie zuvor im stabilen Expressionssystem wurde dabei untersucht, wie sich unterschiedliche Lachgas-Konzentrationen und die Verwendung unterschiedlicher Haltepotentiale, insbesondere ein inaktivierendes Haltepotential von -50 mV, auf das

Schaltverhalten auswirkt. Im Anschluss wurden die zwei zur Verfügung stehenden chimären Konstrukte ebenfalls transient transfiziert und elektrophysiologisch vermessen.

Insofern wurde die Wirkung des schon seit 150 Jahren eingesetzten Analgetikums und Anästhetikums Distickstoffmonoxid auf rekombinante, humane, einzelne Ca_v3 zur Bestimmung seiner Wirkung auf das Einzelkanalschaltverhalten dieser Kanäle und zur Identifizierung einer neuen Zielstruktur in der Schmerzforschung untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Arbeitsgeräte

| | |
|------------------------|---|
| Analysenwaagen | Feinwaage Typ Sauter Analysenwaage SBC31, Scaltec |
| Autoklaven | Varioklav Dampfsterilisator Typ 400 + Typ 25 T H+P Labortechnik GmbH, München |
| Brutschrank | Function Line Typ BB 16, Heraeus, Hanau |
| Elektrophoresekammer | Horizon 11.14, Life Technologies GibcoBRL |
| Gaschromatograph | Sigma 3B von Perkin-Elmer, 1984 |
| Hamilton-Spritze | gastight, #1710, Bonaduz, Schweiz |
| Heißluftsterilisator | Heraeus, Hanau |
| Heizplatte und –rührer | RCT basic, IKA Labortechnik |
| Inversmikroskop | Model TMS, Nikon, Japan |
| Mikrowelle | M633, Samsung |

Patch-Clamp-Messplätze:

| | |
|--------------------------------|--|
| Analog-Digital-Wandler | TL-1 DMA Interface + Digidata 1200 Series Interface, Axon Instruments, USA |
| Auflichtfluoreszenzerweiterung | TMD, Nikon, Japan |
| Faraday Käfig | Eigenbau |
| Grünfilter | XF22, Omega Optical |
| Hauptverstärker | Axopatch 200A + Axopatch-1D, Axon Instruments, USA |

| | |
|------------------------------|---|
| Inversmikroskop | Diaphot, Nikon, Japan |
| Mikromanipulatoren | Typ MO-102 , öl-hydraulisch + Typ MHW-103, wasser-hydraulisch, Narishige, Japan |
| Netzteil | extern regelbar, zur Versorgung der Lichtquelle des Mikroskopes, Erich Eydam, Kiel |
| Pipettenhalter | Axon HL-1-17, Axon Instruments, USA |
| Quecksilber-Fluoreszenzlampe | Model HB-10104AF No. 7X01219, Nikon, Japan |
| Schwingungsgedämpfter Tisch | Typ LT100/80 S3G8SD, Barry Controls, Raunheim |
| Vorverstärker | CV201A headstage + CV-4 headstage, Axon Instruments, USA |
| Pipettierhilfe | IBS pipetboy acu Integra Biosciences |
| PH-Meter | EA940, Orion Research |
| Photodokumentation: | |
| UV-Licht Apparatur | 3UV-Transilluminator, Modell LMS-20E, UVP, Cambridge, England UV Transilluminator 2000, Bio-Rad, München |
| Digitalkamera | DC290, Kodak, Stuttgart |
| Computer | Apple iMac, Feldkirchen, MIT Kodak 1D LE Fotosoftware |

Pipettenherstellung:

| | |
|--------------------------------|--|
| Apparatur zum Beschichten | Eigenbau |
| Aufbewahrungsgefäße | Science Products GmbH, Hofheim |
| Pipettenschmiede | MF 83, Narishige, Japan |
| Pipettenziehgerät | Narishige, Japan |
| Schüttelinkubator | Minitron HAT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz |
| Schüttelwasserbad | julabo SW-20C, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Spektrophotometer | Beckmann DU 640 |
| Sterilbank | Heraeus Instruments, Hanau |
| Stromquelle zur Elektrophorese | PowerSupply 305, GibcoBRL |
| Zentrifuge | Labofuge 400, Heraeus, Hanau Sorvall RC5B plus |

2.1.2 Computer-Software

| | |
|------------|--|
| CDE | laboreigen, I. F. Khan, 2001 |
| FETCHAN | pClamp 6.0.3, Axon Instruments, USA |
| NEUMTX | laboreigen, K. Wiechen, 1996 |
| Origin | Version 6.0, Microcal Software, Northhampton, MA, USA |
| pClamp | Version 6.0.3 und 5.5.1, Axon Instruments, USA |
| PowerPoint | Microsoft PowerPoint 2000 |
| pSTAT | pClamp Version 6.0.3, Axon Instruments, USA |
| Sum 102 | laboreigen, K. Wiechen, 1996 |

2.1.3 Verbrauchsmaterial

| | |
|--------------------------|---|
| Borosilikatglas | Hilgenberg GmbH, Malsfeld |
| Dreiwegehahn | pvb medizintechnik GmbH, Kirchseeon |
| Einmalspritze | 10 ml, steril, BD Diskardit II, Becton Dickinson GmbH |
| Infusionsbesteck | Intrafix air, B. Braun, Melsungen |
| Injektionsnadeln | BD Microlance 3; 27 G x 3/4“ – Nr. 20 0,4mm x 19mm, Becton Dickinson GmbH |
| Kryoröhrchen | 2 ml, Greiner GmbH, Solingen |
| Messdishes | 35 x 10 mm, Falcon, Becton Dickinson GmbH |
| Petrischalen | Nunclon Surface, Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark |
| Plastikpipettenspitzen | 10 µl, 100µl, 1000µl, Sarstedt, Nümbrecht |
| Quiagen Plasmid Maxi Kit | Quiagen GmbH, Hilden |
| Reaktionsgefäße | 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht Falcon Tube 15 ml, 50 ml, Becton Dickinson GmbH |
| Sterilfilter | Sterifix, Porengröße 0,22 µm, B. Braun, Melsungen |
| Verbindungsschlauch | Original Perfusor Leitung, B. Braun, Melsungen |
| Zellkulturschalen | 60 x 15 mm, Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark |

2.1.4 Chemikalien / Reagenzien / Enzyme

| | |
|--|--|
| Aceton | Roth, Karlsruhe |
| Agar | Merck, Darmstadt |
| Agarose Low EEO | AppliChem, Karlsruhe |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| BaCl ₂ x 2 H ₂ O | Bariumchloriddihydrat, Merck, Darmstadt |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | Calciumchloriddihydrat, Merck, Darmstadt |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| CsCl ₂ | Cäsiumchlorid, Merck, Darmstadt |
| CsOH | Casiumhydroxid, Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DNA-Marker | GeneRuler 1 kb DNA-Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biochrom, Berlin |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| DMSO | Dimethylsulfoxid, Roth, Karlsruhe |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Sigma- Aldrich, Steinheim |
| Effectene® | Quiagen, Hilden |
| EGTA | N,N,N',N'-Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)- tetraessigsäure, Sigma-Aldrich |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| FKS | fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert, Sigma- Aldrich, Karlsruhe |
| Glucose | Merck, Darmstadt |
| Gelatine | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Geneticin | G-418-sulfat, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| HCl | Salzsäure, Merck, Darmstadt |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Isoamylalkohol | Merck, Darmstadt |
| Kaliumacetat | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumglutamat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| KCl | Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt |
| KOH | Kaliumhydroxid, Merck, Darmstadt |
| L-Glutamin | 200 mM, stabil, Biochrom, Berlin |
| L-Glutamin | 200 mM, instabil, Biochrom, Berlin |
| Mg-ATP | Adenosin-5'-triphosphat, Magnesiumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim |

| | |
|---------------------------------------|--|
| MEM | Modified Eagle's Medium, Biochrom, Berlin |
| MgCl ₂ x 6H ₂ O | Magnesiumchloridhexahydrat, Merck, Darmstadt |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | Magnesiumsulfatheptahydrat, Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ -ATP | Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim |
| N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin | 200 mM, stabil, Biochrom, Berlin |
| NaCl | Natriumchlorid, Merck, Darmstadt |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat, Biochrom, Berlin |
| NaOH | Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt |
| Na-pyruvat | Natriumpyruvat, Biochrom, Berlin |
| NEA | nicht-essentielle Aminosäuren, Biochrom, Berlin |
| PBS | Phosphatgepufferte Lösung, Biochrom, Berlin |
| Penicillin/Streptomycin | 10.000 I. E. / 10 000 µg/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Phenol | Roth, Karlsruhe |
| Restriktionsendonukleasen | BamHI, EcoRI, Eco72I, KpnI, Kpn2I, XbaI, XhoI, MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| RNAse | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| RPMI-1640 | Roswell Park Memorial Institute-1640-Medium, Biochrom, Berlin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat, Serva, Heidelberg |
| SuperFect® | Quiagen, Hilden |
| Sylgard® | Silicone elastomer base 184 – curing agent 184, Dow Corning GmbH, Wiesbaden |
| TE | Puffer aus 10 mM Tris und 1 mM EDTA |
| TEA-OH | Tetraethylammoniumhydroxid, Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tris | Tris-(hydroxymethylen)-aminomethan, Roth, Karlsruhe |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |
| Trypton | Roth, Karlsruhe |
| UPW | Ultra Pure Water, Biochrom, Berlin |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Es standen für das Projekt folgende Zelllinien zur Verfügung:

- 1.) Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen, stabil transfiziert mit Cav3.1, human, Akzessionsnummer AF190860 (Cribbs L. L. et al., 2000)
- 2.) Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen, stabil transfiziert mit Cav3.2, human, Akzessionsnummer AF051946 (Cribbs L. L. et al., 1998)
- 3.) Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen, stabil transfiziert mit Cav3.3, human, Akzessionsnummer AF393329 (Gomora J.C. et al., 2002)
- 4.) Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen, nativ
- 5.) Human Embryonic Kidney (HEK-293)-Zellen, nativ, Charge 4971

Die unter 1.) bis 3.) genannten Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Edward Perez-Reyes, Charlottesville, Virginia, USA, zur Verfügung gestellt. Die stabil transfizierten Zellen enthalten als Vector pcDNA3 (siehe *Abbildung 4*) und tragen damit Antibiotikaresistenzen gegen Penicilline und Aminoglycoside.

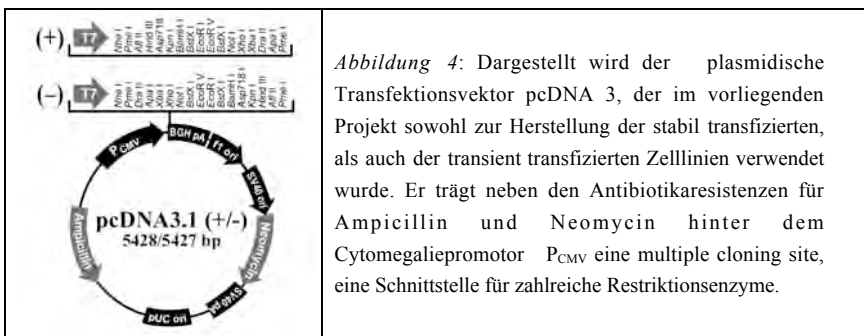


Abbildung 4: Dargestellt wird der plasmidische Transfektionsvektor pcDNA 3, der im vorliegenden Projekt sowohl zur Herstellung der stabil transfizierten, als auch der transient transfizierten Zelllinien verwendet wurde. Er trägt neben den Antibiotikaresistenzen für Ampicillin und Neomycin hinter dem Cytomegaliepromotor P_{CMV} eine multiple cloning site, eine Schnittstelle für zahlreiche Restriktionsenzyme.

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte der Zellkultivierung beschrieben.

2.2.1.1 Auftauen

Unter der sterilen Werkbank werden vor Entnahme eines Kryo-Röhrchens aus dem Stickstofftank 9 ml Zellkulturmedium, im Falle der stabil transfizierten Zelllinien mit Geneticin, einem Aminoglykosid zur Selektionierung der hiergegen resistenten, transfizierten Zellen, bereit gehalten, in das die schnell im 37°C-Wasserbad aufgetauten Zellen überführt werden. Das zügige Überführen nach Auftauen stellt sicher, dass das als Frostschutzmittel zugesetzte DMSO die aufgetauten Zellen nicht schädigt. Die in Zellkulturmedium suspendierten Zellen werden fünf Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Erneut werden 9 ml Medium zugegeben, das Zellpellet darin resuspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, 3 ml frisches Medium auf das Pellet gegeben, die Zellen resuspendiert und in eine beschriftete Zellkulturschale gegeben. Die Zellen wachsen im 37°C-Brutschrank unter 6% CO₂-Begasung.

2.2.1.2 Subkultivierung

Nach dem Auftauen erreichen die Zellen in der Regel innerhalb von zwei Tagen eine Konfluenz von nahezu 100 %, so dass nach dieser Zeit eine Subkultivierung vorgenommen werden muss. Hierzu wird das Medium unter der sterilen Werkbank vorsichtig abgezogen und zweimal mit je 3 ml phosphatgepufferter Lösung gespült. Danach werden 0,9 ml 0,05 %iges Trypsin (Herstellung siehe unter 2.2.1.4) zum Ablösen der adhärenen Zellen auf das Kulturschälchen gegeben und sofort wieder 0,82 ml hiervon abgezogen. Die Zellen mit dem restlichen Trypsin werden 2 min im Brutschrank inkubiert. Danach werden 4 ml – im Falle der stabil transfizierten Zellen mit Geneticin zur Selektionierung versetztes - Medium auf die Kulturschale gegeben und die Zellen hierin resuspendiert. Die Güte der Resuspendierung wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach ausreichender Resuspendierung sollten die Zellen

abgerundet und einzeln im Medium schwimmen. Ein Aliquot der Zellsuspension wird auf neue beschriftete Zellkulturschälchen gegeben. Die so subkultivierten Zellen inkubieren wieder für drei bis vier Tage im 37°C-Brutschrank. Erneut umgesetzt wird bei einer Konfluenz von ca. 90%. Zur Durchführung der Patch-Clamp-Experimente werden ein bis sechs Tropfen Zellsuspension auf 15 mm Messdishes gegeben.

2.2.1.3 Einfrieren

Nach Auftauen und Subkultivierung werden zeitnah auch wieder Zellen eingefroren, um jederzeit auf Zellen zurückgreifen zu können. Zunächst müssen 25 ml Penicillin-/Streptomycin-freies Medium (Medienzusammensetzung siehe unter 2.2.1.4) hergestellt werden. Hieraus wird dann 1 ml Einfriermedium, das 50% FKS und 20% DMSO enthält, hergestellt und eisgekühlt bereit gehalten. Ebenso muss Trockeneis bereit gehalten werden. Nach Abziehen des alten Mediums und zweimaligem Spülen der Zellen mit je 3 ml phosphatgepufferter Lösung, werden 0,9 ml 0,05 %iges Trypsin auf die Zellen gegeben und sofort wieder 0,82 ml hiervon abgezogen. Nach zweiminütiger Inkubation im Brutschrank werden die Zellen in 4 ml des zuvor hergestellten Mediums gut resuspendiert und auf 10ml im 50 ml-Falcon-tube mit Medium aufgefüllt. Der Ansatz wird fünf Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird abgezogen und das Pellet erneut in 10 ml Medium resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wird bis auf 1ml die überstehende Lösung verworfen. 1 ml eisgekühltes Einfriermedium wird auf den Ansatz gegeben, resuspendiert und gleichmäßig auf zwei Kryo-Röhrchen verteilt. Diese werden im Trockeneis schockgefroren, zwei Tage im -80°C-Kühlschrank aufbewahrt und dann in den Stickstofftank gegeben.

2.2.1.4 Medienzusammensetzung

Tabelle 2: Mediumzusammensetzung folgender Zelllinien:

Human Embryonic Kidney (HEK-293), stabil transfiziert mit Cav3.1, human, Akzessionsnummer AF190860 (Cribbs L. L. et al., 2000);

Human Embryonic Kidney (HEK-293), stabil transfiziert mit Cav3.2, human, Akzessionsnummer AF051946 (Cribbs L. L. et al., 1998);

Human Embryonic Kidney (HEK-293), stabil transfiziert mit Cav3.3, human, Akzessionsnummer AF393329 (Lee J.-H. et al., 1999)

| Mediumbestandteile | für 100 ml |
|---------------------------------------|------------|
| Ultra-pure Water | 67,3 ml |
| DMEM 10 x, Biochrom | 8,8 ml |
| NaHCO ₃ 7,5 % | 4,4 ml |
| non-essential amino-acids | 1 ml |
| Stabiles N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin | 1 ml |
| Penicillin/Streptomycin | 0,5 ml |
| 2-Mercaptoethanol (10 mM) | 1 ml |
| FKS hitzeinaktiviert | 15 ml |
| Geneticin (frisch zugeben) | 1 ml |

FKS wurde hitzeinaktiviert indem es im Wasserbad für 30min auf 56°C erwärmt wurde.

Geneticin wird als Stammlösung zugegeben; Stammlösung: 1 g/10 ml PBS, steril filtriert.

Zur Durchführung transienter Transfektionen wurde zunächst eine laboreigene native HEK-Zelllinie verwendet.

Tabelle 3: Medienzusammensetzung Human Embryonic Kidney (HEK-293), nativ

| Mediumbestandteile | für 100 ml |
|-------------------------------|------------|
| Ultra-pure Water | 87 ml |
| MEM 10 x , Katalognr. F0335 | 10 ml |
| NaHCO ₃ 7,5 % | 3 ml |
| L-Glutamin, instabil (200 mM) | 1 ml |
| → 2,55ml verwerfen | |
| Penicillin/Streptomycin | 0,55 ml |
| FKS hitzeinaktiviert | 11 ml |

Später wurde eine zweite native HEK-Zelllinie freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Schömig im Hause zur Verfügung gestellt, genannt native HEK 4971:

Tabelle 4: Medienzusammensetzung Human Embryonic Kidney (HEK-293), nativ, 4971

| Mediumbestandteile | für 100 ml |
|-------------------------|------------|
| DMEM Gibco | 100 ml |
| Penicillin/Streptomycin | 0,5 ml |
| FKS hitzeinaktiviert | 10 ml |

Herstellung 0,05 %iges Trypsin:

| | |
|----------------|---------|
| Trypsin (2,5%) | 0,4 ml |
| PBS | 19,2 ml |
| EDTA (1%) | 0,4 ml |

aliquotiert in 2 ml-tubes

2.2.2 Plasmidvermehrung und –aufreinigung

Die kodierenden Plasmide für Ca_v3.1 (AF190860, Cribbs L.L. et al., 2000), Ca_v3.2 (AF051946, Cribbs L. L., 1998) und Ca_v3.3 AF393329, Gomora J. C. et al., 2002) wurden freundlicherweise von Prof. Edward Perez-Reyes, Charlottesville, Virginia, USA zur Verfügung gestellt. Alle drei Plasmide tragen als Vektor pcDNA3 (*Abbildung 4*)

Für das Projekt wurden von Paula Q. Barrett, Charlottesville, Virginia, USA (Konstrukt I) und Jung-Ha Lee, Seoul, Süd-Korea (Konstrukt II), freundlicherweise folgende Konstrukte aus Ca_v3.1 und Ca_v3.2 zur Verfügung gestellt:

Konstrukt I: GGHH, die Domänen I und II von Ca_v3.1 (AF190860, Cribbs L. L., 2000) wurden mit den Domänen III und IV von Ca_v3.2 (AF051946 modified, Welsby P. J., 2003) ligiert und in den plasmidischen Vektor pcDNA3 hineinkloniert.

Konstrukt II: HHGG, die Domänen I und II von Ca_v3.2 (AF051946, Cribbs L. L., 1998) wurden mit den Domänen III und IV von Ca_v3.1 (AF027984, Perez-Reyes E., 1998) ligiert und in den plasmidischen Vektor pcDNA3 hineinkloniert (*Abbildung 5*).

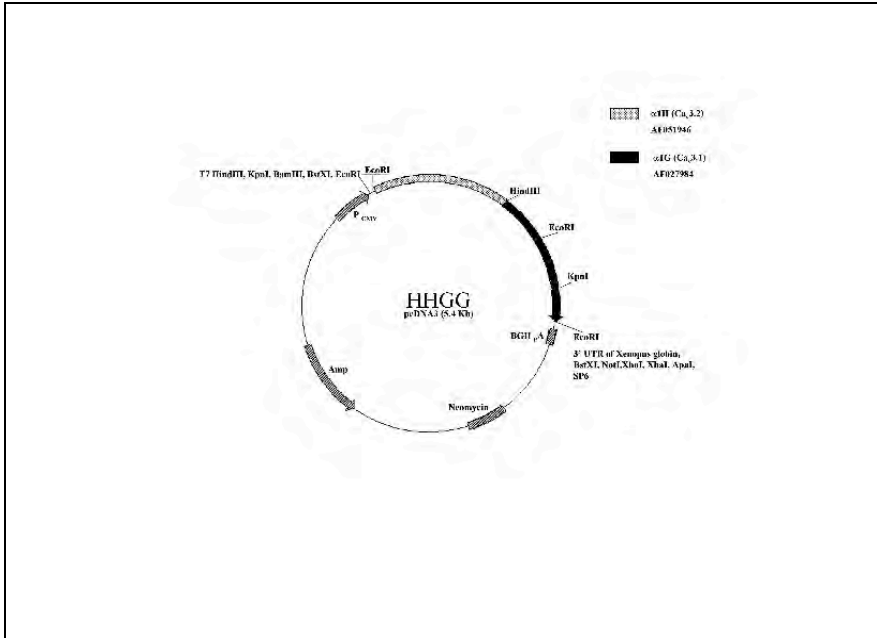


Abbildung 5 zeigt exemplarisch eine Restriktionskarte von Konstrukt II.. Dargestellt werden die Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme sowie Lage der Antibiotikaresistenzen. Das Plasmid wurde über den Zytomegalievirus-Promotor (P_{cmv}) in den pcDNA3-Vektor hineinkloniert.

2.2.2.1 Materialien für die Mikrobiologie

Tabelle 5 : LB-Medium für Agarplatten

| | |
|------------------------|-----------|
| Trypton | 5 g |
| Hefeextrakt | 2,5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 7,5 g |
| Bidestilliertes Wasser | ad 500 ml |

Der Ansatz wird bei 121°C autoklaviert und vor dem Erkalten in Petrischalen ausgegossen. Für Ampicillin-Agarplatten wird kurz vor dem Giessen der Platten 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) dazugegeben.

Tabelle 6: SOB-Mg-Medium

| | |
|------------------------|-----------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 2,5 g |
| NaCl | 0,292 g |
| KCl | 0,093 g |
| Bidestilliertes Wasser | ad 500 ml |

Tabelle 7: SOC-Medium

| | |
|--|----------|
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,1017 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,1232 g |
| Glucose | 0,1802 g |
| SOB-Mg-Medium | ad 50 ml |

2.2.2.2 Herstellung elektrokompetenter E. coli

DH10B-E.coli (freundlicherweise von Liliane Henkes, im Hause, zur Verfügung gestellt) werden auf LB-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag werden hiervon Kolonien gepickt und über Nacht in je 5 ml SOB-Mg-Medium bei 37°C geschüttelt. Je 4 ml dieser Vorkulturen werden in 200 ml SOB-Mg-Medium gegeben und für 4,5 Stunden weiterschüttelt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 6000 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 15 Minuten wird der Überstand vorsichtig abdekantiert und die Pellets in je 200 ml eiskühler 10 %iger Glycerollösung resuspendiert. Die Suspension wird noch einmal bei 6000 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet erneut in 200 ml eiskalter 10 %iger Glycerollösung

resuspendiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet im Restüberstand suspendiert. Je 26 μl der Bakteriensuspension werden in Eppendorf-Reagiergefäße abgefüllt.

2.2.2.3 Elektroporation von $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ und $\text{Ca}_v3.3$

Je 1 μl (10ng) Plasmid wird in ein Eppendorfgefäß vorgelegt, 25 μl elektrokompetente DH10B dazugegeben und sanft gemischt. Nachdem dieser Ansatz eine Minute auf Eis inkubiert hat, wird er in die ebenfalls vorgekühlte Küvette gegeben. Die Küvette wird in den Elektroporator eingesetzt, die Schiene nach rechts geschoben und beide Knöpfe bis zum Brummtönen gedrückt gehalten (Einstellungen des Elektroporators: 1,6 kV, 200 Ω , 25 μF). Dann wird sofort 1 ml SOC-Medium dazugegeben und sanft gemischt. Die Ansätze werden in sterile Reagenzgläser überführt und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Je 100 μl der Ansätze werden auf Ampicillin-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.4 Plasmidpräparation mit Quiagen Plasmid Maxi Kit

Je eine Kolonie wird gepickt und in 5 ml SOB-Mg-Medium unter Zusatz von 15 μl Ampicillinlösung (50 mg/ml) über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am zweiten Tag wird die Hauptkultur mit 4 ml der Vorkultur und 600 μl Ampicillin in 200 ml SOB-Mg-Medium angesetzt und für 2,5 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden wie oben beschrieben abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml eines Puffers aus 50 mM Tris, 10 mM EDTA und 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A resuspendiert. Dazu gibt man 10 ml eines Puffers aus 200 mM NaOH und 1 % SDS. Die Bakterien werden hierbei durch alkalische Hydrolyse aufgeschlossen. Nach 5 Minuten gibt man 10 ml eines Puffers aus eiskaltem 3M Kaliumacetat, pH 5,5, hinzu, um die Hydrolyse abzustoppen. Zu diesem Zeitpunkt ist die wesentlich größere genomische DNA der Bakterien bereits

hydrolysiert, die plasmidische hingegen noch nicht. Das Lysat wird abfiltriert. Eine Filterkartusche der Firma Quiagen wird mit 10 ml eines Puffers aus 750mM Kochsalz, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol und 0,15 % Triton® X-100 equilibriert. Das Lysat wird auf die Filterkartusche gegeben und nach Durchfluss der Filter mit 60 ml eines Puffers aus 1 M Kochsalz, 50 mM MOPS und 15 % Isopropanol gewaschen. Die DNA wird mit 15ml eines Puffers aus 1,6 M Kochsalz, 50 mM MOPS und 15 % Isopropanol eluiert. Dann wird die DNA mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei 7000 Umdrehungen pro Minute für 60 Minuten abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und noch einmal bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird getrocknet und in einem angemessenen Volumen TE-Puffer gelöst.

2.2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spot-Test

Tabelle 8: Giessen von Ethidiumbromid-Platten

| |
|---|
| 1% Agarose in 1 x TE aufkochen |
| 5 µg/ml Ethidiumbromid zugeben |
| etwas abkühlen lassen und 15ml pro Petrischale giessen |
| wenn die Platten fest sind, 20 Minuten bei 37°C offen trocknen lassen |
| danach mit Parafilm umwickelte Platten bei 4°C lagern |

Tabelle 9: λ -DNA-Verdünnungsreihe (Stammlösung 0,3 mg/ml = 300ng/ μ l)

Zielkonzentrationen sind 5,10,15 und 20 ng/ μ l, da das menschliche Auge diese entsprechenden Ethidiumbromid-Intensitäten unterscheiden kann. Oberhalb von 20 ng/ μ l erscheint die Leuchtintensität einheitlich stark. Die DNA wird nicht in Wasser gelöst, da das negativ geladene Makromolekül durch Abstossungen brechen könnte. Salzlösungen fangen die elektrostatischen Ladungen ab und stabilisieren damit die DNA.

| |
|--|
| 1,33 μ l Stammlösung ad 20,0 μ l 1 x TE \Rightarrow c = 20 ng/ μ l |
| 1,0 μ l Stammlösung ad 20,0 μ l 1 x TE \Rightarrow 15 ng/ μ l |
| 2,0 μ l Stammlösung ad 60,0 μ l 1 x TE \Rightarrow 10 ng/ μ l |
| 1,67 μ l Stammlösung ad 100,0 μ l 1 x TE \Rightarrow 5,0 ng/ μ l |

Je ein Spot à 1,0 μ l pro Konzentration wird zusammen mit den zu bestimmenden Plasmiden aufgetragen und die Leuchtintensität unter dem UV-Tisch visuell beurteilt. Zur Kontrolle der ermittelten Konzentration wird eine UV-VIS-spektroskopische Bestimmung durchgeführt.

2.2.2.6 UV-VIS-Spektroskopie

50,0 μ l 1 x TE werden in die Quarzküvette blasenfrei eingefüllt und der Nullwert bestimmt, indem die Küvette in den Strahlengang des Spektroskops eingesetzt wird und „blind“ gedrückt wird. Je 50,0 μ l der zu bestimmenden Lösungen werden gleichermaßen befüllt und in den Strahlengang eingesetzt. Da das Lambert-Beersche-Gesetz nur im Bereich einer Absorption von 0,1 bis 1,0 gilt, müssen Lösungen, die höhere Werte ergeben, weiter verdünnt werden. Das Lambert-Beersche-Gesetz besagt, dass im Bereich zwischen 0,1 und 1,0 Linearität zwischen Absorption und Konzentration besteht. Eine bei 260 nm gemessene Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 ng/ μ l. Gleichzeitig misst das Spektrophotometer auch die Absorption bei 280 nm und gibt den Quotient A_{260}/A_{280} an, der Auskunft über den Reinheitsgrad der Plasmidpräparation gibt. Bei reinen DNA-Präparationen liegt dieser Quotient bei 1,8 (Nicholl D. S. T., 2002).

2.2.2.7 Identifikation der präparierten Plasmide mittels Gelelektrophorese

Die präparierten Ansätze werden mit passenden Restriktionsendonukleasen verdaut und in einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetragen. Ein mit aufgetragener Marker lässt die Grösse der entstandenen Banden abschätzen. Entsprechen die Größen der entstandenen Fragmente den theoretischen Werten, kann das Plasmid als identifiziert gelten.

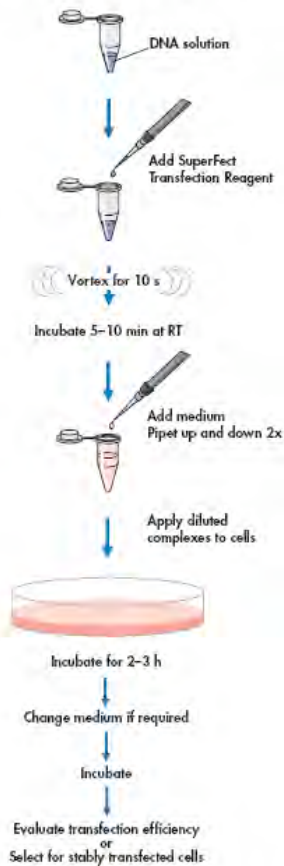
2.2.3 Transiente Transfektion

Bevor die Zellen transfiziert wurden, wurden sie 24 Stunden vorher umgesetzt, um sie zu einem Zeitpunkt zu transfizieren, an dem sie im Wachstum begriffen sind. Die transiente Transfektion wurde zunächst mit Superfect[®], einem aktivierten Dendrimer der Firma Quiagen, durchgeführt. Das Molekül nimmt eine kugelige Struktur an und trägt an seiner Oberfläche positiv geladene Aminosäuren, die mit den negativ geladenen Phosphatresten der DNA interagieren. Die Superfect-DNA-Komplexe werden endozytotisch in die Zelle aufgenommen. Dabei erleichtern die positiven Ladungen das Anheften an negativ geladene Rezeptoren der Zellmembran, wie z. B. sialysierte Glycoproteine. Die Aminogruppen puffern die Lysosomen-Protonen, so dass die DNA durch sie nicht angegriffen werden kann. Green fluorescent protein (GFP) wurde jeweils cotransfiziert, um die erfolgreich transfizierten Zellen durch ihre Fluoreszenz sichtbar zu machen. Hierbei wurde zunächst ein Verhältnis von drei zu eins – porenbildende α_1 -Untereinheit zu GFP- gewählt. Damit wurde sicher gestellt, dass grüne Zellen auf jeden Fall die Kanalpore mitaufgenommen hatten. Als sich zeigte, dass die grünen Zellen nur multi-channel-Patches mit sich brachten, wurde ein Verhältnis von zwei zu eins und später auch eins zu eins gewählt. Bei einem solchen Verhältnis liessen sich dann Einzelkanalexperimente aufzeichnen. Die Handhabung von Superfect[®] gestaltete sich simpel (siehe Abbildung 6): DNA und Superfect[®] wurden zusammen fünf bis zehn

Minuten inkubiert, dann wurde Transfektionsmedium, das kein FKS und kein Antibiotikum enthielt, dazugegeben und der ganze Ansatz wurde dann auf die nativen HEK-293-Zellen gegeben und nach vier Stunden Einwirkzeit ein Lösungswechsel vorgenommen. Am folgenden Tag konnten die transfizierten Zellen subkultiviert werden. Als die zeitliche Dauer der Experimente immer kürzer wurde (schlechte Seals, siehe weiter unten), wurde auf das Transfektionsreagenz Effectene[®] der Firma Qiagen umgestellt.

Effectene[®] ist laut Hersteller ein nicht-liposomales Lipid, das spontan Mizellenstruktur annimmt und die DNA verdichtet. In einem ersten Arbeitsschritt wird die zu transfizierende DNA in einem mitgelieferten Puffer-System gelöst und mit dem sogenannten Enhancer zusammengegeben, der die DNA bereits verdichten soll. In einem zweiten Schritt wird Effectene zugegeben und fünf bis zehn Minuten inkubiert. Nach Zugabe von Medium, welches hier FKS und Antibiotikum enthält, wird der ganze Ansatz auf die Zellen pipettiert (siehe Abbildung 6). Effectene[®] soll weniger zytotoxisch als andere Transfektionsmethoden sein. Festzustellen bleibt, dass die Dauer der Patch-Clamp-Experimente zunahm. Ein Verhältnis von eins zu eins – porenbildende ω -Untereinheit zu GFP – brachte auch hier eine Zunahme an Einzelkanalexperimenten.

Transfection Procedure for SuperFect Transfection Reagent



Transfection Procedure for Effectene Transfection Reagent

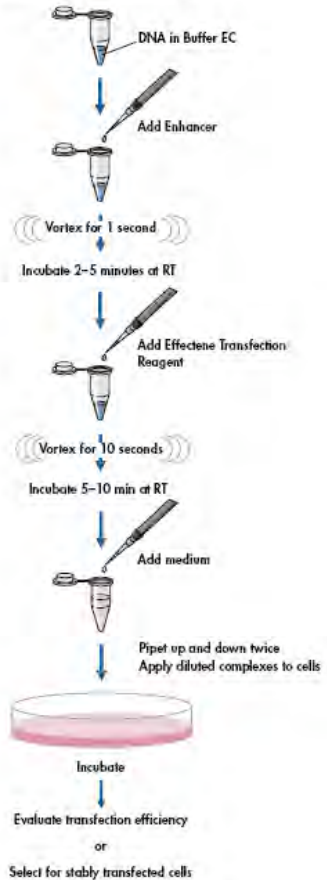


Abbildung 6: Dargestellt werden die Flussdiagramme der beschriebenen Methoden der transienten Transfektion: links unter Verwendung von Superfect[®], rechts unter Verwendung von Effectene[®].

2.2.4 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist die heute universell eingesetzte Methode der Elektrophysiologie Funktion und Modulation von Ionenkanälen zu untersuchen. Obwohl die Idee von der Existenz von Ionenkanälen bis ins 19. Jahrhundert zurückreicht, ist die in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelte Methode eine eher junge Errungenschaft. Ihrer Bedeutung wurde 1991 mit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin und Physiologie Rechnung getragen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass man mit einer Glaspipette einen „Patch“, also Flecken der Zellmembran von seiner elektrischen Umgebung so abdichten kann, dass die innerhalb des „Patches“ gelegenen Ionenkanäle mit ihren Strömen im Pikoamperebereich diskriminierbar werden. Hierfür müssen die verwendeten Pipetten frisch hergestellt werden und dürfen nur einmal verwendet werden. Bis zum Aufsetzen auf die Zelle muß ein angelegter Überdruck dafür sorgen, dass die Pipettenöffnung sauber bleibt. Damit die Pipettenlösung frei von Schwebeteilchen ist, muß diese immer durch einen Sterilfilter gegeben werden. Der sogenannte „Gigaseal“ (englisch „seal“ heißt Abdichtung) im Gigaohmbereich wird beim Aufsetzen auf die Zellmembran innerhalb von Sekunden erreicht, indem man vorsichtig saugt, der zuvor angelegte Überdruck also abgelassen und stattdessen die Membran einem leichten Unterdruck ausgesetzt wird. Das Erreichen eines Gigaseals kann darüber hinaus erleichtert werden, indem man die Pipettenlösung 10%ig hypoosmolar herstellt (Hamill O. P., et al., 1981). Dem elektrisch abgedichteten Flecken der Zellmembran kann ein gewünschtes Potential aufgezwungen werden, so dass beim Anlegen eines depolarisierenden Pulses innerhalb der Pipettenöffnung befindliche Ionenkanäle öffnen und der durch sie fließende Strom aufgezeichnet werden kann.

2.2.4.1 Messkonfigurationen

Die Anordnung von Glaspipette und Zelle beim Erreichen eines Gigaseals nennt man die „cell-attached“-Konfiguration (*Abbildung 7*). Hierbei bleibt die Zelle in ihrer natürlichen Umgebung und nur der von der Pipettenöffnung umschlossene Bereich wird betrachtet. Es ist so möglich, einzelne Kanäle, die sich innerhalb der ca. 1 μm -Durchmesser-großen Pipettenöffnung befinden, zu betrachten. Der Ladungsträger befindet sich hierbei in der Pipettenlösung. Durch vorsichtiges weiteres Saugen kann die Membran durchbrochen und ein Austausch von Pipettenlösung und Intrazellulärflüssigkeit erreicht werden. Hierbei ist die Pipettenlösung in ihrer Zusammensetzung so zu wählen, dass sie den physiologischen Bedingungen möglichst nahe kommt. So sollte EGTA als Calciumkomplexbildner und ATP als Energielieferant zugefügt werden. In dieser sogenannten „whole-cell“-Konfiguration wird der Strom, der über die gesamte Zelle von Extrazellulär nach Intrazellulär fließt, aufgezeichnet. Der Ladungsträger befindet sich hierbei in der Badlösung. Aufgrund der Einbeziehung der gesamten Zelle in die Betrachtung muß ein größeres Hintergrundrauschen in Kauf genommen werden.

Die Abdichtung eines Gigaseals ist so stabil, dass selbst beim Zurückziehen der Glaspipette und Herausreißen des Patches aus der dazugehörigen Zelle diese bestehen bleibt. Durch derartige Manipulationen erhält man sogenannte „excised patches“. Voraussetzung hierfür ist ein Seal größer 20 G Ω . Zieht man die Pipette zurück, so schnürt sich zunächst ein Vesikel von der Zellmembran ab. Setzt man diesen Vesikel kurz der Luft aus, öffnet dieser sich und man erhält einen „inside-out“-Patch, da die vormals intrazelluläre Seite nun zur Badlösung hin gerichtet ist. Einen solchen Patch kann man stabilisieren, indem man das gesamte Chlorid der Badlösung gegen Sulfat austauscht (Hamill O. P. et al., 1981) Einen „outside-out“-Patch hingegen erhält man, wenn man nach Durchbruch der Zellmembran die Pipette zurückzieht und sich wiederum ein Teil der Zellmembran abschnürt.

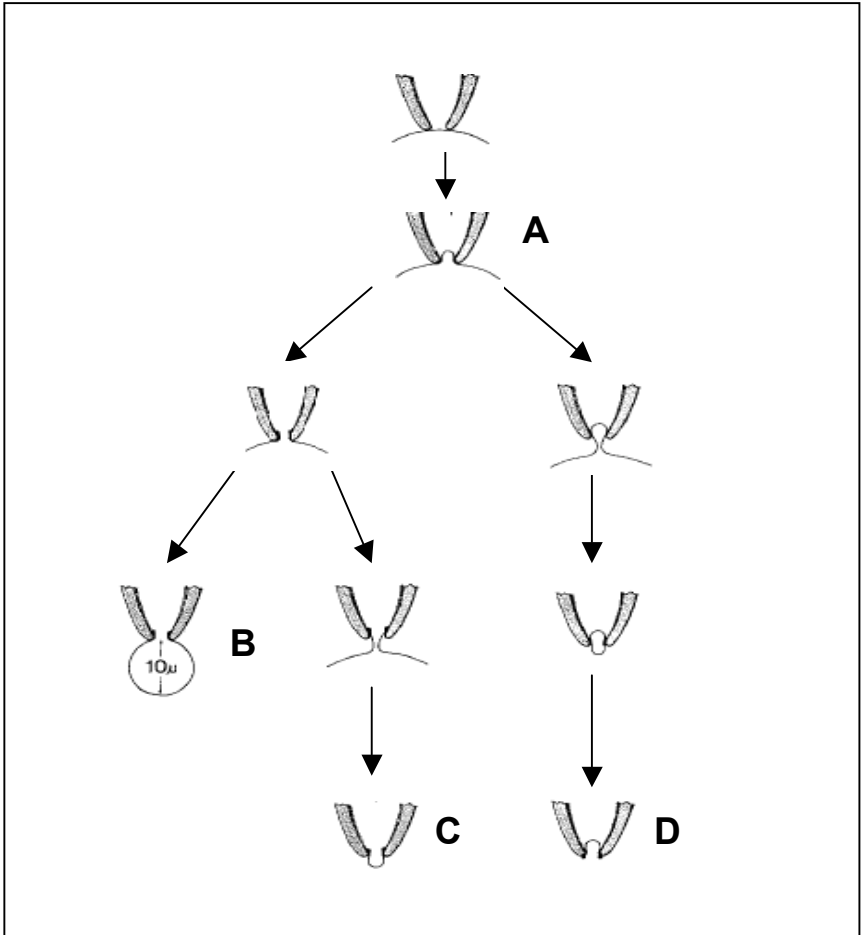


Abbildung 7: Nach Annäherung an eine Zelle wird durch Unterdruck die cell-attached-Konfiguration (A) erreicht. Durch vorsichtiges Saugen wird die Membran durchbrochen und die whole-cell-Konfiguration (B) erreicht. Durch Zurückziehen der Pipette in A wird ein Vesikel aus der Zelle abgeschnürt, der sich bei kurzem Luftkontakt zur inside-out-Konfiguration (D) öffnet. Zieht man die Pipette zurück, nachdem die Membran durchbrochen wurde, schnürt sich auch ein Membranfragment ab und man erhält die outside-out-Konfiguration (C). Modifiziert nach Hamill O. P., 1981.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei allen Aufzeichnungen die cell-attached-Konfiguration gewählt.

2.2.4.2 Versuchsaufbau

Für die Durchführung des Projekts standen zwei verschiedene Patch-Clamp-Messplätze zur Verfügung, die aber in ihrem Aufbau identisch waren und deshalb gemeinsam beschrieben werden.

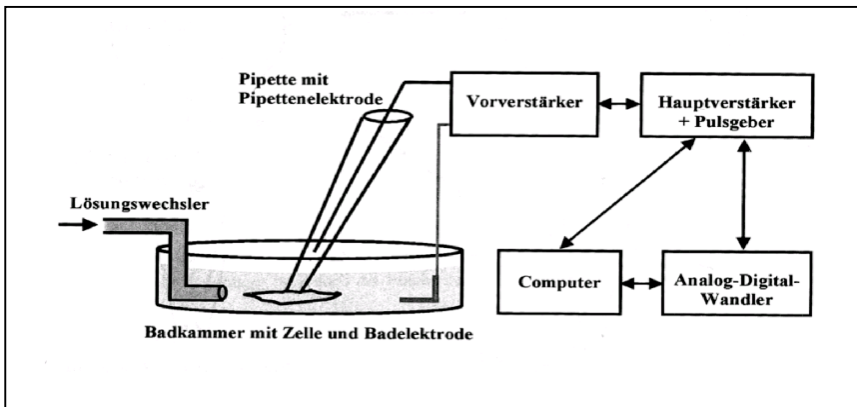


Abbildung 8: Dargestellt wird der schematische Aufbau eines Patch-Clamp-Messplatzes. Sowohl die in der Badlösung befindliche Badelektrode als auch die in der Glaspipette befindliche Messelektrode sind mit dem Vorverstärker verbunden, der die Signale wiederum an den Hauptverstärker weitergibt. Der Hauptverstärker ist gleichzeitig der Pulsgeber, d. h. von hier aus wird das gewünschte Membranpotential vorgegeben. Die analogen, kontinuierlichen Daten werden über einen Analog-Digital-Wandler in diskrete, digitale Daten umgewandelt und an den Rechner weitergegeben.

Die visuelle Kontrolle des Versuchsablaufs erfolgte mit Hilfe eines **Inversmikroskops** mit 100- und 400-facher Vergrößerung. Hierbei ist der Objektstisch mit der Aussparung für das Messdish unbeweglich, lediglich die Objektive können zur Scharfeinstellung bewegt werden. Die Stromversorgung für das Mikroskop befand sich jeweils ausserhalb

des Versuchsaufbaus. Zur Identifizierung der transient transfizierten Zellen diente eine **Quecksilber-Fluoreszenzlampe** mitsamt **Fluoreszenzfilter**. Zur Auswechslung des Zellkulturmediums mit depolarisierender Badlösung diente ein Lösungswechsler, der mit einer gebogenen Kanüle in die Badlösung getaucht und über eine Wasserstrahlpumpe betätigt wurde. Über eine Halterung wurde die **Badelektrode** im Messdish positioniert. Die Badelektrode wurde regelmäßig chloriert, um Offsetpotentiale zu vermeiden. Dies sind Potentiale, die an der Grenzfläche zwischen Metall und Lösung entstehen. Durch die Chlorierung wird ein feiner, schwarzer Belag aus Silberchlorid auf der Elektrode abgeschieden, so dass ein Reaktionsgleichgewicht zwischen oxidiertem und elementarem Silber entstehende Potentiale abfangen kann. Die Badelektrode ist an den **Vorverstärker** angeschlossen. Die **Messelektrode** ist über den **Pipettenhalter** ebenfalls mit dem Vorverstärker verbunden. Der Pipettenhalter trägt eine Zuleitung zum Anlegen von Über- bzw. Unterdruck. Über einen Schlauch und eine 10 ml-Spritze wird der Druck jeweils angelegt bzw. wird durch ein Saugen an dem Schlauch ein Unterdruck bewirkt. Der Vorverstärker wandelt das schwache Eingangssignal in ein stärkeres Ausgangssignal um und ist mit dem **Hauptverstärker**, der gleichzeitig der Pulsgeber ist, verbunden. Die entscheidenden Elemente des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (OPA) und der Rückkopplungswiderstand (R_f) (siehe Abbildung). Der Operationsverstärker vergleicht permanent das tatsächliche Pipettensignal U_{pip} mit dem vorgegebenen Sollpotential U_{soll} und führt im Falle einer Differenz zu einer Verstärkung dieser Spannung, was wiederum aufgrund der Potentialdifferenz zu einem Stromfluß durch R_f führt. Aufgrund des unendlich großen Eingangswiderstandes des Operationsverstärkers kann der Strom nur in die Pipette fließen und nicht zurück in den OPA und ändert folglich das Pipettenpotential solange bis keine Differenz zur Sollspannung mehr vorliegt. Dieser Kompensationsstrom, der quasi genauso groß ist wie der Strom, der durch die Zelle fließt, wird gemessen. Der Hauptverstärker ist mit dem **Analog-Digital-Wandler** und dem **Computer** verbunden. Der Hauptverstärker dient zur Erzeugung verschiedener Pulsprotokolle und zur Filterung (4-Pol-Bessel-Filter, -3 dB bei 2 kHz), um das hochfrequente Rauschen der Signale abzusenken. Die Sammelfrequenz lag bei 10 kHz. Der Analog-Digital-Wandler wandelt die analogen Eingangssignale nach einem alles-oder-nichts-Prinzip in digitale

Daten um. Die Pipette wird über einen **Grobtrieb** und einen öl- bzw. wasserhydraulischen **Mikromanipulator** in den drei Achsen bewegt. Die genaue Herstellung der Patch-Pipetten wird weiter unten beschrieben. Das Mikroskop ist auf einem **schwingungsgedämpften Tisch** platziert, so dass Erschütterungen in der Umgebung abgefangen und nicht an den Versuchsaufbau weitergegeben werden. Die Schwingungsdämpfung geschieht über luftgefüllte Gummikissen, die regelmäßig austariert und bei Bedarf aufgepumpt werden müssen. Ein **Faraday-Käfig** umhüllt das gesamte Setup, um elektrische Einstreuungen jeder Art abzuschirmen.

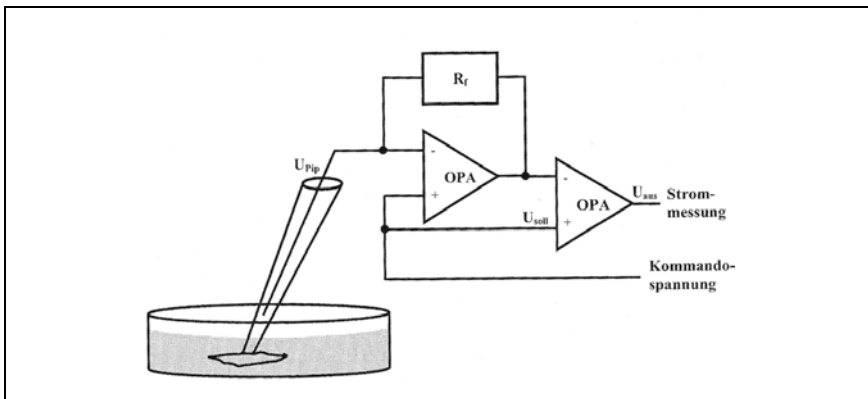


Abbildung 9: Der Operationsverstärker vergleicht U_{pip} mit U_{soll} und verstärkt auftretende Potentialdifferenzen, so dass ein Kompensationsstrom durch den Rückkopplungswiderstand R_f in die Pipette fließt. Das Signal dieses Kompensationsstroms wird an den Hauptverstärker weitergegeben. Modifiziert nach Numberger M./Draguhn A., 1996.

2.2.5 Versuchsdurchführung

2.2.5.1 Herstellung der Glaspipetten

Borosilikatglasrohlinge von ca. 1 m Länge, 1,7 mm Aussendurchmesser und 1,42 mm Innendurchmesser (Wanddicke 0,28 mm), wurden mit einem Schneidemediamanten angeritzt und in ca. 7 cm lange Teilstücke gebrochen. Diese wurden in ein Pipettenziehgerät so senkrecht eingespannt, dass der spiralförmige Wolfram-Glühdraht möglichst mittig positioniert war. In einem ersten Ziehschritt wurde der Glühdraht stark erhitzt, was dazu führte, dass die Glasröhrchen in der Mitte um ca. 1 cm ausgezogen wurden. Der Durchmesser in dem ausgezogenen Teilstück wurde dabei verkleinert. In einem zweiten Ziehschritt wurde der Glühdraht weniger stark erhitzt, was dazu führte, dass das Glasröhrchen an der verjüngten Stelle allmählich vollständig durchgeglüht wurde. Man erhielt zwei Glaspipetten deren Spitzengeometrie von der Temperatur des Glühdrahts abhing. Längere Schäfte führen zu hochohmigeren Pipetten und sind für Einzelkanalmessungen günstiger, da man mit ihnen leichter einen guten Seal erhält (Numberger M./Draguhn A., 1996). Ob die Pipettenmündungen optimal waren, wurde mit dem „bubble-point-Test“ bestimmt. Dazu verbindet man den rückwärtigen Teil der Pipette mit einem Stück Infusionsschlauch und einer mit Luft aufgezogenen 10 ml-Spritze und hält die Pipettenmündung in Methanol. Man drückt den Spritzenkolben in die Spritze und notiert die Milliliter, bei denen kontinuierlich Luftbläschen aus der Pipettenspitze austreten. Optimal war ein Wert zwischen 5,5 und 6,5 ml. Solche Pipetten ergaben später beim Eintauchen in die Badlösung Pipettenwiderstände von 4-6 M Ω . An dem einen Patch-Messplatz wurde der Pipettenwiderstand beim Eintauchen direkt angezeigt, an dem anderen Messplatz ließ er sich mit Hilfe des ohmschen Gesetzes, $R = U/I$ direkt aus der Stromantwort auf einen 5 mV Puls berechnen. Die Stromantwort lag hierbei bei ca. 0,8-1,2 nA. Der Öffnungsdurchmesser dieser Pipetten betrug ca. 1 μ m. Um die Rauscheigenschaften zu verbessern, wurden nun die Pipetten mit Sylgard®, einem viskosen Silikon, das unter Hitze fest wird, beschichtet. Hierfür wurden 10 g Silicon base 184 mit 1ml curing agent 184 vermischt. Zum Beschichten wurde die Pipette waagrecht in eine Halterung so eingespannt, dass der Pipettenschaft innerhalb

eines spiralförmigen Glühdrahts zum Liegen kam. Das Sylgard® wurde mit einer auf eine Insulinspritze aufgesetzten kurzen Kanüle rund um den Schaft und möglichst weit zur Öffnung hin aufgetragen. Unter Drehen wurde das Silikon erhitzt, bis es fest wurde. In einem letzten Arbeitsschritt wurden die Pipettenmündungen rund geschmiedet. Hierfür stand ein Gerät zur Verfügung, das aus einem Mikroskop mit Okularskalierung und einem Platinglühdraht bestand. Die eingespannte Pipette wurde an den Glühdraht angenähert, der Glühdraht durch Treten eines Pedals erhitzt und die Pipettenränder dadurch vorsichtig angeschmolzen, also rundgeschmiedet. Unter dem Mikroskop erkannte man, dass die Pipettenränder dunkler wurden. Die Pipetten wurden in einem Aufbewahrungsgefäß mit Deckel gesammelt und möglichst bald verwendet.

2.2.5.2 Materialien für die Patch-Clamp-Versuche

Tabelle 10: kaliumreiche, depolarisierende Badlösung

| | |
|--|--------|
| KCl | 25 mM |
| HEPES | 10mM |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 2 mM |
| Kaliumglutamat | 120 mM |
| Glucose | 10 mM |
| EGTA | 2 mM |
| Na ₂ -ATP | 1 mM |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 1 mM |

Die Substanzen wurden in autoklaviertem, bidestilliertem Wasser gelöst. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit KOH auf pH = 7,3.

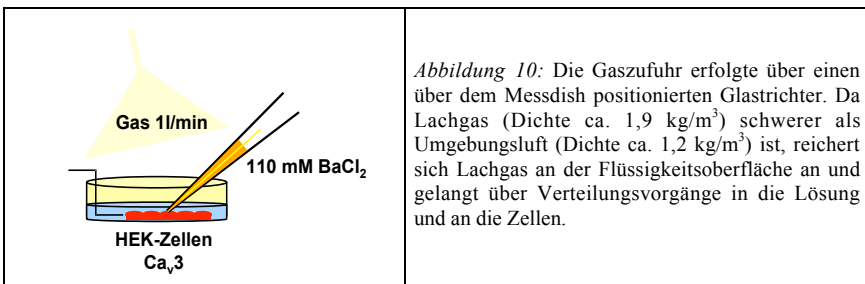
Tabelle 11: Pipettenlösung

| | |
|--|--------|
| BaCl ₂ x 2 H ₂ O | 110 mM |
| HEPES | 10 mM |

Die Substanzen wurden in autoklaviertem, bidestilliertem Wasser gelöst. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit TEA-OH auf $\text{pH} = 7,3$. Vor Verwendung wurde die Lösung steril filtriert. Obwohl die Angaben zu den verschiedenen Ca_v3 bezüglich ihrer Permeabilität von Calcium und Barium kontrovers diskutiert werden, (Perez-Reyes et al., 2003; Zamponi et al., 2005), insofern nicht abschließend geklärt werden kann, ob die Permeabilität für Calcium und Barium für alle Ca_v3 gleich groß ist, wurde Barium als Ladungsträger verwendet, da Barium den Vorteil hat, dass es alle anderen, natürlich vorkommenden Ionenkanäle, insbesondere Kalium-Kanäle, blockiert und somit gewährleistet ist, dass alle aufgezeichneten Ströme auf Calcium-Kanäle zurückzuführen sind.

2.2.5.3 Einzelkanalmessungen

Ein 1,5 cm-Messdish aus dem Brutschrank wurde in die Aussparung im Mikroskopisch eingesetzt. Das Zellkulturmedium wurde abgezogen und die Zellen gut mit depolarisierender Badlösung gespült. Dann wurde für die Messungen mit 3 ml Badlösung aufgefüllt. Mit Hilfe des Mikroskops wurde eine geeignete Zelle ausgewählt. Bei den stabil transfizierten Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellen gut adhären am Dishboden waren. Außerdem sollte die Membran gleichmäßig dick sein, erkennbar unter dem Mikroskop daran, dass die Zellränder beim Durchfokussieren stärker dunkel erschienen. Bei den transient transfizierten Zellen musste darüber hinaus eine grün fluoreszierende Zelle ausgewählt werden. In der Regel wurde hierbei eine nicht ganz so intensiv leuchtende Zelle in der Absicht gewählt, Einzelkanalmessungen zu erhalten.



Eine Pipette wurde aus dem Aufbewahrungsgefäß genommen und mit Pipettenlösung folgendermaßen befüllt: Das sogenannte „tip-filling“ erfolgte mit Hilfe eines Stücks Infusionsschlauch mit einer daran angeschlossenen 10 ml-Spritze. Der rückwärtige Teil der Pipette wurde an den Schlauch angeschlossen und die Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit Pipettenlösung gehalten. Mit Hilfe der Spritze wurde an die Pipette ein Unterdruck angelegt und die Spitze befüllt. Das „back-filling“ erfolgte mit einer zuvor durch Hitze lang ausgezogenen Kunststoff-Pipettenspitze. Diese wurde auf einen Sterilfilter aufgesetzt und eine mit Pipettenlösung befüllte 10 ml-Spritze wurde daran angeschlossen. So konnte auch der rückwärtige Teil der Pipette vorsichtig befüllt werden. Die Füllhöhe wurde so gewählt, dass die Messelektrode gerade in die Lösung eintauchte, um das Rauschen zu minimieren. Luftbläschen wurden herausgeklopft. Die befüllte Pipette wurde mit einer Gummidichtung in den Pipettenhalter eingesetzt und ein Überdruck an den Halter angelegt. Mit dem Grobtrieb wurde die Pipette in die Badlösung eingetaucht und die Pipettenspitze unter dem Mikroskop gesucht. Nach Arretierung des Grobtriebs wurden alle Pipettenbewegungen nur noch mit dem Mikromanipulator ausgeführt. Die Pipette wurde an die Zelle herangeführt und kurz bevor die Membran erreicht wurde, ließ man schon etwas Druck ab, um die Zellmembran nicht zu schädigen. Erreichte man die Membran, erkennbar an einem helleren Kreis um die Pipettenmündung herum, der dadurch entsteht, dass die Membran eingedellt wird, ließ man den Druck vollständig ab und saugte vorsichtig die Membran in den Seal hinein. Nach Wechsel auf das gewünschte Pulsprotokoll wurden drei konsekutive Datensätze aufgenommen. Diese Referenzaufnahmen wurden teils gänzlich ohne Begasung und teils unter Applikation eines Vergleichsgases, bestehend aus 80% Stickstoff und 20% Sauerstoff, also annähernd Umgebungsluft, durchgeführt. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß ein Effekt allein auf dem physikalischen Effekt der Begasung beruhte. Nach Beginn der Lachgaszufuhr (1l/min) wurden noch sieben konsekutive Datensätze aufgenommen, da die quantitativen Vorversuche (siehe weiter unten) ergeben hatten, dass nach Durchlauf von vier Datensätzen, also nach einer Zeitspanne von acht Minuten Anflutung, die N_2O -Konzentration ein Plateau erreichte, so dass dann hiervon ausgehend noch drei konsekutive Datensätze aufgenommen und zur Auswertung herangezogen wurden.

2.2.5.4 Auswertung der Einzelkanalmessungen

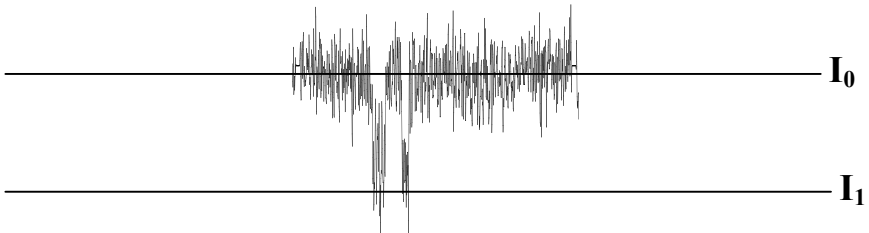
Die mit dem Programm pClamp (Axon Instruments, USA) ermittelten Rohdaten/Originalstromspuren wurden mit dem Programm Fetchan (Axon Instruments, USA) ausgewertet. Zunächst erfolgte die sogenannte Leckstromsubtraktion. Hierbei legt man in jedem Datensatz fest, welche Anteile Kanalöffnungen und welche keine enthalten. Danach wird der gemittelte Strom aller Anteile ohne Kanalöffnungen von allen Stromspuren mit Kanalöffnung abgezogen (siehe Abbildung 10). Dieser Vorgang dient dem Ausschluß des zu Beginn und zum Ende jedes Pulses auftretenden Kapazitätstransienten und der Verringerung des Grundrauschens. Der Kapazitätstransient ist der Strom, der bei Anlegung eines Potentials an die Zelle dafür benötigt wird, die Zellmembran zu beladen. Er äußert sich in einer gebogenen Stromkennlinie und erschwert das Erkennen von Kanalöffnungen in diesem Bereich. Im nächsten Auswertungsschritt erfolgt die Festlegung von Basiskennlinie (I_0) und Offenniveaus (I_{1-3}). Einzelkanalexperimente enthalten nur ein Offenniveau (I_1). Mehrkanalexperimente lassen sich durch entsprechende Korrektur (siehe unten) auswerten. In diesem Fall wurden bis zu drei Offenniveaus (I_{1-3}) erreicht und festgelegt. Daran angeschlossen werden die Signale des Datensatzes den Offenniveaus zugeordnet (Idealisierung). Hierbei erhält man rechteckförmige, idealisierte Einzelkanalströme. Lag ein Signal zwischen der Basiskennlinie und dem ersten Offenniveau, entschied das 50 %-Kriterium, ob ein Signal als Öffnung zu werten war oder als Rauschen, d.h. wurde dem Signal durch das Programm ein Stromwert zugeordnet, der kleiner als 50 % des Offenniveaus war, so wurde das Signal als Rauschen eingeordnet. Lag der Stromwert über 50 % des Offenniveaus, so wurde das Signal als Öffnung beurteilt.

1. Originalstromspuren

2. Differenzierung aktiver und passiver Stromanteile

3. Leckstromsubtraktion

4. Festlegung von Basiskennlinie [I_0] und Offenniveau [I_1]



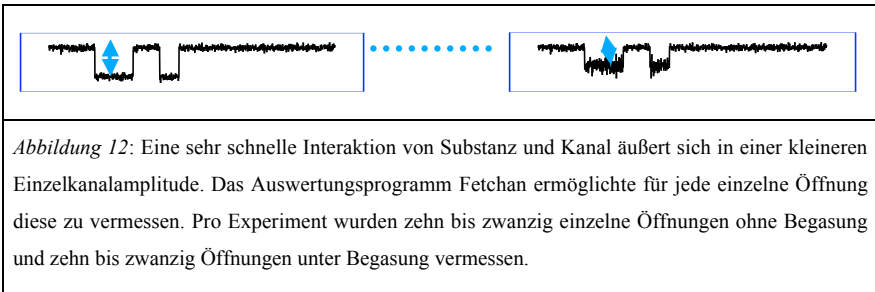
5. Erstellung von Ereignislisten (Idealisierung)

6. Darstellung der Ereignislisten mit NEUMTX, SUM102

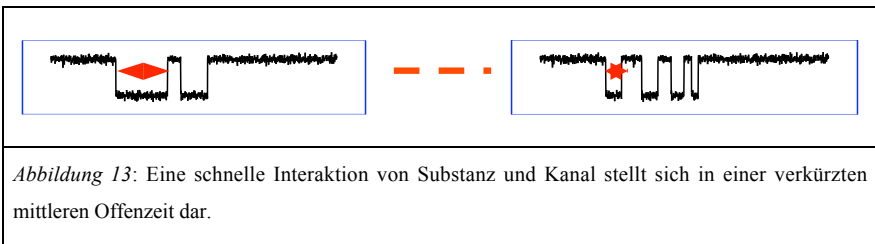
Abbildung 11 zeigt schematisch die Abfolge der Auswertung von Einzelkanalexperimenten mit den Softwareprogrammen pClamp und Fetchan (Axon Instruments, USA).

2.2.5.5 Einzelkanalparameter des sehr schnellen Schaltverhaltens

Die Interaktion einer Substanz mit einem Ionenkanal, die nur sehr kurzlebig ist (μs -Bereich), äußert sich in einer Reduktion der Einzelkanalamplitude (siehe *Abbildung 12*). Die Abtastfrequenz von 2kHz zur Digitalisierung der Daten kann derart schnelle Wechselwirkungen nicht auflösen.



2.2.5.6 Einzelkanalparameter des schnellen Schaltverhaltens



Eine schnelle Interaktion von Substanz und Kanal im ms -Bereich äußert sich in einer Reduktion des Einzelkanalparameters mittlere Offenzzeit (Hille B., 2001, S. 507) (*Abbildung 13*). Diese berechnet sich als Quotient aus allen aufsummierten Offenzzeiten pro Datensatz geteilt durch die Anzahl der Öffnungen dieses Datensatzes. Die mittlere Offenzzeit ist der Mittelwert aller Offenzzeiten eines Versuchs. Die mittlere Offenzzeit wurde durch das Programm NEUMTX berechnet.

Gleichung 1 : Mittlere Offenzeit (mean open time [ms])

| | | |
|--|-----------------------------------|--|
| $\text{mot} = \frac{\sum t_{\text{open } 1 \dots N}}{N_{\text{open}}}$ | mot | mean open time [ms] |
| | $\sum t_{\text{open } 1 \dots N}$ | Summe der Öffnungszeiten [ms]/ totale Offenzeit |
| | N_{open} | Anzahl der Öffnungen |

Die Heranziehung der mittleren Offenzeit, also des Mittelwerts der Offenzeiten, bedeutet, dass man von einer Normalverteilung der Offenzeiten ausgeht. Die Häufigkeitsverteilung der Offenzeiten folgte also einer Gaußschen Glockenkurve. Tatsächlich folgt sie einer Exponentialfunktion. Der Kehrwert der Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion erster Ordnung ist der τ -Wert. Logarithmiert man die x-Achse der Exponentialfunktion und wurzelt deren y-Achse erhält man den sogenannten Sigworth-Plot, auf den man eine Kurvenanpassung nach der Maximum-likelihood-Methode anwendet. Als Maximum dieser Kurvenanpassung erhält man erneut den τ -Wert, der die Verweildauer im offenen Kanalzustand angibt, die für das einzelne Experiment am Häufigsten aufgetreten ist. Der τ -Wert ist regelmäßig kleiner als die mittlere Offenzeit, da bei der Bestimmung der mittleren Offenzeit lange Kanalöffnungen überrepräsentiert werden. Das liegt an der Digitalisierung der Daten, die Öffnungen, die kürzer als 0,1 ms sind, nicht auflösen kann. Diese kurzen Öffnungen gehen bei der Aufzeichnung demnach verloren. Die Bestimmung des Mittelwertes aus den aufgezeichneten Daten gibt damit eine mittlere Offenzeit wieder, die tendenziell größer als der tatsächliche Wert ist. Der τ -Wert wurde mit dem Programm pSTAT ermittelt. Dieses Programm ermöglicht über eine Darstellung der ausgewerteten Datensätze in Häufigkeitshistogrammen eine graphische Darstellung der Anzahl an Kanalöffnungen bestimmter Zeitdauer. Bei einer schnellen Interaktion von Substanz und Kanal reduziert sich analog zur mittleren Offenzeit auch der τ -Wert.

Gleichung 2: Verweildauer τ [ms]

| | | |
|--------------------------------------|--------|---|
| $F(t) = \sum 1/\tau * \exp(-t/\tau)$ | F | Anzahl der Öffnungen |
| | t | Verweildauer [ms] |
| | τ | Verweildauer, die am Häufigsten auftritt [ms] |

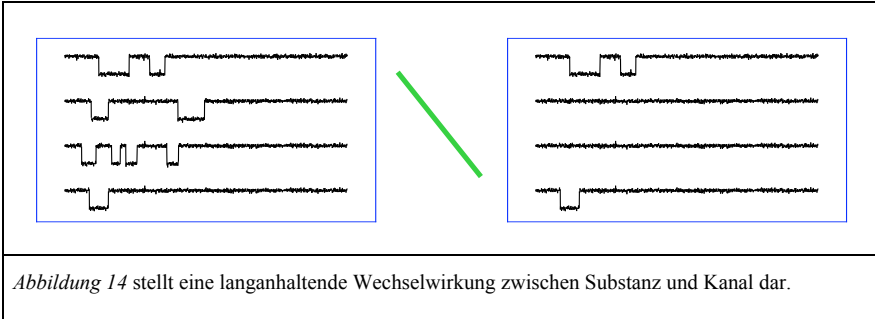
Darüber hinaus reduziert sich bei einer schnellen Interaktion von Substanz und Kanal auch der Einzelkanalparameter Offenwahrscheinlichkeit. Diese berechnet sich aus dem Quotienten aus der Summe aller Offenzeiten geteilt durch die Dauer aller aktiven Spuren.

Gleichung 3: Mittlere Offenwahrscheinlichkeit (mean open probability [%])

| | | |
|---|---------------------|---------------------------------|
| $mP_{\text{open}} = \frac{\sum t_{\text{open}1\dots N}}{n * M_{\text{active}} * t_0}$ | mP_{open} | mean open probability [%] |
| | n | Anzahl der Kanäle im Experiment |
| | M_{active} | Anzahl aktiver Spuren |
| | t_0 | Pulsdauer [ms] |

2.2.5.7 Einzelkanalparameter des langsamen Schaltverhaltens

Eine langsame Interaktion von Substanz und Kanal im Sekundenbereich äußert sich in einer Reduktion der Anzahl an aktiven Spuren (*Abbildung 14*).



Die Anzahl an aktiven Spuren wurde durch das Programm NEUMTX angegeben. Die Verfügbarkeit berechnet sich aus dem Quotienten der Anzahl an aktiven Spuren geteilt durch die Anzahl an auswertbaren Spuren.

Gleichung 4: Verfügbarkeit (availability [%])

| | | |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| $avl = \frac{M_{\text{active}}}{M_0}$ | avl | availability [%] |
| | M_{active} | Anzahl aller aktiven Spuren |
| | M_0 | Anzahl aller auswertbaren Spuren |

2.2.5.8 Mittlerer Summenstrom

Das Programm sum102 mittelt alle 60 Stromspuren eines Datensatzes und gibt den mittleren Summenstrom in femtoampere (10^{-15} * Ampere) an. Dieser berechnet sich als Quotient aus der Summe aller Ströme pro Zeiteinheit geteilt durch die Anzahl der zugrunde gelegten Stromspuren. Hieraus lässt sich graphisch der mittlere Spitzenstrom I_{peak} ermitteln. Hierfür wurde der mittlere Summenstrom mit Hilfe der Fast Fourier Transformation vorab geglättet.

Gleichung 5: mittlerer Spitzenstrom (I_{peak})

| | | |
|--|----------------|---|
| $I_{peak} \cong \sum p_i * I_{sum}(t_i)$ | I_{peak} | mittlerer Spitzenstrom [fA] |
| | p_i | Gewichtung [0;1] |
| | $I_{sum}(t_i)$ | Summenstromfunktion (Summation aller Messpunkte $I(t_i)$ zum Zeitpunkt t_i über alle Spuren) |

2.2.5.9 Korrektur von Mehrkanalexperimenten

Wie bereits schon erwähnt, war Ziel der transienten Transfektion der Erhalt von Einzelkanalexperimenten. Aufgrund der Transfektionseffizienz ließen sich vielfach nur Mehrkanalexperimente erhalten, die aber bis zu einer Zahl von drei Kanälen pro Patch auch auf Einzelkanalebene analysierbar blieben. Hierfür mussten jedoch die Einzelkanalparameter entsprechend korrigiert werden (Schröder F. et al., 1998).

Gleichung 6: korrigierte Verfügbarkeit

| | | |
|------------------------------|--------|-------------------------------|
| $av1' = 1 - [1 - av1]^{1/n}$ | $av1'$ | korrigierte Verfügbarkeit [%] |
|------------------------------|--------|-------------------------------|

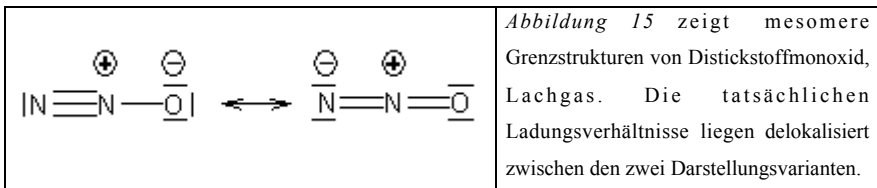
Gleichung 7: korrigierte Offenwahrscheinlichkeit

| | | |
|--|---------------------|--|
| $mP_{\text{open}}' = \frac{\sum t_{\text{open}1 \dots N}}{n * avl' * M_0 * t_0}$ | mP_{open}' | korrigierte Offenwahrscheinlichkeit [%] |
|--|---------------------|--|

Gleichung 8: korrigierter mittlerer Spitzenstrom

| | | |
|--|--------------------|---|
| $I_{\text{peak}}' = I_{\text{peak}} / n$ | I_{peak}' | korrigierter mittlerer Spitzenstrom [fA] |
|--|--------------------|---|

2.2.6 Lachgas



In dem vorliegenden Projekt wurde der Effekt von Distickstoffmonoxid (N₂O, Stickoxydul, Lachgas) auf rekombinante T-Typ Ca²⁺-Kanäle untersucht. Lachgas liegt bei Raumtemperatur gasförmig vor und besitzt einen hohen Partialdruck, was eine geringe Wasserlöslichkeit bedingt. Es ist damit auch in der Körperflüssigkeit Blut nur schlecht löslich und flutet deshalb unter Narkosebedingungen schnell an und ab. Dennoch ist Lachgas im Verhältnis zu anderen Inhalationsnarkotika recht polar, was auch in einem Bunsen-Koeffizient von 0,6 (Löslichkeit N₂O in H₂O bei 25°C) zum

Ausdruck kommt. Im vorliegenden Projekt wurde Lachgas in 100- und 80 %-iger Konzentration angewendet. Am Menschen unter Narkosebedingungen darf es nur bis zu maximal 80% eingesetzt werden, da mindestens 20% Sauerstoff für das menschliche Leben unabdingbar sind. Mit maximal einer Konzentration von 80% Lachgas allein ist eine Anästhesie nicht durchführbar, da es hierfür zu schwach narkotisch wirkt. Im Vergleich zu anderen Narkotika ist hervorzuheben, dass trotz der nur gering ausgeprägten anästhetischen Wirkung die hochpotente Analgesie ins Auge sticht und der Aufklärung bedarf.

2.2.7 Lachgas-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung von Lachgas in der Badlösung wurde analog dem amerikanischen Arzneibuch (USP XXII) durchgeführt. Dieses sieht eine gaschromatographische Bestimmung mit Helium als Trägergas und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor zur Signalerkennung vor. Freundlicherweise konnten hierfür die Gerätschaften des Instituts für Botanik der Universität Köln, Arbeitsgruppe Prof. Bothe, verwendet werden. Bei dem verwendeten Gaschromatographen handelte es sich um eine gepackte Säule (6m x 4mm), also um eine gas-fest Chromatographie. Das Lachgas wurde an porösen Polymerperlen adsorbiert und dadurch von Sauerstoff und Stickstoff, aber auch den übrigen Bestandteilen der Luft, wie verschiedenen Edelgasen, getrennt. Der Injektor wurde hierbei auf 100°C, der Ofen auf 50°C und der Detektor auf 100°C temperiert. Zur Referenzwertbestimmung wurde ein Messkolben für drei Minuten mit 100 %igem Lachgas begast und sofort gasdicht verschlossen. Mit einer Hamilton-Spritze wurden hieraus 30 µl entnommen und in ein gasdicht verschlossenes Gefäß mit definiertem Volumen eingespritzt. 100 µl hieraus ergaben den Referenzwert. Zur Probenziehung wurde an drei Tagen ein Patch-Clamp-Versuch simuliert und nach definierten Zeitintervallen je 1 ml Badlösung entnommen und in ein gasdicht verschlossenes Gefäß mit definiertem Volumen gegeben. Je 100 µl Gas aus diesen Ansätzen wurden in den Gaschromatographen eingespritzt. Aus den Vorversuchen war bekannt, dass mindestens eine Anflutungszeit von 8 Minuten eingehalten werden

musste, bevor drei konsekutive Datensätze zur Bestimmung eines Lachgas-Effektes herangezogen werden konnten. Ein Datensatz umfasste 2 Minuten Aufzeichnung, so dass für die Probenziehung zur gaschromatographischen Bestimmung alle 2 Minuten 1ml Badlösung entnommen und einer quantitativen Bestimmung unterzogen wurde. Unter Berücksichtigung, dass 1 mol Gas bei 25°C nach der allgemeinen Gasgleichung ein Volumen von 24,47 l einnimmt, berechnete sich die Konzentration folgendermaßen:

Gleichung 9: Lachgas-Konzentrationsbestimmung nach der allgemeinen Gasgleichung

| | | |
|---|-------|--|
| $c \text{ [mol/l]} = \frac{n_0 * h * 0,6}{V_R * y}$ | c | Konzentration [mol/l] |
| | n_0 | Stoffmenge in 30 μ l, 1,23 μ mol |
| | V_R | Rauminhalt des Referenzfläschchens [l] |
| | h | Signalhöhe der Probenwerte im Chromatogramm [cm] |
| | y | Signalhöhe des Referenzwerts im Chromatogramm [cm] |
| | 0,6 | Signalhöhe des Referenzwerts im Chromatogramm |

2.2.8 Statistik

Mit Ausnahme der Angabe einzelner exemplarischer Versuche sind die Daten als arithmetische Mittelwerte angegeben. Als Streuungsmaß wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) verwendet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines gepaarten t-Tests ermittelt. Ein Mittelwertsunterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 5 %, d.h. $p < 0,05$, angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 gaschromatographische N₂O-Bestimmung

Eine Versuchssimulation zur Probenziehung wurde an drei Tagen durchgeführt. Die gaschromatographische Bestimmung erfolgte im direkten Anschluss an die Probenziehung.

3.1.1 Validierung

Zur Validierung des Messsystems wurde die Auflösung R und die Peaksymmetrie S_s bestimmt. Die Auflösung R gibt Auskunft über das Vorliegen einer Basislinientrennung zwischen zwei Substanzpeaks, ist also ein Parameter der qualitativen Bestimmung. Sie gibt Auskunft über die Trennleistung eines gaschromatographischen Systems und berechnet sich wie folgt:

Gleichung 10: Auflösung R

| | | |
|--|---------------|--|
| $R = \frac{1,18 * ({}^2t_{m+s} - {}^1t_{m+s})}{{}^2b_{0,5} + {}^1b_{0,5}}$ | R | Auflösung |
| | ${}^1t_{m+s}$ | Bruttoretentionszeit ^{*1} der Verunreinigung, dargestellt durch die Strecke s_1 [cm], siehe <i>Abbildung 16</i> |
| | ${}^2t_{m+s}$ | Bruttoretentionszeit von N ₂ O, dargestellt durch die Strecke s_2 [cm] |
| | ${}^1b_{0,5}$ | Halbwertsbreite ^{*2} der Verunreinigung [cm] |
| | ${}^2b_{0,5}$ | Halbwertsbreite von N ₂ O [cm] |

*1 Die Bruttoretentionszeit ist die Zeit, die das Trägergas, braucht, um das chromatographische System, die Säule, zu verlassen, addiert mit der Zeit, die die jeweilige Substanz braucht, um die Säule zu verlassen

*2 Die Halbwertsbreite ist die Breite des Peaks auf halber Höhe.

Ab einer Auflösung größer 1,4 liegt eine Basislinientrennung vor (Rücker G. et al, 1992).

Die Peaksymmetrie gibt hingegen an, ob die Peakhöhe zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden kann. Die Peakhöhe ist bei symmetrischen Peaks direkt proportional zur Substanzmenge. Die Peaksymmetrie berechnet sich nach dem europäischen Arzneibuch wie folgt:

Gleichung 11: Peaksymmetrie S_s

| | | |
|-----------------------------|------------|---|
| $S_s = \frac{b_{0,05}}{2A}$ | S_s | Peaksymmetrie |
| | $b_{0,05}$ | Breite des Peaks bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe [cm] |
| | A | Abstand zwischen der Senkrechten in einem Zwanzigstel der Peakhöhe und dem aufsteigenden Ast des Peaks [cm] |

Das europäische Arzneibuch 2005 fordert für die Peaksymmetrie einen Wert zwischen 0,8 und 1,5.

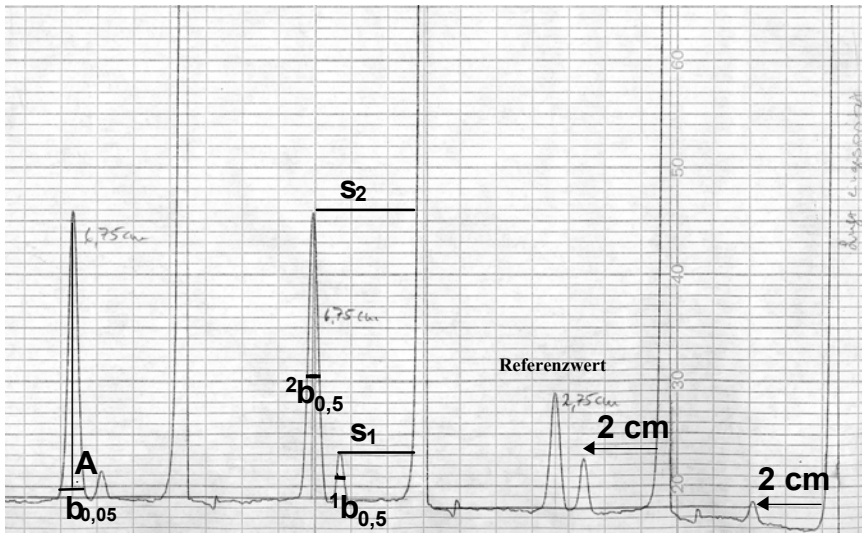


Abbildung 16: Exemplarisches Gaschromatogramm unter Einbeziehung der Referenzwertbestimmung und zur Validierung der Parameter Auflösung R und Peaksymmetrie S_s . Als interner Standard diente der Referenzwert aus 100 %igem N_2O . Die jeweils linken Peaks sind die Substanzpeaks von N_2O , wobei der kleinere N_2O -Peak rechts der Peak der Referenzwertbestimmung ist. Die kleinen Peaks jeweils rechts neben den Lachgas-Peaks stellen eine Verunreinigung aus der Luft, vermutlich CO_2 , dar, da eingespritzte Umgebungsluft (ganz rechts) einen Peak mit derselben Retentionszeit verursachte (siehe mit Pfeilen markierte Peaks, vermessen jeweils eine Strecke von 2 cm, also identisch). Die Auswertung wurde hierdurch nicht beeinträchtigt, da eine Basislinientrennung möglich ist. Hierfür wurde die Auflösung R berechnet. Die lange Schulter ganz rechts und jeweils zu Beginn jedes Durchgangs ist die Totzeit von Helium, das praktisch nicht durch die Säule zurückgehalten wird.

Gleichung 12: Bestimmung der Auflösung R für das exemplarische Gaschromatogramm

$$R = \frac{1,18 * (2,8\text{cm} - 2\text{cm})}{0,3 \text{ cm} + 0,2 \text{ cm}} = 1,888 > 1,4$$

Gleichung 13: Bestimmung der Peaksymmetrie S_s für das exemplarische Gaschromatogramm

$$S_s = \frac{0,6 \text{ cm}}{2 * 0,3 \text{ cm}} = 1$$

Der Wert liegt zwischen den Grenzwerten von 0,8 und 1,5, so dass Peaksymmetrie gegeben ist und die Peakhöhe zur quantitativen Auswertung herangezogen werden konnte.

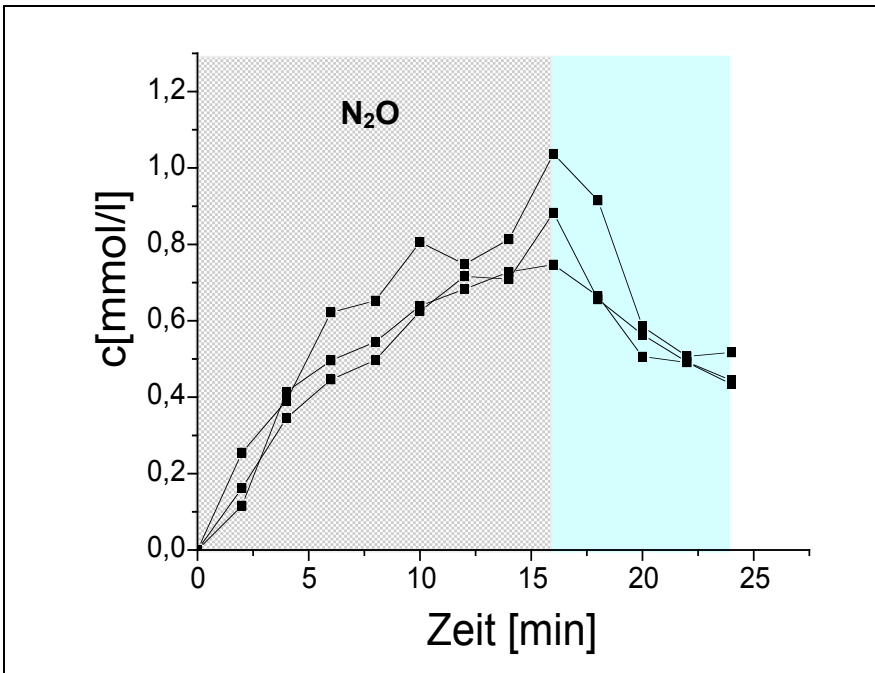
3.1.2 N₂O-Konzentrations-Zeit-Verläufe

Abbildung 17: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Lachgas in der Badlösung. Es wurde jeweils 16 min lang mit 100%-igem Lachgas begast. Danach wurde 8 min lang mit einem Vergleichsgas aus 80 % Stickstoff und 20 % Sauerstoff, also näherungsweise ein Gas mit der Zusammensetzung der normalen Umgebungsluft, mit derselben Flussrate (1l/min), ausgegast. Alle zwei Minuten wurde 1ml Probenlösung entnommen und in gasdichte Glasgefäße gegeben. Zeitnah wurden hieraus 100 μ l in den Injektor des Gaschromatographen eingespritzt und die erhaltenen Chromatogramme ausgewertet.

3.1.3. Tabellarische Zusammenfassung der N₂O-Konzentrationsbestimmung

Tabelle 12: Erster Messtag der gaschromatographischen Bestimmung

| Zeit [min] | Messung 1 [cm] | Messung 2 [cm] | Mittelwert [cm] | Konzentration [mmol/l] |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| 0 | 1,5 | 1,6 | 1,55 | 0,105* |
| 2 | 3,7 | 3,8 | 3,75 | 0,255 |
| 4 | 5,7 | 5,8 | 5,75 | 0,391 |
| 6 | 8,9 | 9,2 | 9,15 | 0,622 |
| 8 | 9,4 | 9,8 | 9,6 | 0,653 |
| 10 | 11,7 | 12 | 11,85 | 0,806 |
| 12 | 10,8 | 11,2 | 11 | 0,748 |
| 14 | 11,9 | 12 | 11,95 | 0,813 |
| 16 | 15,2 | 15,3 | 15,25 | 1,037 |
| 18 | 13,4 | 13,5 | 13,45 | 0,915 |
| 20 | 8,7 | 8,5 | 8,6 | 0,585 |
| 22 | 7,5 | 7,4 | 7,45 | 0,507 |
| 24 | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 0,517 |

* Als Nullwert wird hier der Referenzwert angegeben.

Tabelle 13: Zweiter Messtag der gaschromatographischen Bestimmung

| Zeit [min] | Messung 1 [cm] | Messung 2 [cm] | Mittelwert [cm] | Konzentration [mmol/l] |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| 0 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 0,109* |
| 2 | 2,4 | 2,3 | 2,35 | 0,116 |
| 4 | 8,4 | 8,4 | 8,4 | 0,414 |
| 6 | 10,1 | 10 | 10,05 | 0,496 |
| 8 | 11,2 | 10,9 | 11,05 | 0,545 |
| 10 | 13 | 12,9 | 12,95 | 0,639 |
| 12 | 14,1 | 13,6 | 13,85 | 0,683 |
| 14 | 14,7 | 14,8 | 14,75 | 0,728 |
| 16 | 15,1 | 15,2 | 15,15 | 0,747 |
| 18 | 13,4 | 13,5 | 13,45 | 0,664 |
| 20 | 9,9 | 10,6 | 10,25 | 0,506 |
| 22 | 9,9 | 10 | 9,95 | 0,491 |
| 24 | 8,8 | 8,8 | 8,8 | 0,434 |

* Als Nullwert wird hier der Referenzwert angegeben.

Tabelle 14: Dritter Messtag

| Zeit [min] | Messung 1 [cm] | Messung 2 [cm] | Mittelwert [cm] | Konzentration [mmol/l] |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| 0 | 2,3 | 2,2 | 2,25 | 0,109* |
| 2 | 3,3 | 3,4 | 3,35 | 0,162 |
| 4 | 7,1 | 7,2 | 7,15 | 0,345 |
| 6 | 9,2 | 9,3 | 9,25 | 0,446 |
| 8 | 10,6 | 10 | 10,3 | 0,497 |
| 10 | 13 | 12,9 | 12,95 | 0,625 |
| 12 | 14,9 | 14,8 | 14,85 | 0,716 |
| 14 | 14,8 | 14,6 | 14,7 | 0,709 |
| 16 | 18,4 | 18,2 | 18,3 | 0,883 |
| 18 | 13,7 | 13,5 | 13,6 | 0,656 |
| 20 | 11,7 | 11,7 | 11,7 | 0,564 |
| 22 | 10,3 | 10,1 | 10,2 | 0,492 |
| 24 | 9,4 | 9 | 9,2 | 0,444 |

* als Nullwert wird hier der Referenzwert angegeben.

3.2 Vermessung der stabil transfizierten HEK-293-Zellen

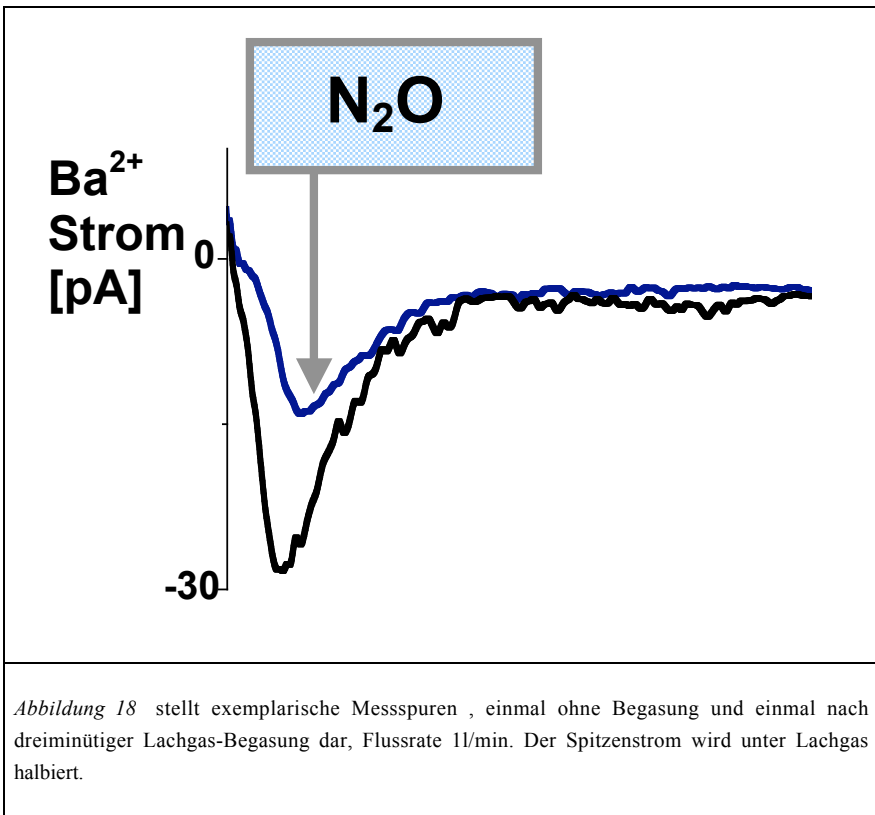
3.2.1 Haltepotential -90 mV

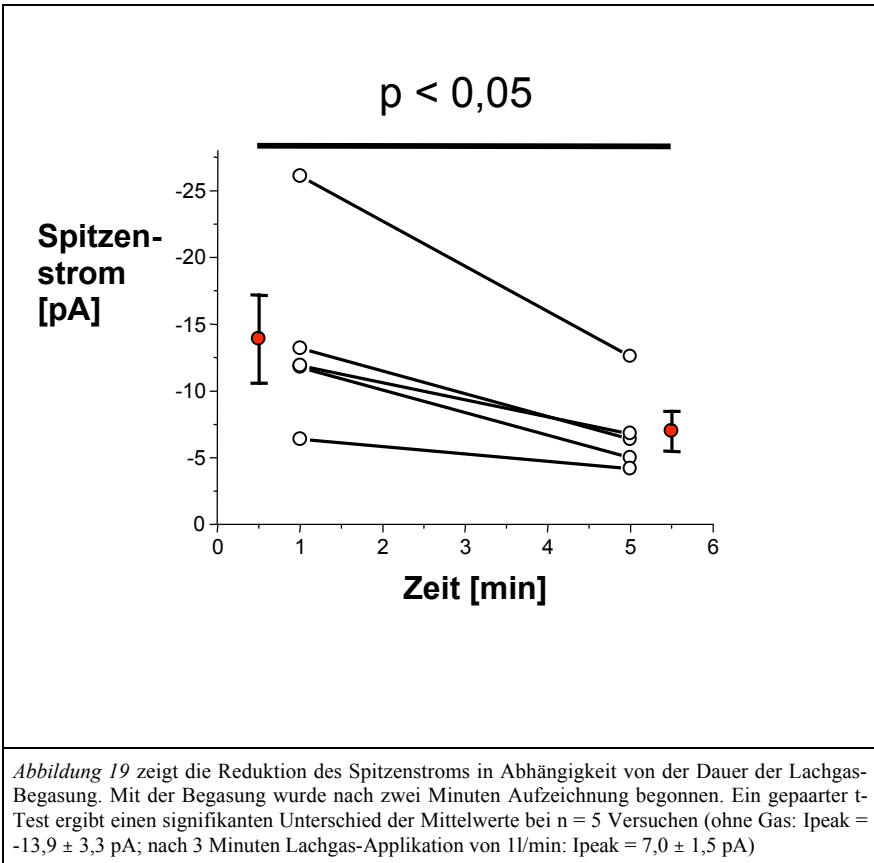
Es wurde ein Pulsprotokoll gewählt, das gewährleisten sollte, dass alle innerhalb des Patches liegenden Kanäle miterfasst würden. Dies war der Fall, wenn man von einem Haltepotential von -90 mV ausging, da bei -90 mV für HEK-Zellen das Standardruhemembranpotential liegt, aus dem heraus in der Regel alle Ionenkanäle

aktivierbar sind. Man erhielt whole-cell-ähnliche Ströme, bei denen die Unterscheidung einzelner Kanalöffnungen nicht möglich war.

3.2.1.1 stabil transfizierte, rekombinante $Ca_v3.2$

Eindrucksvoll stellte sich der Effekt unter Lachgas-Begasung dar, wenn man von -90 mV ausgehend auf -20 mV pulste. In fünf Versuchen reduzierte sich der maximale Strom von $-13,9 \pm 3,3$ pA auf $-7,0 \pm 1,5$ pA; $p < 0,05$ im gepaarten t-Test.

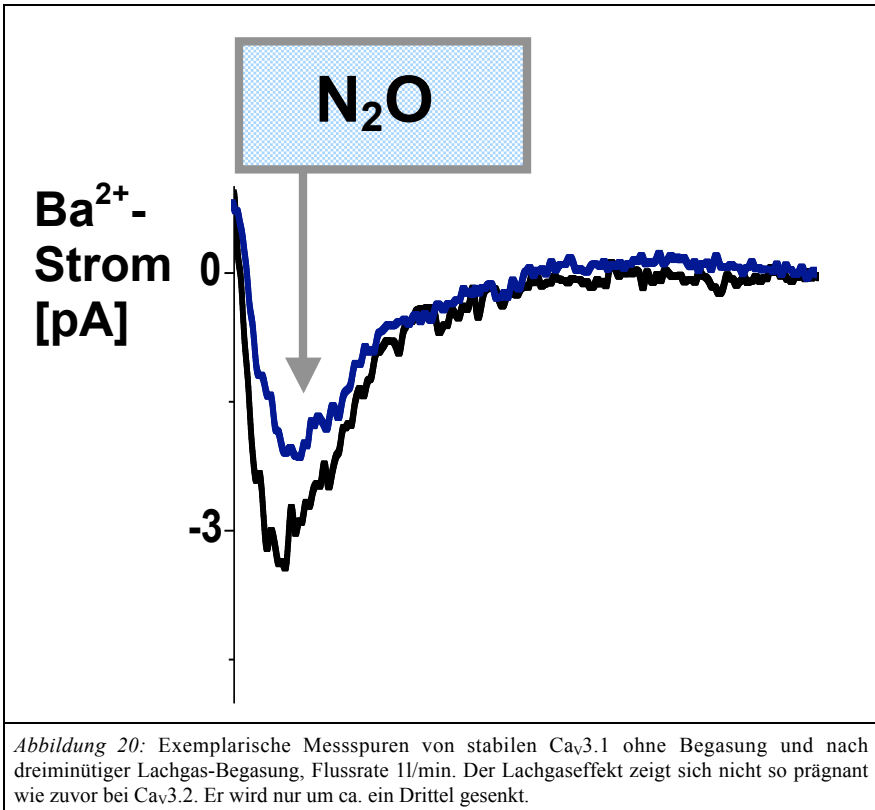


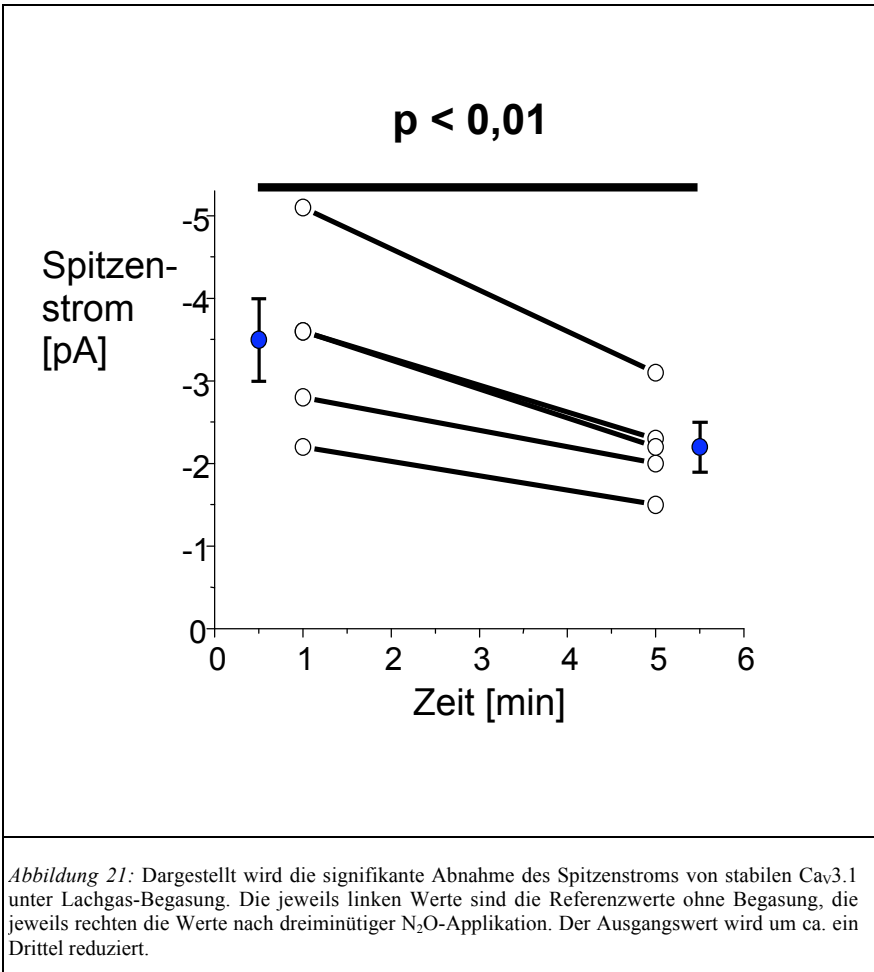


3.2.1.2 stabil transfizierte, rekombinante $\text{Ca}_v3.1$ (Akzessionsnummer AF190860, Cribbs L. L. et al., 2000)

Ausgehend von -90 mV erhielt man bei einem Testpotential von -20 mV auch hier aufgrund der hohen Expressionsdichte „whole-cell-artige“ Ströme, bei denen einzelne Kanalöffnungen nicht diskriminierbar waren. Der Grad der Expressionsdichte war jedoch im Vergleich zu $\text{Ca}_v3.2$ geringer, was sich an kleineren Spitzenstromwerten

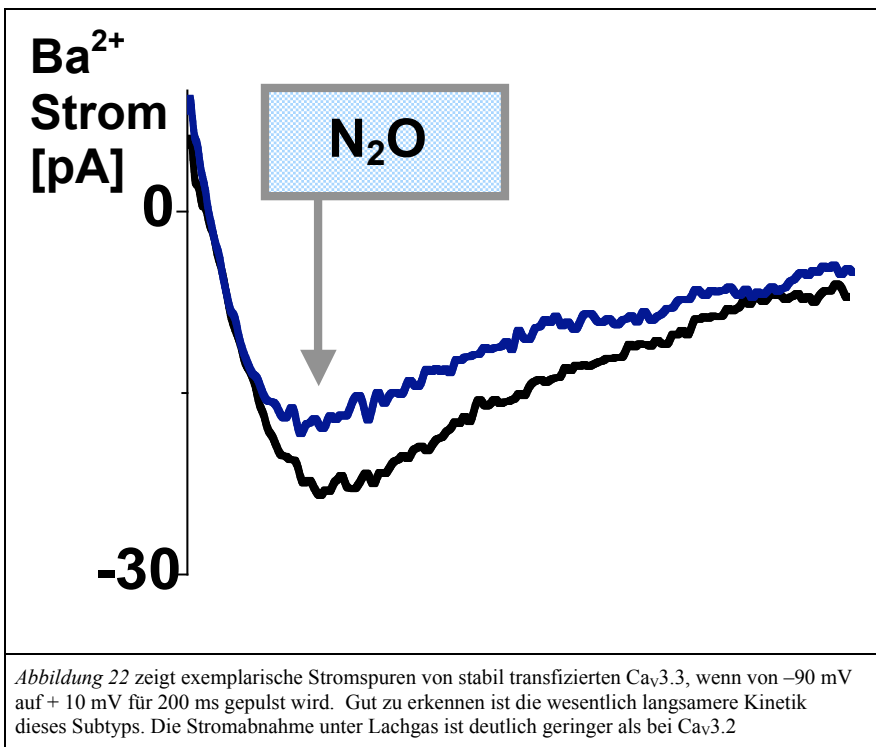
ablesen ließ. Auch weniger prägnant zeigte sich der Lachgaseffekt auf $\text{Ca}_v3.1$. In fünf Versuchen reduzierte sich der Spitzenstrom von $-3,5 \pm 0,5$ pA auf $-2,2 \pm 0,3$ pA; $p < 0,01$ im gepaarten t-Test. Während zuvor bei $\text{Ca}_v3.2$ der Spitzenstrom unter Lachgas halbiert wurde, wird hier bei $\text{Ca}_v3.1$ der Spitzenstrom nur um ca. ein Drittel reduziert.

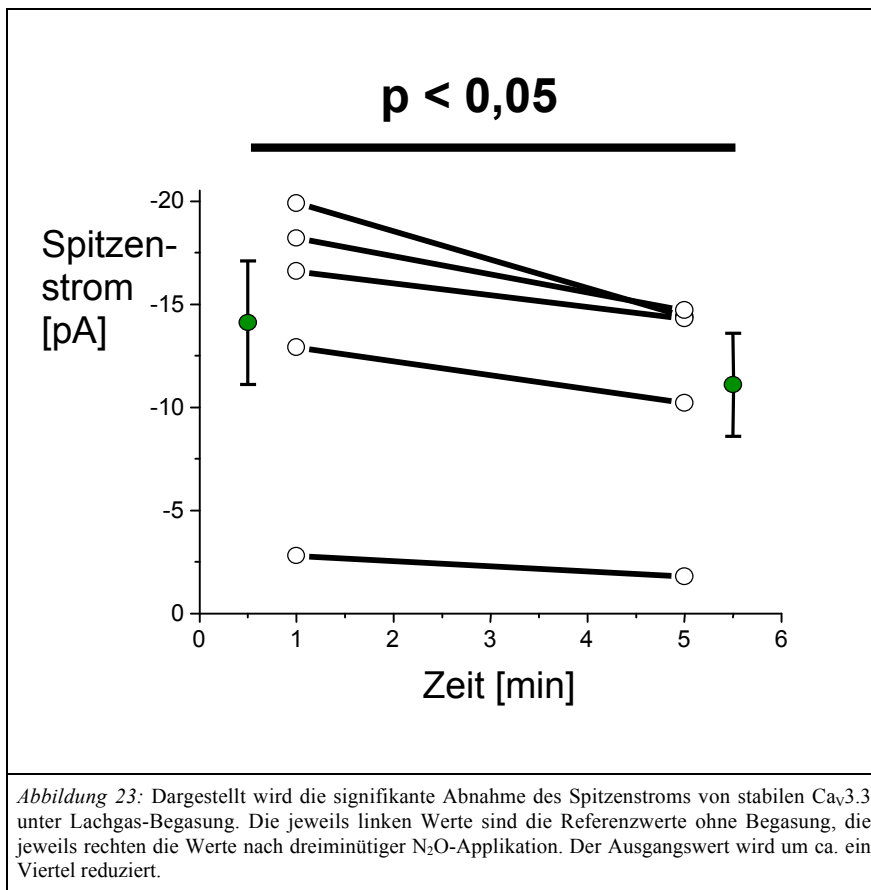




3.2.1.3 stabil transfizierte, rekombinante Ca_v3.3

Stabil transfizierte Ca_v3.3 ergaben bei Anwendung eines Pulsprotokolls von -90 mV auf -20 mV eine nur unvollständige Aktivierung. Deshalb musste zur vollständigen Aktivierung dieser Kanäle auf $+10$ mV gepulst werden, wie es schon beschrieben wurde (Gomora et al., 2002). Nichtsdestotrotz aktiviert und inaktiviert dieser T-Typ-Calcium-Kanal wesentlich langsamer als die anderen Ca_v3 (Lee J.-H. et al., 1999). Im direkten Vergleich ergab sich für Ca_v3.3 ein wesentlich schwächerer Effekt durch Lachgas als auf Ca_v3.2. In fünf Versuchen nahm der Spitzenstrom von $-14,1 \pm 3,0$ pA auf $-11,1 \pm 2,5$ pA, $p < 0,05$, ab. Dies entspricht einer Reduktion um ca. ein Viertel des Ausgangswerts.





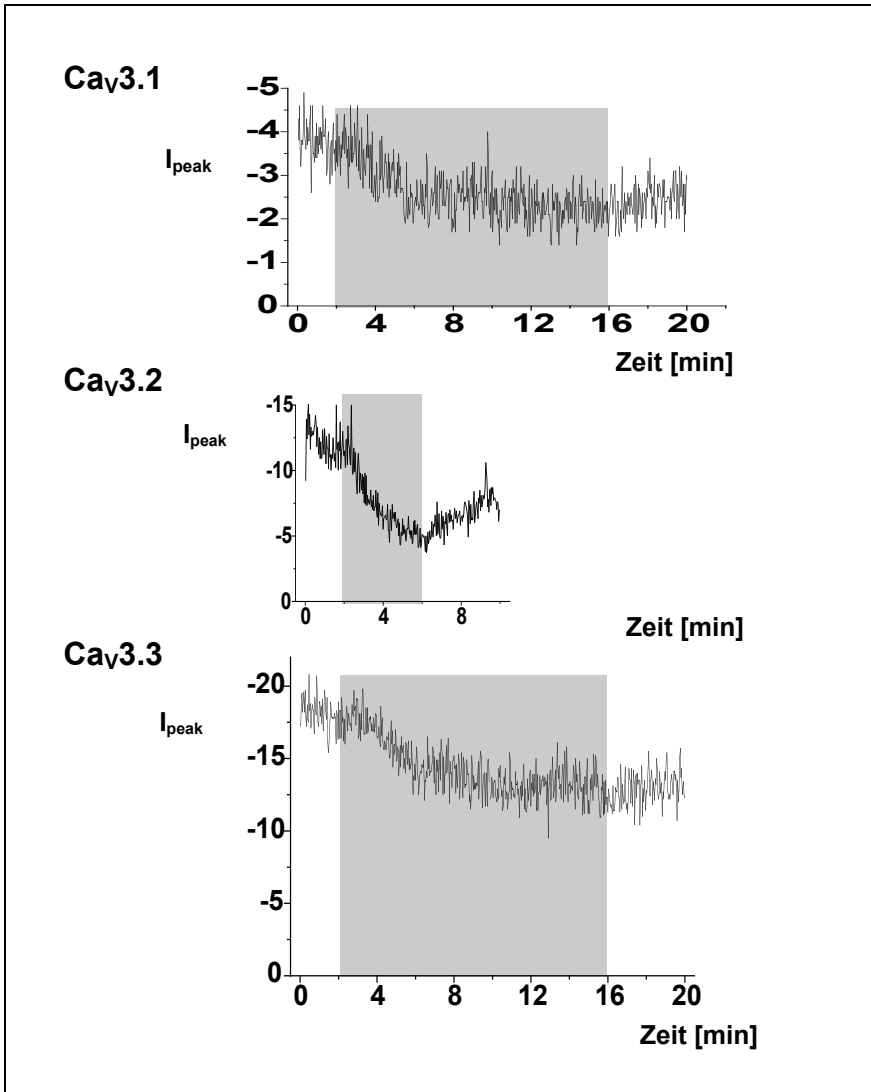


Abbildung 24: Spitzenstrom-Zeit-Verläufe unter Lachgas-Begasung (grau unterlegt) für stabil transfizierte Ca_v3.1 (oben), Ca_v3.2 (Mitte) und Ca_v3.3 (unten). Der Spitzenstrom pro Zeiteinheit von Ca_v3.2 nimmt im Vergleich zu Ca_v3.1 und Ca_v3.3 schneller und stärker ab. Das entspricht für Ca_v3.2 einer Abnahme um die Hälfte, für Ca_v3.1 einer Reduktion um ein Drittel und für Ca_v3.3 der Abnahme um ein Viertel des Ausgangswerts. Der Hemmeffekt scheint zumindest teilweise reversibel zu sein.

3.2.2 Stabil transfizierte, rekombinante $Ca_v3.2$ auf Einzelkanalebene unter 100% N_2O

Um die stabil transfizierten $Ca_v3.2$ auch auf Einzelkanalebene untersuchen zu können, wurde ein Pulsprotokoll gewählt, bei dem man von einem Haltepotential von -50 mV ausging und für 200 ms auf -20 mV pulste. Hält man T-Typ-Calcium-Kanäle bei einem Potential von -50 mV, so werden ein Großteil der unter der Patch-Pipette gelegenen Kanäle inaktiviert, so dass Einzelkanalereignisse beim Pulsen auf -20 mV aufgezeichnet werden können. Lachgas reduzierte die Einzelkanalparameter des langsamen und des schnellen Schaltverhaltens. Sowohl Verfügbarkeit als auch Verweildauer τ und Offenwahrscheinlichkeit nahmen ab. Die Interaktion von N_2O und Kanalpore entsprach demnach einer dualen Wirkkinetik: die Reduktion der Verfügbarkeit gibt eine Interaktion im Sekundenbereich wider, die Abnahme von Verweildauer τ und mittlerer Offenwahrscheinlichkeit repräsentiert eine schnelle Interaktion im Millisekundenbereich. Eine sehr schnelle Interaktion im Mikrosekundenbereich, die sich in einer Abnahme der Einzelkanalamplitude hätte zeigen müssen (Hille B., 2001, S. 507), konnte nicht festgestellt werden.

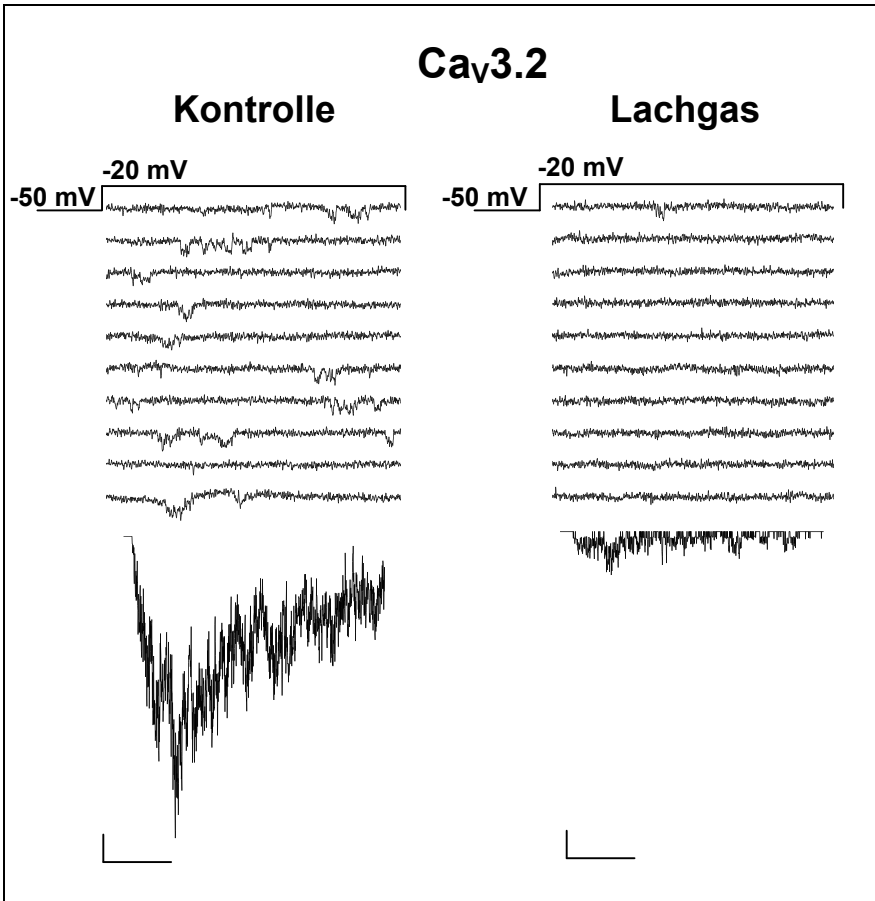
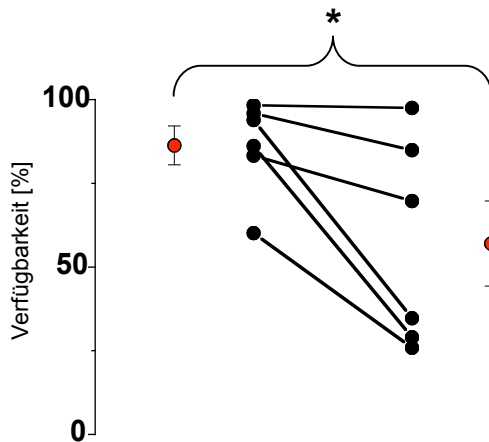


Abbildung 25: Dargestellt werden exemplarische Stromspuren rekombinanter, stabil transfizierter Ca_v3.2, links unter Kontrollgas (80 % N₂/20% O₂, 1l/min) und rechts unter Lachgas (100%, 1l/min). Darunter sind die aus dem jeweiligen Versuch resultierenden mittleren Summenströme abgebildet: links, Ca_v3.2 unter Kontrollgas, aus 179 Stromspuren gemittelt, rechts, Ca_v3.2 unter Lachgas, aus 239 Stromspuren gemittelt. Die vertikalen Skalierungshilfen geben jeweils 1 pA für die Einzelmessspuren bzw. 10 fA für die Summenströme, die horizontalen Skalierungshilfen geben jeweils 50 ms an. Deutlich erkennbar ist die Abnahme des Summenstroms von Ca_v3.2 unter Lachgas-Begasung.

Abbildung 26: Dargestellt werden die Einzelkanalparameter des langsamen (Verfügbarkeit, unten) und schnellen (Verweildauer τ und mittlere Offenwahrscheinlichkeit, nächste Seite) Schaltverhaltens von $Ca_v3.2$ unter Kontrollgas (linke Werte) und Lachgas (rechte Werte). Alle drei Parameter nehmen unter Lachgas-Begasung ab: Verfügbarkeit: $86,3 \pm 5,7 \%$ unter Kontrollgas, $57,0 \pm 12,7 \%$ unter Lachgas, $p < 0,05$; Verweildauer τ : $0,40 \pm 0,02$ ms unter Kontrollgas, $0,33 \pm 0,04$ ms unter Lachgas, $p = 0,09$; mittlere Offenwahrscheinlichkeit: $8,9 \pm 2,1 \%$ unter Kontrollgas, $4,2 \pm 1,5 \%$ unter Lachgas, $p < 0,01$.



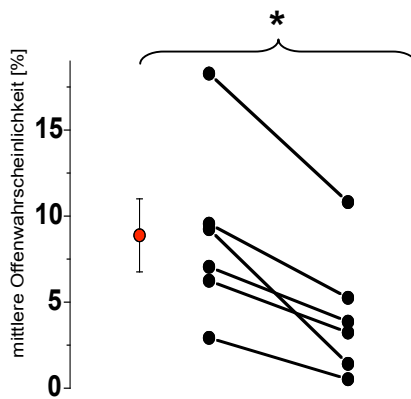
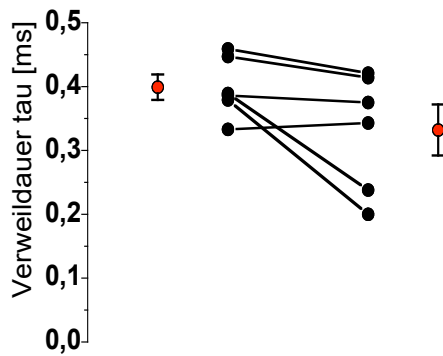


Tabelle 15 enthält zusammengefasst die Einzelkanalparameter von $\text{Ca}_v3.2$, $n = 6$, Pulsprotokoll: -50 mV Haltepotential, -20 mV Testpotential, Puls alle 2 Sekunden für 200 ms.

| Ca_v3.2 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche [n] |
|--------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|-------------------------|
| Kontrollgas | -61,3 ± 12,9 | 86 ± 6 | 8,9 ± 2,1 | 0,93 ± 0,11 | -0,53 ± 0,01 | 0,40 ± 0,02 | 6 |
| 100% N ₂ O | -33,4 ± 11,8 | 57 ± 13 | 4,2 ± 1,5 | 0,59 ± 0,08 | -0,52 ± 0,03 | 0,33 ± 0,04 | |
| p-Wert | < 0,05 | < 0,05 | < 0,01 | < 0,01 | 0,5 | 0,1 | |

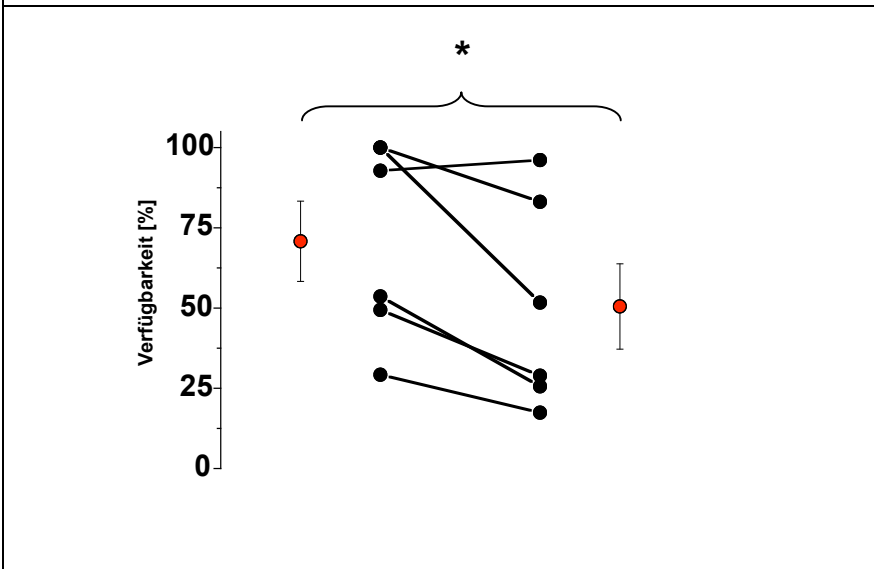
3.2.3 Stabil transfizierte, rekombinante $\text{Ca}_v3.2$ auf Einzelkanalebene unter 80% N₂O

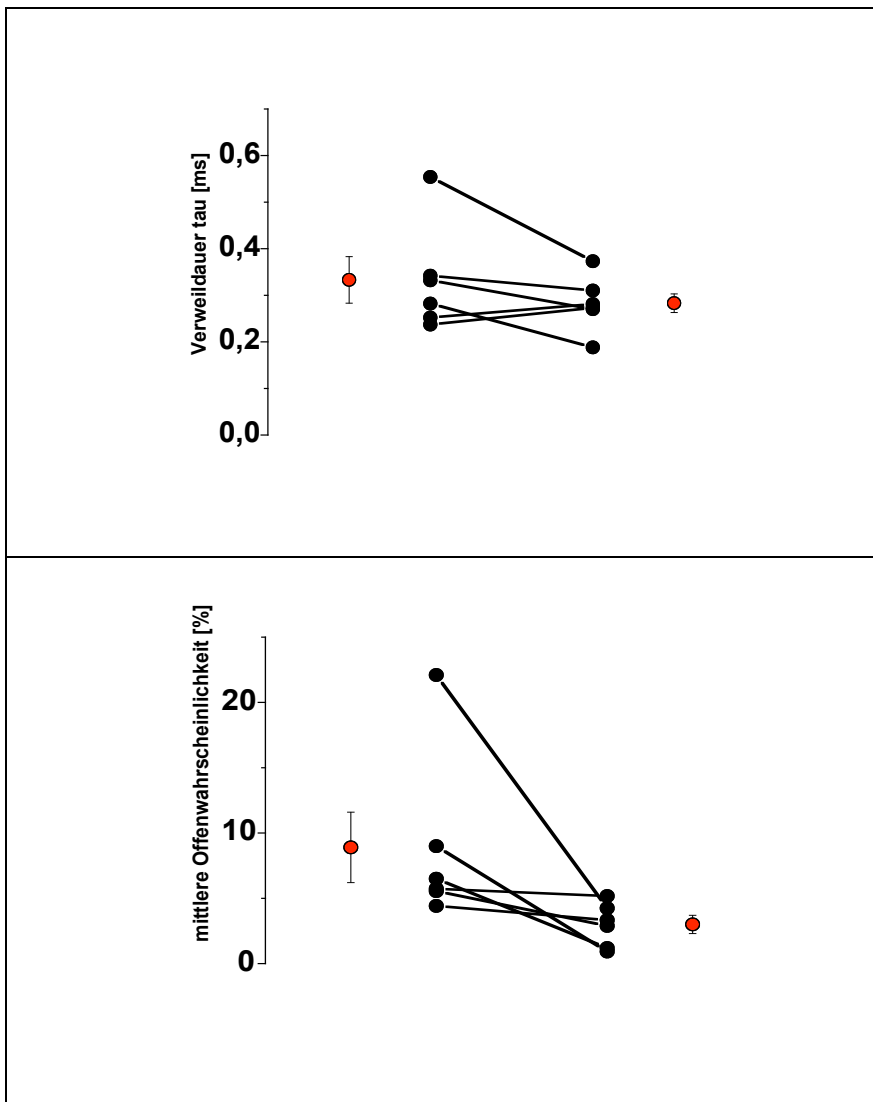
Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte von 100%igem N₂O auf Hypoxie beruhten, wurden daneben auch Versuche aufgezeichnet, bei denen mit nur 80%igem Lachgas begast wurde.

Tabelle 16 listet die Einzelkanalparameter von $\text{Ca}_v3.2$ unter Begasung mit Kontrollgas und mit 80%igem N₂O und die dazu gehörenden Irrtumswahrscheinlichkeiten auf; $n = 6$, -50/-20mV.

| Ca_v3.2 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche [n] |
|--------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|-------------------------|
| Kontrollgas | -47,9 ± 16,3 | 71 ± 13 | 8,9 ± 2,7 | 1,0 ± 0,09 | -0,46 ± 0,01 | 0,33 ± 0,05 | 6 |
| 80% N ₂ O | -22,2 ± 7,4 | 51 ± 13 | 3,0 ± 0,7 | 0,7 ± 0,13 | -0,45 ± 0,02 | 0,28 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,1 | < 0,05 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | |

Abbildung 27 zeigt die Einzelkanalparameter des langsamen und schnellen Schaltverhaltens von Cav3.2, gehalten bei -50 mV und gepulst auf -20 mV. Die linken Werte wurden unter Kontrollgas, die rechten unter 80 % Lachgas aufgenommen. Es ist deutlich zu erkennen, dass obwohl im gepaarten t-Test nur die Verfügbarkeit (unten) signifikant unterschiedlich war ($p < 0,05$) auch die Verweildauer τ und die mittlere Offenwahrscheinlichkeit (nächste Seite) unter Lachgas erheblich reduziert wurden. Insofern lässt sich im Vergleich zu den Ergebnissen unter 100 %igem Lachgas festhalten, dass es sich bei der Inhibition von Cav3.2 nicht um einen hypoxischen Effekt, vielmehr nur um einen spezifischen Substanzeffekt handeln kann.





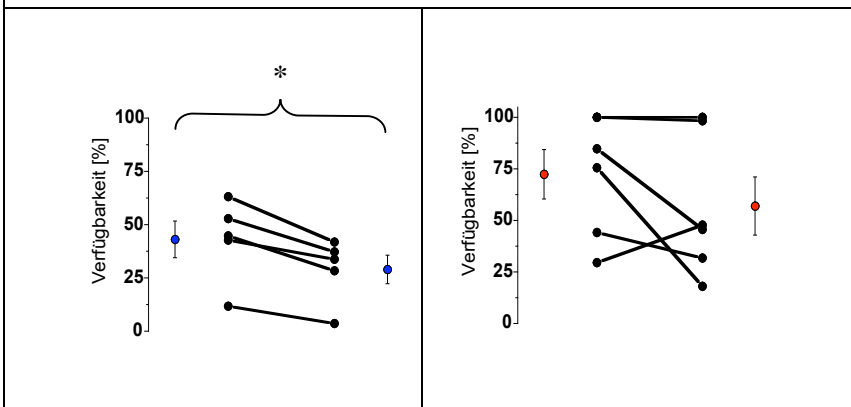
3.3 Vermessung der transient transfizierten HEK-293-Zellen

3.3.1 $\text{Ca}_v3.1$ und $\text{Ca}_v3.2$ transient transfiziert

Es wurde der Effekt von 100%igem und 80%igem Lachgas auf einzelne rekombinante, transient transfizierte $\text{Ca}_v3.1$ und $\text{Ca}_v3.2$ untersucht. Hierbei wählte man als Haltepotential neben -90 mV auch -50 mV , um dadurch einen Hemmeffekt auf Kanäle im inaktiven Zustand mitzuerfassen. 80%iges N_2O wählte man trotz des hohen Anschaffungspreises, um in wenigen Experimenten zu zeigen, dass die erzielten Effekte nicht auf Hypoxie zurückzuführen waren.

3.3.1.1 $\text{Ca}_v3.1$ und $\text{Ca}_v3.2$ unter 100% N_2O und $V_H = -90 \text{ mV}$

Abbildung 28 zeigt den Einfluß von 100 %igem N_2O auf das langsame und schnelle Schaltverhalten von transient transfizierten $\text{Ca}_v3.1$ (links) und transient transfizierten $\text{Ca}_v3.2$ (rechts). Im Falle von $\text{Ca}_v3.1$ reduziert sich die Verfügbarkeit signifikant, im Falle von $\text{Ca}_v3.2$ die Verweildauer τ .



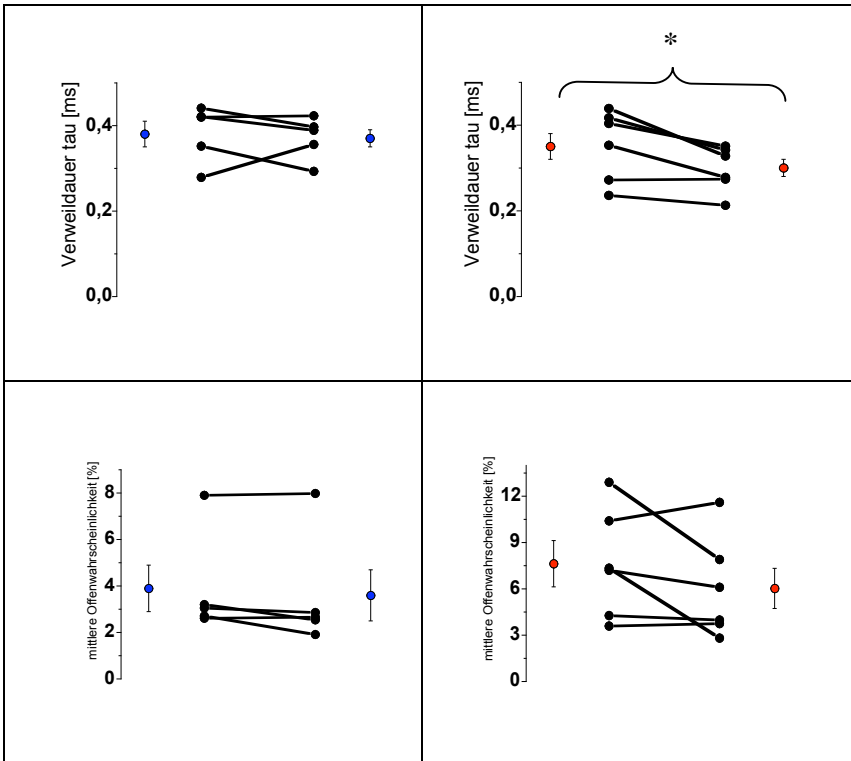


Tabelle 17 stellt zusammengefasst die Einzelkanalparameter von Ca_v3.1 ohne Begasung und unter 100%iger N₂O-Begasung dar (Pulsprotokoll -90 mV/-20 mV).

| Ca _v 3.1 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -25,7 ± 5,4 | 43,0 ± 8,6 | 3,9 ± 1,0 | 0,76 ± 0,12 | -0,53 ± 0,02 | 0,38 ± 0,03 | 5 |
| 100 % N ₂ O | -22,2 ± 7,3 | 28,9 ± 6,7 | 3,6 ± 1,1 | 0,60 ± 0,04 | -0,49 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,2 | < 0,01 | 0,2 | 0,1 | < 0,05 | 0,7 | |

Tabelle 18 stellt zusammengefasst die Einzelkanalparameter von $\text{Ca}_v3.2$ ohne Begasung und unter 100%iger N_2O -Begasung dar (Pulsprotokoll $-90 \text{ mV}/-20 \text{ mV}$).

| $\text{Ca}_v3.2$ | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|----------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------|
| ohne Gas | $-40,8 \pm 6,8$ | $72,3 \pm 12,0$ | $7,6 \pm 1,5$ | $1,34 \pm 0,31$ | $-0,58 \pm 0,05$ | $0,35 \pm 0,03$ | 6 |
| 100 % N_2O | $-21,7 \pm 5,4$ | $56,9 \pm 14,1$ | $6,0 \pm 1,3$ | $1,06 \pm 0,27$ | $-0,60 \pm 0,03$ | $0,30 \pm 0,02$ | |
| p-Wert | $< 0,05$ | 0,2 | 0,2 | $< 0,05$ | 0,6 | $< 0,05$ | |

3.3.1.2 $\text{Ca}_v3.1$ und $\text{Ca}_v3.2$ unter 80% N_2O und $V_H = -90 \text{ mV}$

Abbildung 29 (nächste Seite) zeigt den Einfluß von 80 %igem N_2O auf das langsame und schnelle Schaltverhalten von transient transfizierten $\text{Ca}_v3.1$ (links) und transient transfizierten $\text{Ca}_v3.2$ (rechts). Die signifikante Abnahme der Verweildauer τ im Falle von $\text{Ca}_v3.2$ spricht für eine schnelle Interaktion von Substanz und Kanal. Im Gegensatz zu den Versuchen mit 100%igem N_2O ergab sich für $\text{Ca}_v3.1$ keine signifikante Abnahme der Verfügbarkeit.

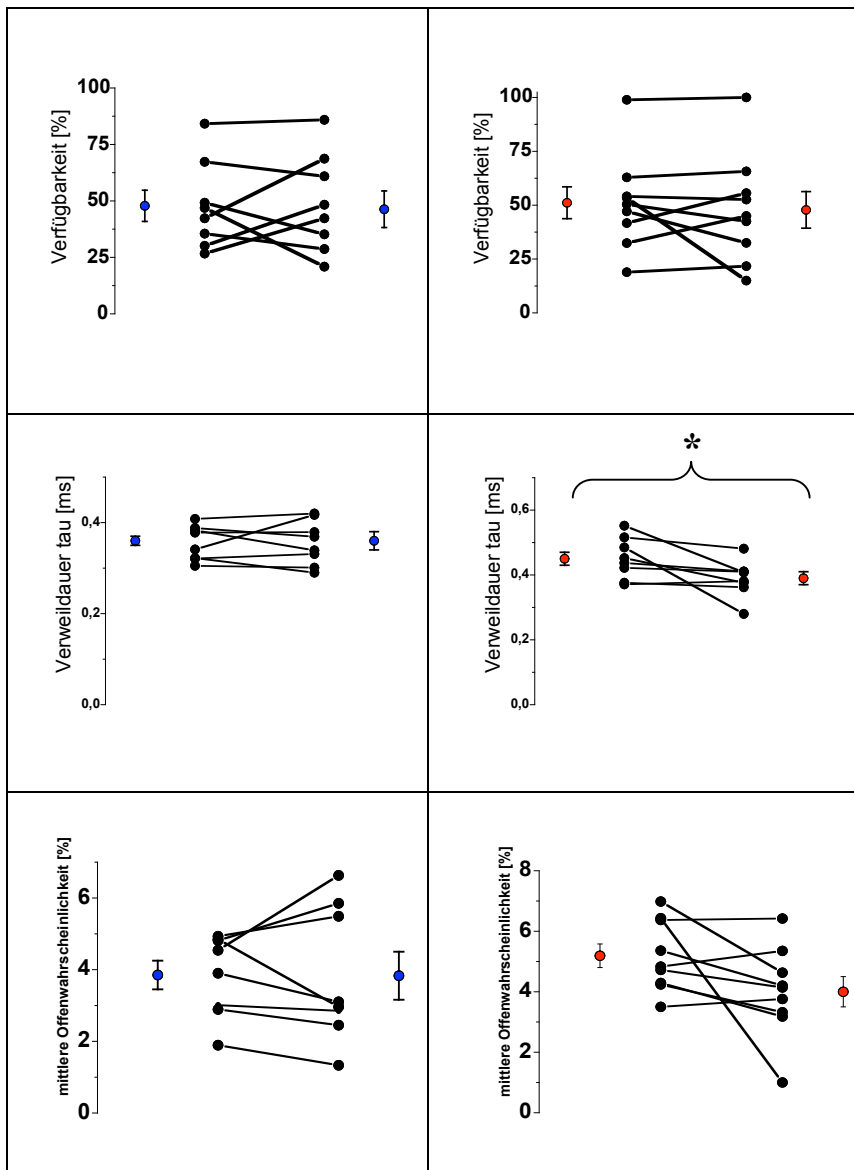


Tabelle 19 enthält die Einzelkanalparameter von transient transfizierten Ca_v3.1, zunächst ohne Begasung und dann unter 80 %igem N₂O, Pulsprotokoll -90 mV/-20 mV.

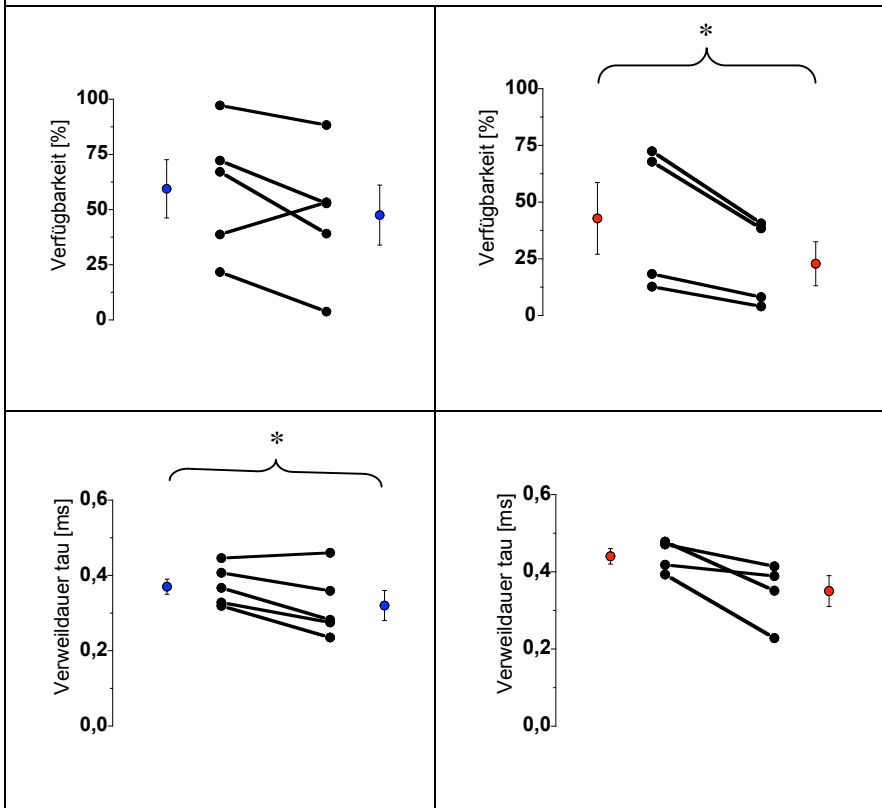
| Ca _v 3.1 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -20,0 ± 4,6 | 47,8 ± 6,9 | 3,9 ± 0,4 | 0,79 ± 0,1 | -0,55 ± 0,02 | 0,36 ± 0,01 | 8 |
| 80 % N ₂ O | -24,4 ± 6,2 | 46,3 ± 8,1 | 3,8 ± 0,7 | 0,66 ± 0,04 | -0,55 ± 0,02 | 0,36 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,4 | 0,8 | 0,9 | 0,1 | 0,9 | 1 | |

Tabelle 20 enthält die Einzelkanalparameter von transient transfizierten Ca_v3.2, zunächst ohne Begasung und dann unter 80 %igem N₂O, Pulsprotokoll -90 mV/-20 mV.

| Ca _v 3.2 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -31,9 ± 10,0 | 51,1 ± 7,4 | 5,2 ± 0,4 | 1,12 ± 0,1 | -0,54 ± 0,02 | 0,45 ± 0,02 | 9 |
| 80 % N ₂ O | -35,9 ± 14,8 | 47,8 ± 8,5 | 4,0 ± 0,5 | 0,87 ± 0,1 | -0,53 ± 0,02 | 0,39 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,6 | 0,6 | 0,1 | < 0,01 | 0,5 | < 0,05 | |

3.3.1.3 $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ unter 100 % N_2O und $V_H = -50$ mV

Abbildung 30 zeigt den Einfluß von 100 %igem N_2O auf das langsame und schnelle Schaltverhalten von transient transfizierten $Ca_v3.1$ (linke Spalte) und transient transfizierten $Ca_v3.2$ (rechte Spalte), wenn von einem Haltepotential von -50 mV ausgehend auf -20 mV Testpotential gepulst wird. Die jeweils linken Werte repräsentieren die gemessenen Werte ohne Begasung, die jeweils rechten Werte diejenigen unter Lachgas-Begasung. Die farbige dargestellten Messpunkte geben die Mittelwerte mit Standardfehler wieder. Lachgas reduziert die Verweildauer τ von $Ca_v3.1$ signifikant und von $Ca_v3.2$ nur knapp nicht signifikant. Im Falle von $Ca_v3.2$ reduziert N_2O auch die Verfügbarkeit, bewirkt also neben einer Reduktion des schnellen auch eine Abnahme des langsamen Schaltverhaltens. Lachgas weist damit erneut eine duale Wirkkinetik für $Ca_v3.2$ auf.



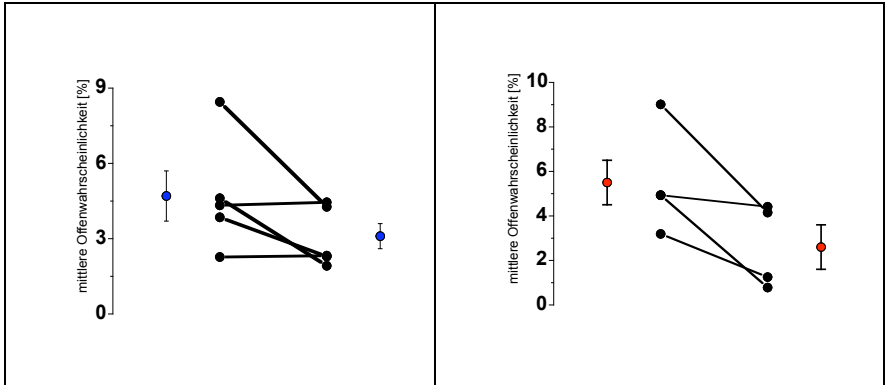


Tabelle 21 enthält die Einzelkanalparameter von Cav3.1, transient transfiziert, Pulsprotokoll -50 mV/-20 mV im Vergleich ohne Begasung und unter Begasung mit 100 %igem N₂O.

| Cav3.1 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -30,4 ± 12,1 | 59,4 ± 13,2 | 4,7 ± 1,0 | 0,82 ± 0,07 | -0,54 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | 5 |
| 100 % N ₂ O | -25,5 ± 12,4 | 47,5 ± 13,6 | 3,1 ± 0,5 | 0,55 ± 0,05 | -0,48 ± 0,01 | 0,32 ± 0,04 | |
| p-Wert | 0,2 | 0,2 | 0,1 | < 0,01 | < 0,05 | < 0,05 | |

Tabelle 22 enthält die Einzelkanalparameter von Ca_v3.2, transient transfiziert, Pulsprotokoll -50 mV/-20 mV im Vergleich ohne Begasung und unter Begasung mit 100 %igem N₂O.

| Ca _v 3.2 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -26,1 ± 10,8 | 42,8 ± 15,8 | 5,5 ± 1,2 | 1,07 ± 0,1 | -0,51 ± 0,01 | 0,44 ± 0,02 | 4 |
| 100 % N ₂ O | -15,4 ± 6,9 | 22,8 ± 9,7 | 2,6 ± 1,0 | 0,63 ± 0,1 | -0,49 ± 0,02 | 0,35 ± 0,04 | |
| p-Wert | 0,3 | < 0,05 | 0,1 | < 0,05 | 0,5 | 0,06 | |

3.3.1.4 Ca_v3.1 und Ca_v3.2 unter 80 % N₂O und V_H = -50 mV

Abbildung 31 (nächste Seite) zeigt die Einzelkanalparameter des langsamen und schnellen Schaltverhaltens von Ca_v3.1 (linke Spalten) und Ca_v3.2 (rechte Spalten) ohne Begasung (linke Werte) und unter Lachgas-Begasung (rechte Werte). Die farbigen Werte stellen die Mittelwerte mit Standardfehler dar. Im Falle von Ca_v3.1 reduzierte sich unter Lachgas die mittlere Offenwahrscheinlichkeit signifikant. Im Falle von Ca_v3.2 reduzierte sich wie schon unter 100%igem Lachgas die Verfügbarkeit signifikant.

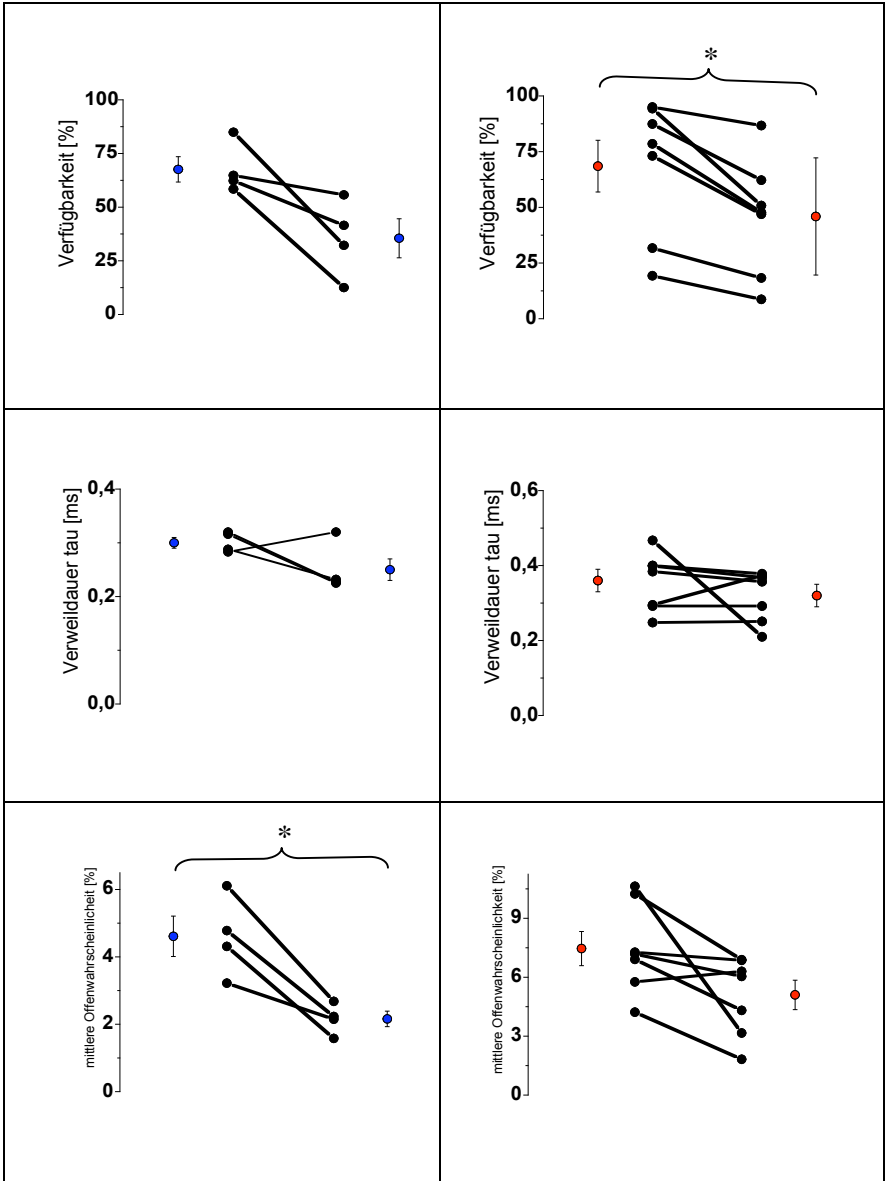


Tabelle 23: Aufgelistet werden die Einzelkanalparameter von Ca_v3.1 ohne Begasung und unter 80% N₂O-Applikation bei einem inaktivierenden Pulsprotokoll von -50/-20 mV und unter Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit.

| Ca _v 3.1 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -31,0 ± 8,3 | 67,6 ± 5,9 | 4,6 ± 0,6 | 0,88 ± 0,17 | -0,55 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 | 4 |
| 80 % N ₂ O | -11,4 ± 2,7 | 35,5 ± 9,1 | 2,2 ± 0,2 | 0,54 ± 0,04 | -0,52 ± 0,02 | 0,25 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,1 | 0,052 | < 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | |

Tabelle 24: Aufgelistet werden die Einzelkanalparameter von Ca_v3.2 ohne Begasung und unter 80% N₂O-Applikation bei einem inaktivierenden Pulsprotokoll von -50/-20 mV und unter Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit.

| Ca _v 3.2 | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanal-amplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|---------------------|
| ohne Gas | -40,5 ± 9,4 | 68,5 ± 11,6 | 7,5 ± 0,9 | 1,31 ± 0,1 | -0,50 ± 0,01 | 0,36 ± 0,03 | 7 |
| 80 % N ₂ O | -23,8 ± 5,3 | 45,9 ± 26,2 | 5,1 ± 0,8 | 0,89 ± 0,1 | -0,49 ± 0,02 | 0,32 ± 0,03 | |
| p-Wert | < 0,05 | < 0,01 | 0,051 | < 0,05 | 0,8 | 0,4 | |

3.3.2 Konstrukte

3.3.2.1. Identifikation der plasmidischen Konstrukte

3.3.2.1.1 Identifikation von Konstrukt I (GGHH: Domäne_{I, II} von Cav3.1+Domäne_{III, IV} von Cav3.2)

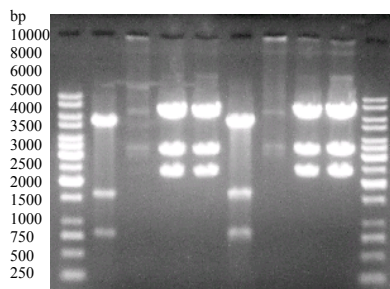
Abbildung 32: Gelfoto zur Identifikation von Konstrukt I nach Plasmidvermehrung und –aufreinigung: links und rechts wurde jeweils der 1 kb-Marker aufgetragen. Rechts vom Marker wurden in folgender Reihenfolge die Geltaschen beladen: Cav3.2 BamHI-verdaut, Cav3.1 BamHI-verdaut, zweimal Konstrukt I BamHI-verdaut, dann alle Proben noch ein zweites Mal in derselben Reihenfolge.

BamHI schneidet Cav3.2 (AF051946, 7768 bp) an folgenden Positionen: zweimal im Polylinker und an den Positionen 729 und 6184. Daraus ergeben sich folgende zu erwartende Banden: Banden mit 729 bp, 1584 bp, 5411 bp und 5455 bp.

BamHI schneidet Cav3.1 (AF190860, 7349 bp) an folgenden Positionen: 560, 3863, 6858. Daraus ergeben sich folgende Banden: Banden mit 2995 bp, 3303 bp und 6462 bp.

BamHI schneidet Konstrukt I an folgenden Positionen: 560, 3863 und 6184. Daraus ergeben sich folgende Banden: Banden mit 2321 bp, 3303 bp und 7555 bp.

Alle zu erwartenden Banden konnten im Identifikationsgel nachgewiesen werden.



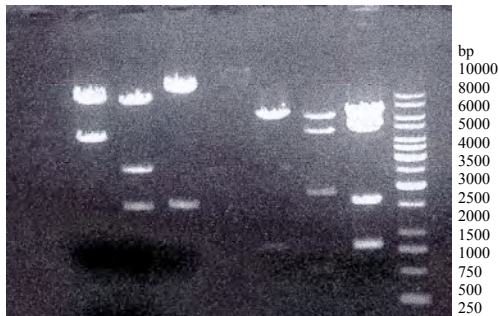
3.3.2.1.2 Identifikation von Konstrukt II (HHGG: Domäne_{I, II} von Cav_{3.2}+Domäne_{III, IV} von Cav_{3.1})

Abbildung 33: Das Gelfoto zeigt für das Konstrukt II den HindIII- und den BamHI-Verdau: die erste Spalte von links enthält die Banden des HindIII-verdauten Konstrukt II, die vierte Spalte von links die Bande des BamHI verdauten Konstrukt II. Ganz rechts wurde der 1kb-Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen aufgetragen.

HindIII schneidet Konstrukt II nach der Restriktionskarte einmal vorne im Polylinker und einmal im Verbindungsstück zwischen Domäne II von Cav_{3.2} und Domäne III von Cav_{3.1}. Es ergeben sich zwei zu erwartende Banden bei ca. 4000 bp und 9000 bp.

BamHI schneidet Konstrukt II an folgenden Positionen: 729, 7136 und einmal vorne im Polylinker. Daraus ergeben sich folgende zu erwartende Banden: 729 bp, 5817 bp und 6407 bp.

Zwar konnten für den BamHI-Verdau nicht alle zu erwartenden Banden im Gel nachgewiesen werden, dafür aber alle für den HindIII-Verdau. Das Konstrukt II kann damit ebenfalls als identifiziert gelten.



3.3.2.2 Vermessung der plasmidischen Konstrukte

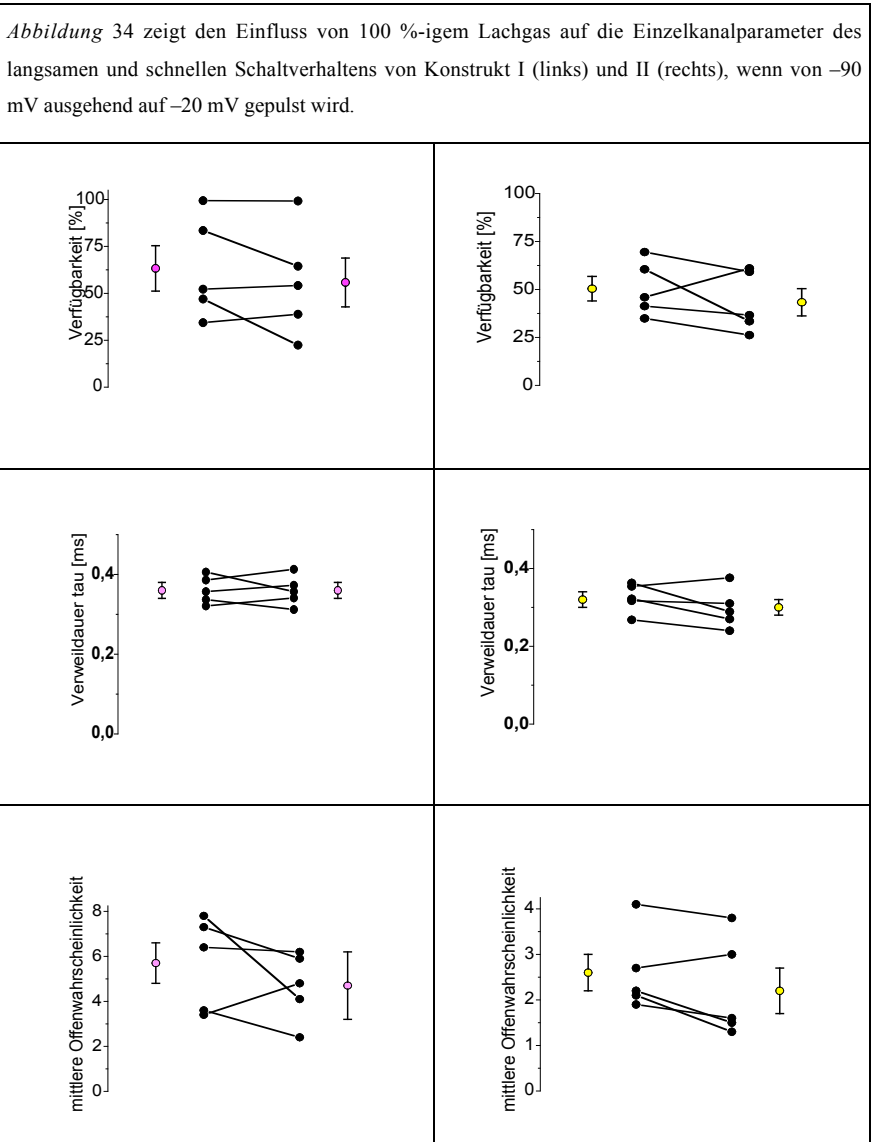


Table 25 gibt die Ergebnisse von fünf Versuchen zu Konstrukt I wider. Zwar nahmen alle Einzelkanalparameter des langsamen (Verfügbarkeit), schnellen (Verweildauer und mittlere Offenwahrscheinlichkeit) und sehr schnellen (Einzelkanalamplitude) Schaltverhaltens ab, jedoch waren die Unterschiede im gepaarten t-Test in keinem Fall signifikant.

| Konstrukt I | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanalamplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------|---------------------|
| Kontrollgas | -32,3 ± 7,4 | 59,8 ± 9,8 | 5,7 ± 0,9 | 0,94 ± 0,16 | -0,59 ± 0,03 | 0,36 ± 0,02 | 5 |
| 100% N ₂ O | -24,3 ± 4,4 | 52 ± 10 | 4,7 ± 1,5 | 0,79 ± 0,1 | -0,55 ± 0,04 | 0,36 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,9 | |

Table 26 gibt die Ergebnisse von fünf Versuchen zu Konstrukt II wider. Zwar nahmen die Einzelkanalparameter des langsamen (Verfügbarkeit) und schnellen (Verweildauer und mittlere Offenwahrscheinlichkeit) Schaltverhaltens ab, jedoch nicht signifikant und nur gering ausgeprägt. Der Parameter des sehr schnellen Schaltverhaltens (Amplitude) veränderte sich nicht, so dass eine derartige Interaktion von N₂O mit Konstrukt II auszuschließen ist.

| Konstrukt II | Summenstrom [fA] | Verfügbarkeit [%] | Offenwahrscheinlichkeit [%] | Mittlere Offenzeit [ms] | Einzelkanalamplitude [pA] | τ [ms] | Anzahl der Versuche |
|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------|---------------------|
| Kontrollgas | -22 ± 4,0 | 50,4 ± 6,4 | 2,6 ± 0,4 | 0,69 ± 0,09 | -0,56 ± 0,02 | 0,32 ± 0,02 | 5 |
| 100% N ₂ O | -21 ± 2,9 | 43,3 ± 7,1 | 2,2 ± 0,5 | 0,62 ± 0,13 | -0,56 ± 0,03 | 0,30 ± 0,02 | |
| p-Wert | 0,8 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,9 | 0,1 | |

4. Diskussion

4.1 Gaschromatographische Bestimmung

In einer Vorarbeit von Todorovic und Mitarbeitern war eine Lachgaskonzentrationsbestimmung ausgeblieben (Todorovic S. M. et al., 2001a), was angesichts einer gaschromatographischen N₂O-Bestimmungsmethode im US-amerikanischen Arzneibuch (USP XXII) unverständlich ist. Todorovic war davon ausgegangen, dass 80-%iges N₂O einen maximalen Hemmeffekt erzielt und hatte von 80% ausgehend die Lösungen mit Extrazellulärflüssigkeit verdünnt. Er hat damit lediglich Effektrelationen aufgestellt, aber keine Angabe zu N₂O-Konzentrationen gemacht. Zum Erhalt der 80 %-igen Ausgangslösung war die Badlösung 30 Minuten lang mit N₂O begast und dann innerhalb von 60 Minuten verwendet worden. Insofern lassen sich seine Daten nicht unmittelbar mit den hier aufgestellten vergleichen, da im vorliegenden Projekt eine direkte Substanzanflutung während der Patch-Clamp-Messung von mindestens acht Minuten abgewartet wurde, bevor die auszuwertende Datenerhebung erfolgte.

4.2 Gaschromatographische Auswertung

Die Auswertung der Gaschromatogramme war trotz naturgemäß auftretender CO₂-Peaks zulässig, da zwischen den Peaks eine Basislinientrennung möglich war. Hierfür wurde die Auflösung R berechnet, deren Wert von ca. 1,9 den geforderten Wert von 1,4 deutlich überschritt. Damit war ausreichende Auflösung gegeben. Die Heranziehung der Peakhöhe als Maßstab für die Substanzmenge war ebenfalls zulässig, da die berechnete Peaksymmetrie mit einem Wert von 1, wie vom Deutschen Arzneibuch gefordert, zwischen den Werten 0,8 und 1,2 lag. Da Lachgas schwerer als Umgebungsluft ist ($\varphi_{\text{N}_2\text{O}} \cong 1,9$, $\varphi_{\text{Luft}} \cong 1,2$), ist davon auszugehen, dass es sich bei der gewählten Applikationsart

über einen Glastrichter, der über dem Messgefäß positioniert war, an der Flüssigkeitsoberfläche anreichtete und dann über Verteilungsvorgänge in die Lösung diffundierte und zu den Zellen gelangte.

4.3 Quantitative N₂O-Bestimmung

Die gaschromatographische Bestimmung ergab, dass Konzentrationen bis maximal 1 mmol/l mit der angewendeten Applikationsart des Gravitationsflusses erreicht wurden. In der Literatur lässt sich ein Konzentrationswert von 20 mmol/l im Blut eines Patienten finden (Forth W. et al., 1992). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass dieser Wert nur unter Anwendung von Überdruck und dadurch erreichten 105 Volumenprozent N₂O gemessen werden konnte. Derartige Bedingungen sind klinisch nicht durchführbar und die so bestimmte Konzentration nur als realistisch nicht erreichbarer Maximalwert für klinische Konzentrationen zu betrachten. Bei der Durchführung von Narkosen unter Anwendung von Inhalationsnarkotika macht der sogenannte MAC-Wert Angaben über die narkotische Potenz einer Substanz. Die minimale alveoläre Konzentration (MAC-Wert) ist definitionsgemäß die Konzentration eines Inhalationsnarkotikums in der Atemluft eines Patienten, bei der 50 % aller Patienten auf einen definierten Schmerzreiz nicht mehr mit Abwehrreaktionen reagieren (Forth W. et al., 1992). Der MAC-Wert kann als Partialdruck oder als Volumenanteil angegeben werden. In der Literatur lässt sich auf der einen Seite ein Lachgas-MAC-Wert von $1,04 \pm 0,1$ atm finden, was darauf hinweist, dass bereits unter atmosphärischen Druckverhältnissen minimale alveoläre Konzentrationen (MAC) erreicht werden (Hornbein T. F. et al., 1982). Andere fanden im Tierversuch allerdings wesentlich höhere MAC-Werte, für die demnach atmosphärische Druckverhältnisse nicht ausreichten, folglich mit Überdruck gearbeitet werden musste (Gonsowski C. T./Eger E. I., 1994). Die oben genannten 105 Volumenprozent finden sich in der Literatur auch an anderer Stelle als MAC-Wert von Lachgas wieder (Lüllman/Mohr, 2006). Zusammengenommen belegt dies, dass sich mit Lachgas allein zwar eine ausgeprägte Analgesie/Schmerzhemmung, nicht jedoch eine Anästhesie/Narkose durchführen lässt. Die im vorliegenden Projekt ausschließlich

interessierende ausgeprägte analgetische Potenz von N₂O lässt sich bereits mit geringen Lachgas-Dosen von ca. 30 Vol.-% erreichen. 20 Vol.-% sollen in ihrer Wirkstärke 15 mg Morphin entsprechen (Lüllmann/Mohr, 2006). Auch die Tatsache, dass messbare Effekte unter der angewendeten Methode beobachtet wurden, spricht letztendlich dafür, dass die Substanz für eine analgetische Wirkung in ausreichender Konzentration die Zellen erreichte.

4.4 Hypoxie

Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den registrierten Effekten auf das Einzelkanalschaltverhalten um rein hypoxische Effekte handelte, da regelmäßig zu den relevanten Pulsprotokollen Referenzdaten mit 80 % N₂O und 20 % Sauerstoff erhoben wurden und diese zwar nicht im selben Ausmaß aber doch tendenziell dieselben reduktiven Einflüsse belegten.

4.5 „whole-cell-artige“ Ströme im stabilen Expressionssystem

Die stabil transfizierten HEK-Zellen brachten aufgrund der hohen Expressionsdichte der Kanäle bei Anwendung eines Pulsprotokolls von -90 mV auf -20 mV, bei dem grundsätzlich alle Kanäle aktivierbar vorliegen, in der cell-attached-Konfiguration „whole-cell-artige“ Ströme hervor. Im Falle von Ca_v3.2 wurde der Spitzenstrom unter Lachgas halbiert, im Falle von Ca_v3.1 um ein Drittel und im Falle von Ca_v3.3 um ein Viertel reduziert. Todorovic und Mitarbeiter fanden in whole-cell Messungen für Ca_v3.2 eine durch Lachgas ausgelöste Blockade von maximal 45 % des Ausgangsstromwertes und für Ca_v3.1 eine nur marginale Blockade der Stromantwort (Todorovic S. M. et al., 2001a). Joksovic und Mitarbeiter fanden für Ca_v3.3 in whole-cell Messungen eine Blockade durch N₂O von 8 ± 2% des maximalen Ausgangsstromwertes (Joksovic et al., 2005). Es bleibt darauf hinzuweisen, dass sowohl der Ca_v3.1-Klon, der Todorovic zur Verfügung stand, als auch der Ca_v3.3-Klon, den Joksovic verwandte, jeweils von der

Ratte stammte, wohingegen in der vorliegenden Arbeit alle stabilen HEK-Zelllinien humane T-Typ-Calcium-Kanäle enthielten. Insofern scheinen die humanen Varianten empfindlicher auf N_2O zu reagieren. Für $Ca_v3.1$ ist eine Sequenzhomologie von 90-95 %, für $Ca_v3.3$ eine von 85-90 % zwischen fünf verschiedenen Spezies (hierunter die humane und die der Ratte) beschrieben worden (Perez-Reyes E., 2006). Auch wenn dies einen hohen Konservierungsgrad für $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.3$ zwischen den beiden Spezies Mensch und Ratte belegt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber Lachgas hierauf zurückzuführen sind. Darüber hinaus waren die Spitzenstromausgangswerte in den whole-cell Messungen von Todorovic bezüglich $Ca_v3.1$ um ein Vielfaches höher (ca. -400 bis -1000 pA) als in der vorliegenden Arbeit (-3 bis -30 pA). Die Ergebnisse zu $Ca_v3.2$ bestätigen die Ergebnisse von Todorovic. Bei Todorovic war der Effekt auf $Ca_v3.2$ vollständig und schnell reversibel. In der vorliegenden Arbeit deutete sich zwar eine Reversibilität an, war jedoch nicht innerhalb desselben Zeitrahmens vollständig. Eine schnelle und vollständige Reversibilität entspricht eher den Erwartungen, da klinisch Lachgas aufgrund seines hohen Partialdrucks sehr schnell an- und abflutet. Da aber in der cell-attached-Konfiguration die Substanz ohnehin die Zellmembran passieren und von intrazellulär die Kanäle inhibieren muss, ist durchaus auch eine verzögerte Reversibilität vorstellbar. Denn wird die Gaszufuhr gestoppt, ist der Lachgas-Konzentrationsgradient zwischen Extra- und Intrazellulärraum geringer als zu Beginn der Gaszufuhr. Noch in der Badlösung befindliches N_2O bremsst die Diffusion aus der Zelle heraus ab. Um diesen Effekt zu verringern, war in den ersten Versuchen mit den stabilen HEK-Zellen ein Kontrollgas, bestehend aus 80 % Stickstoff und 20 % Sauerstoff zum Ausgasen verwendet worden. In den späteren Versuchen mit den transienten HEK-Zellen war die Verwendung des Kontrollgases nicht mehr möglich, da das Manometer zur Einstellung der Flussrate für die Gaszufuhr mit 80 %igem Lachgas benötigt wurde und die Anschaffung eines zweiten Manometers einen erheblichen zusätzlichen Kostenaufwand bedeutet hätte. Da sich in den bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten kein Unterschied zwischen der Verwendung des Kontrollgases und dem Verzicht auf dieses gezeigt hatte, wurde beim weiteren Vorgang auf die Verwendung des Kontrollgases verzichtet. Daneben könnte ebenfalls eine irreversible Hemmung der Ca_v3 durch

Lachgas, die sich in einer auch über längere Zeit bestehenden Blockade zeigen würde, vorliegen. Zumindest wird klinisch berichtet, dass mit Lachgas anästhesierte Patienten auf eine sehr angenehme Art aufwachen, ein analgetischer Effekt somit vielleicht über das Aufwachen hinaus länger bestehen bleibt.

4.6 Einzelkanalmessungen im stabilen Expressionssystem

Auf Einzelkanalebene ließ sich im stabilen Expressionssystem $Ca_v3.2$ nur untersuchen, wenn man sie bei -50 mV hielt und von diesem inaktivierenden Haltepotential ausgehend auf -20 mV pulste. Hier reduzierte sich in sechs Versuchen der mittlere Summenstrom, die Verfügbarkeit und die mittlere Offenzeit und Offenwahrscheinlichkeit signifikant. Der Wirkmechanismus wies dabei eine duale Kinetik auf: N_2O interagierte einmal langanhaltend im Sekundenbereich mit der Kanalpore und einmal schnell im Millisekundenbereich.

Um einen hypoxischen Effekt auszuschließen, wurden parallel Versuche mit 80%igem N_2O an stabilen $Ca_v3.2$, Pulsprotokoll -50 auf -20 mV, durchgeführt. Zwar ergab sich in diesen Versuchen mit $Ca_v3.2$ nur für den Einzelkanalparameter Verfügbarkeit eine signifikante Reduktion. Jedoch ließ sich in der graphischen Darstellung auch für die Verweildauer τ und für die mittlere Offenwahrscheinlichkeit eine deutliche Abnahme erkennen. Die geringere Ausprägung des Effektes kann nur auf die geringere Substanzmenge von 80 %-igem zu 100 %-igem N_2O zurückzuführen sein.

4.7 Einzelkanalmessungen im transienten Expressionssystem

Im weiteren Verlauf wurden $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, Konstrukt I (GGHH) und Konstrukt II (HHGG) transient transfiziert und unter sowohl 100 % als auch 80 % N_2O für beide Pulsprotokolle untersucht.

4.7.1 Einzelkanalparameter Verfügbarkeit

Unter Lachgas-Begasung nahm der Einzelkanalparameter des langsamen Schaltverhaltens, die Verfügbarkeit, durchgängig für die Kanäle $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ und für die Kanalchimären Konstrukt I (GGHH) und Konstrukt II (HHGG) ab. Das Ausmaß der Wirkung nahm tendenziell beim Wechsel von einem Haltepotenzial von -90 mV auf ein inaktivierendes Haltepotenzial von -50 mV zu. Ebenso war die Wirkung konzentrationsabhängig bei Verwendung von 100 %-igem Lachgas stärker ausgeprägt als bei Verwendung von 80%-igem N_2O . Eine Subtypselektivität für einen Kanal stellte sich nicht dar. Demgemäss ließ sich auch keine Zuordnung der Konstrukte zu den Subtypen vornehmen. Die Wirkung von Lachgas scheint für das langsame Schaltverhalten einen Gruppeneffekt aufzuweisen.

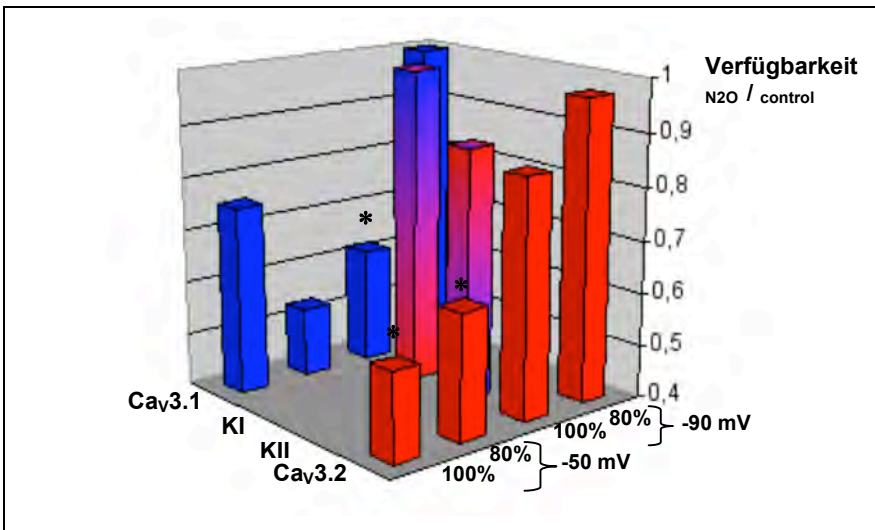


Abbildung 35: Synoptisch dargestellt wird der Rückgang der Verfügbarkeit unter Lachgas im Vergleich zu Kontrollbedingungen für die beiden T-Typ-Calcium-Kanäle $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ sowie für beide Konstrukte und für alle vier Versuchsbedingungen. Signifikante Abnahmen sind mit * gekennzeichnet.

4.7.2 Einzelkanalparameter mittlerer Spitzenstrom

Ausgenommen die Versuchsbedingungen -90 mV/80 % N_2O , nahm der mittlere Spitzenstrom durch Lachgas-Begasung bei $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ und bei beiden Konstrukten ab. Für die Versuchsbedingungen -90 mV/80 % N_2O nahm der mittlere Spitzenstrom bei $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ zu. Ähnliches hat man schon in Ganzzellmessungen von $Ca_v3.3$ gesehen. Joksovic und Mitarbeiter fanden bei der Applikation von geringen Dosen N_2O eine Zunahme des Ausgangsstromwertes rekombinanter $Ca_v3.3$ und unter Anwendung hoher Dosen N_2O eine Abnahme (Joksovic P. M. et al., 2005). Beim Wechsel auf ein inaktivierendes Haltepotential von -50 mV lässt sich diesmal keine Zunahme des Hemmeffektes verzeichnen. Auch das Ausmaß der Hemmung unterscheidet sich zwischen $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ unwesentlich, so dass hier erneut von einem Gruppeneffekt von Lachgas auf rekombinante T-Typ-Calcium-Kanäle auszugehen ist.

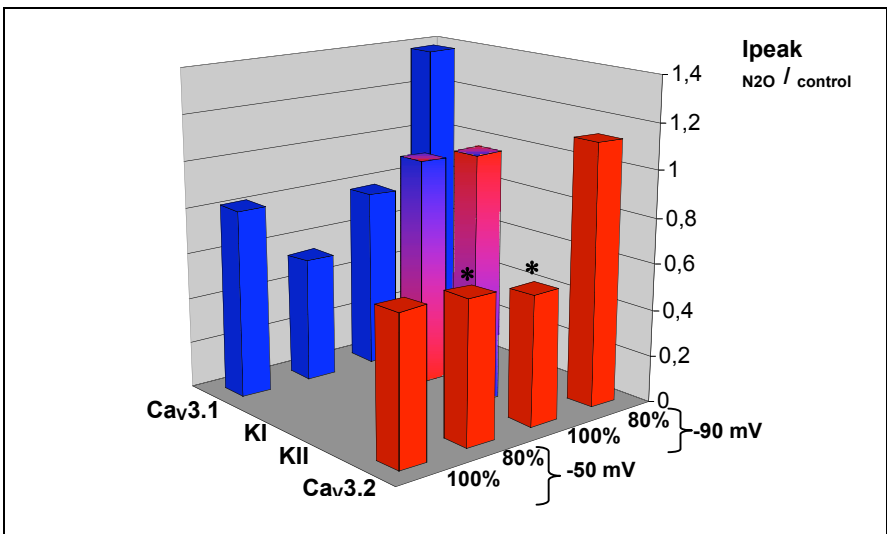


Abbildung 36: Synoptisch dargestellt wird der Rückgang des mittleren Spitzenstroms unter Lachgas-Begasung im Vergleich zu Kontrollbedingungen für $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ und beide Konstrukte und alle vier Versuchsbedingungen. Signifikante Abnahmen sind mit * gekennzeichnet.

4.7.3 Einzelkanalparameter Verweildauer Tau

Betrachtet man die Verweildauer, einen Einzelkanalparameter des schnellen Schaltverhaltens, so ergibt sich ein differenzierteres Bild. Wechselt man das Haltepotential von -90 mV auf -50 mV und vergrößert man die N_2O -Konzentration von 80% auf 100%, so verstärkt sich der Lachgas-Hemmeffekt wie auch schon beim Parameter Verfügbarkeit. Darüber hinaus ist der Effekt auf rekombinante $Ca_v3.2$ durchgängig stärker ausgeprägt als auf rekombinante $Ca_v3.1$. Es zeigt sich hier eine Subtypeselektivität bzw. -prävalenz zugunsten $Ca_v3.2$, welches auf N_2O empfindlicher reagiert. Auch ist der Unterschied zu Kontrollbedingungen bis auf die Versuchsbedingung -50 mV/80% N_2O signifikant. Betrachtet man die Konstrukte, so ähnelt der Effekt von Lachgas auf Konstrukt II dem auf $Ca_v3.2$, der Effekt auf Konstrukt I dem auf $Ca_v3.1$.

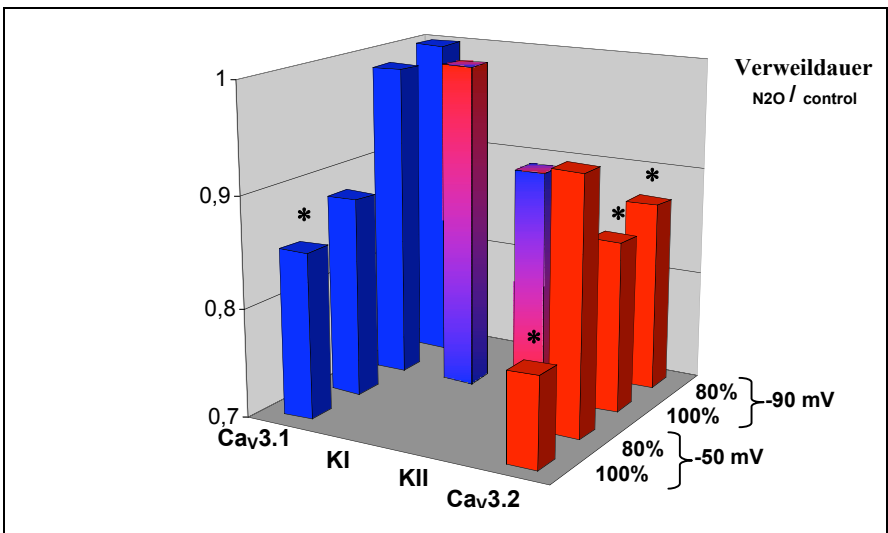


Abbildung 37: Synoptisch dargestellt wird der Rückgang der Verweildauer unter Lachgas für $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ und beide Konstrukte zu allen vier Versuchsgruppen. Signifikante Abnahmen sind mit * gekennzeichnet.

4.8 Ausblick

Damit lässt sich festhalten, dass N_2O die rekombinanten, humanen T-Typ-Calcium-Kanäle $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ kinetisch betrachtet dual hemmt: Verfügbarkeit und Verweildauer nehmen unter Lachgas-Einfluss ab. Die schnelle Interaktionskomponente ist für $Ca_v3.2$ stärker ausgeprägt als für $Ca_v3.1$. Nimmt man die Befunde der „whole-cell-artigen“ Ströme im stabilen Expressionssystem hinzu, ergibt sich für $Ca_v3.2$ eine subtypprävalente schnelle Blockade durch Lachgas. Diese Eigenschaften des lang etablierten inhalativen Anästhetikums Stickoxydul könnten seine analgetische Potenz, welche bis heute unverstanden bleibt, helfen aufzuklären. Die Unterschiede in den Ergebnissen zur Subtypselektivität anderer Arbeitsgruppen auf Ganzzelebene könnten darauf beruhen, dass diese mit Klonen der Ratte bei $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.3$ gearbeitet haben und die humanen Varianten, insbesondere von $Ca_v3.1$, auf Lachgas empfindlicher reagieren. Diese Hypothese ließe sich durch Ganzzellmessungen an den humanen Varianten bestätigen.

Um eine mögliche Bindungsstruktur von N_2O einzugrenzen, wurden Chimäre aus $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$, bei denen die Domänen I und II gegen die Domänen III und IV wechselseitig ausgetauscht vorlagen, transient transfiziert und elektrophysiologisch vermessen. Entscheidend für eine Zuordnung der Konstrukte zu den Subtypen $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ bleibt der Einzelkanalparameter Verweildauer. Konstrukt II reagiert empfindlicher als Konstrukt I. Nicht zuletzt die Tatsache, dass der $Ca_v3.1$ -Anteil in Konstrukt II (Domänen III und IV der Kanalpore) von einem Ratten-Klon stammt, welche in der Literatur bisher eher unempfindlich auf Lachgas reagiert haben, legt die Vermutung nahe, dass die Bindungsstelle von N_2O an humanen T-Typ-Calcium-Kanälen innerhalb der Domänen I und II der Kanalpore zu finden ist.

Das vorliegende Projekt belegt, dass sich Ergebnisse aus whole-cell Messungen nicht in demselben Maß auf Einzelkanalmessungen übertragen lassen bzw. dass für direkte Vergleichbarkeit dieselben Klone von derselben Spezies verwendet werden sollten. Die in der Summe der Kanäle beobachteten eindeutigen Effekte von Substanzen auf

Ionenkanäle können bei Beobachtung des einzelnen Kanals wesentlich weniger deutlich hervortreten.

Nach wie vor ist davon auszugehen, dass Lachgas seine analgetische Potenz durch eine Interaktion mit niedrigspannungsregulierten T-Typ-Calcium-Kanälen, insbesondere $Ca_v3.2$ bezieht. Inwiefern die Interaktion von N_2O mit $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.3$ die Analgesie unterstützt oder abmildert bleibt die offene Frage weiterer Forschungsarbeit.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die elektrophysiologische Frage geklärt werden, ob das altbewährte Inhalationsnarkotikum Distickstoffmonoxid rekombinante, humane, spannungsabhängige $Ca_v3.2$ T-Typ Calcium-Kanäle subtypspezifisch auf Einzelkanalebene hemmt. Eine solche Interaktion sollte im Hinblick auf Schaltverhalten und Eingrenzung einer möglichen Bindungsstruktur mit Hilfe rekombinanter Konstrukte aus den beiden Subtypen $Ca_v3.1$ und $Ca_v3.2$ spezifiziert werden.

Methodisch wurde zur quantitativen Analyse von Lachgas eine gaschromatographische Bestimmung gemäß dem US-amerikanischen Arzneibuch durchgeführt. Die Einzelkanaluntersuchungen wurden mittels der Patch-Clamp-Technik in der cell-attached-Konfiguration durchgeführt. Die gesammelten Daten wurden auf eine Änderung der Einzelkanalparameter des langsamen, schnellen und sehr schnellen Schaltverhaltens durch die Applikation des Narkosegases hin untersucht.

Im stabilen Expressionssystem erhielt man bei Anwendung eines Standardmembranhaltepotentials von -90 mV und einem Testpotential von -20 mV aufgrund extrem hoher Expressionsdichte der Kanäle ganzzellartige Ströme. Die Ausgangsstromspitzenwerte von $Ca_v3.1$ wurden um ein Drittel, die von $Ca_v3.2$ um die Hälfte und die von $Ca_v3.3$ um ein Viertel durch die Begasung reduziert. Bei Anwendung eines inaktivierenden Haltepotentials von -50 mV erhielt man für $Ca_v3.2$ diskriminierbare Einzelkanalereignisse, die unter 100- und 80%-igem Lachgas signifikant in ihrer Verfügbarkeit und ihrer mittleren Offenwahrscheinlichkeit gehemmt wurden.

Nach transientser Transfektion konnten auch bei Anwendung des Standardhaltepotentials von -90 mV (Testpotential jeweils -20 mV) Einzelkanaluntersuchungen durchgeführt werden. Einzelne, rekombinante $Ca_v3.2$, aber entgegen den Erwartungen auch einzelne, rekombinante $Ca_v3.1$ wurden unter beiden Lachgas-Konzentrationen in ihrem langsamen Schaltverhalten deutlich gehemmt. Der Effekt war auf beide Subtypen umso

ausgeprägter, wendete man erneut das inaktivierende Haltepotential von -50 mV an. Bezüglich des schnellen Schaltverhaltens ergab sich ein differenzierteres Bild. $\text{Ca}_v3.2$ wurden in der Verweildauer τ und in der mittleren Offenwahrscheinlichkeit in einem stärkeren Ausmaß gehemmt als $\text{Ca}_v3.1$. Insofern bestätigte sich die geforderte Subtypspezifität.

Zwei rekombinante Konstrukte zur Bindungsstrukturanalyse standen zur Verfügung und wurden bei einem Haltepotential von -90 mV und unter Anwendung von 100 % Stickoxydul elektrophysiologisch vermessen. Die Effekte auf das Unterscheidungsmerkmal Verweildauer τ ergaben, dass Konstrukt I sich eher wie $\text{Ca}_v3.1$ und Konstrukt II eher wie $\text{Ca}_v3.2$ verhielten. Da Konstrukt II Domäne I und II von $\text{Ca}_v3.2$ enthielt, legte das den Schluss nahe, dass eine Bindungsstruktur von Lachgas an $\text{Ca}_v3.2$ innerhalb der Domänen I und II in Zukunft zu suchen ist.

Die Arbeitshypothesen dieses Projektes wurden damit zum einen bestätigt, zum anderen eingeschränkt widerlegt. Es wurden unterschiedliche Ergebnisse im stabilen und transienten Expressionssystem gefunden. Das langsame Schaltverhalten sowohl von $\text{Ca}_v3.2$, aber auch von $\text{Ca}_v3.1$ wurde durch Lachgas verringert. Insofern kann für das langsame Schaltverhalten von einem Gruppeneffekt auf T-Typ-Calcium-Kanäle gesprochen werden. N_2O zeigte hier Effekte eines inactivated-state-blockers. Hingegen reduzierte Lachgas rekombinante, humane, einzelne $\text{Ca}_v3.2$ subtypspezifisch in ihrem schnellen Schaltverhalten. Es verkürzte mittlere Offenzeit und Verweildauer, zeigte damit Eigenschaften eines open-channel-blockers (Hille B., 2001). Distickstoffmonoxid ist das erste bekannte pharmakologische Werkzeug, das zwischen spannungsabhängigen T-Typ-Calcium-Kanälen zu unterscheiden vermag und dürfte damit für die (Schmerz-) Forschung der Zukunft Objekt zahlreicher, weiterführender Untersuchungen sein.

6. Literaturverzeichnis:

Altier C./Zamponi G. W. (2004)

Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-Type versus N-Type.

Trends in Pharmacological Sciences 25 (9): 465- 470

Barton M. E./Eberle E. L./Shannon H. E. (2005)

The anti-hyperalgesic effects of the T-type calcium channels blockers ethosuximide, trimethadione and mibefradil.

European journal of pharmacology 521 (1-3): 79-85

Bers D. M./Perez-Reyes E. (1999)

Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release.

Cardiovascular Research 42 (2): 339-360

Bezanilla F. (2000)

The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels.

Physiological Reviews 80: 555-592

Bezprozvanny I./Tsien R. W. (1995)

Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca²⁺ channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967).

Molecular Pharmacology 48 (3): 540-549

Block F./Habermeyer B. (2003)

Glutamatantagonisten bei neuropathischen Schmerzen.

Schmerz 17: 261-267

Bootman M. D./Collins T. J./Peppiatt C. M./Prothero L. S./MacKenzie L./De Smet P./Travers M./Tovey S. C./Seo J. T./Berridge M. J./Ciccolini F./Lipp P. (2001)

Calcium signalling – an overview.

Seminars in Cell & Developmental Biology 12 (1): 3-10

Bourinet E./Alloui A./Monteil A./Barrère C./Couette B./Poirot O./Pages A./McRory J./Snutch T. P./Eschalier A./Nargeot J. (2005)

Silencing of the $Ca_v3.2$ T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception.

The EMBO Journal 24: 315-324

Bourinet E./Zamponi G. W. (2005)

Voltage gated calcium channels as targets for analgesics.

Current topics in medicinal chemistry 5: 539-546

Campagna J. A./Miller K. W./Forman S. A. (2003)

Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics.

New England Journal of Medicine 348 (21): 2110-2124

Chemin J./Monteil A./Perez-Reyes E./Nargeot J./Lory P. (2001)

Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide.

The EMBO Journal 20 (24) : 7033-7040

Cribbs L. L./Lee J.-H./Yang J./Satin J./Daud A./Barclay J./Williamson M. P./Fox M./Rees M./Perez-Reyes E. (1998)

Cloning and Characterization of $\alpha 1H$ From Human Heart, a Member of the T-Type Ca^{2+} Channel Gene Family.

Circulation Research 83: 103-109

Cribbs L. L./Gomora J. C./Daud A. N./Lee J.-H./Perez-Reyes E. (2000)

Molecular cloning and functional expression of Ca_v3.1c, a T-type calcium channel from human brain.

FEBS letters 466: 54-58

Dickinson T./Lee K./Spanswick D./Munro F. E. (2003)

Leading the charge – pioneering treatments in the fight against neuropathic pain.

Trends in Pharmacological Sciences 24 (11): 555-557

Dogrul A./Zagli U./Tulunay F. C. (2002)

The role of T-type calcium channels in morphine analgesia, development of antinociceptor tolerance and dependence to morphine, and morphine abstinence syndrome.

Life science 71 (6): 725-734

Dogrul A./Gardell L. R./Ossipov M. H./Tulunay C./Lai J./Porreca F. (2003)

Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers.

Pain 105 (1-2): 159-168

Dubel S. J./Altier C./Chaumont S./Lory P./Bourinet E./Nargeot J. (2004)

Plasma membrane expression of T-type calcium channel α_1 subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits.

Journal of Biological Chemistry 279 (28): 29263-29269

Dworkin R. H./Corbin A. E./Young J. P./Sharma U./La Moreaux L./Bockbrader H./Garofalo E. A./Poole R.M. (2003)

Pregabalin for the treatment of postherpetic neuralgia.

Neurology 60: 1274-1283

Ertel E. A./Campbell K. P./Harpold M. M./Hofmann F./Mori Y./Perez-Reyes E./Schwartz A./Snutch T. P./Tanabe T./Birnbaumer L./Tsien R. W./Catterall W.A. (2000)

Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels.

Neuron 25: 533-535

Faddy S. C./Garlick S. R. (2005)

A systematic review of the safety of analgesia with 50% nitrous oxide: can lay responders use analgesic gases in the prehospital setting?

Emergency medicine journal 22 (12): 901-908

Fishbain D. (2000)

Evidence-based data on pain relief with antidepressants.

Annals of Medicine 32 (5): 305-316

Flatters S. J. L./Bennett G. J. (2004)

Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy.

Pain 109 (1-2): 150-161

Forth W./Henschler D./Rummel W./Starke K. (6. Auflage 1992)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, S. 232 ff.

Franks N. P./Lieb W. R. (1994)

Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia

Nature 367: 607-614

Furukawa T./Miura R./Honda M./Kamiya N./Mori Y./Nukada S. T. (2004)

Identification of R(-)-isomer of efonidipine as a selective blocker of T-type Ca²⁺ channels.

British Journal of Pharmacology 143: 1050-1057

Gomora J. C./Daud A. N./Weiergräber M./Perez-Reyes E. (2001)

Block of Cloned Human T-Type Calcium Channels by Succinimide Antiepileptic Drugs.
Molecular Pharmacology 60 (5): 1121-1132

Gomora J. C./Murbartián J./Arias J. M./Lee J.-H./Perez-Reyes E. (2002)

Cloning and expression of the human T-type channel Cav3.3: insights into prepulse facilitation.

Biophysical Journal 83:229-241

Gonsowski C. T./Eger E.I. 2nd (1994)

Nitrous oxide minimum alveolar anesthetic concentration in rats is greater than previously reported.

Anesthesia and Analgesia 79 (4): 710-712

Grasshoff C./Drexler B./Rudolph U./Antkowiak B. (2006)

Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects.

Current pharmaceutical design 12 (28): 3665-3679

Hamill O. P./Marty A./Neher E./Sakmann B./Sigworth F. J. (1981)

Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches

Pflügers Archive 391: 85-100

Hille B. (3. Auflage 2001)

Ion channels of excitable membranes, S. 503 ff.

Hornbein T. F./Eger E.I. 2nd /Winter P. M./Smith G./Wetstone D./Smith K. H. (1982)

The minimum alveolar concentration of nitrous oxide in man.

Anesthesia and Analgesia 61 (7): 553-556

Jevtovic-Todorovic V./Todorovic S. M./Mennerick S./Powell S./Dikranian K./Benshoff N./Zorumski C.F./Olney J. W. (1998)

Nitrous oxide (Laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin.
Nature Medicine 4: 460-463

Jiménez C./Bourinet E./Leuranguer V./Richard S./Snutch T. P./Nargeot J. (2000)

Determinants of voltage dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels.

Neuropharmacology 39 (1): 1-10

Joksovic P. M. /Brimelow B. C./Murbartián J./Perez-Reyes E./Todorovic S. M. (2005)

Contrasting anesthetic sensitivities of T-type Ca^{2+} channels of reticular thalamic neurons and recombinant $\text{Ca}_v3.3$ channels.

British Journal of Pharmacology 144: 59-70

Kim D./Park D./Choi S./Lee S./Sun M./Kim C./Shin H.-S. (2003)

Thalamic control of Visceral Nociception Mediated by T-Type Ca^{2+} channels.

Science 302: 117-119

Klugbauer N./Marais E./Hofmann F. (2003)

Calcium Channel $\alpha_2\delta$ Subunits: Differential Expression, Function, and Drug Binding.

Journal of Bioenergetics and Biomembranes 35 (6): 639-647

Kuga T./Sadoshima J./Tomoike H./Kanaide H./Akaike N./Nakamura M. (1990)

Actions of Ca^{2+} antagonists on two types of Ca^{2+} channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture.

Circulation research 67 (2): 469-480

Kulm A./Müller J./Schatton T./Stark H. (2004)

Neuropathischer Schmerz – Klassifizierungen und Behandlungsoptionen.
Pharmazeutische Zeitung 149 (42): 3642-3651

Kumar P. P./Stotz S. C./Paramashivappa R./Beedle A. M./Zamponi G. W./Rao A. S. (2002)

Synthesis and evaluation of a new class of Nifedipine analogs with T-type calcium channel blocking activity.

Molecular Pharmacology 61 (3): 649-658

Lacinová L. (2004)

Pharmacology of recombinant low-voltage activated calcium channels.

Current drug targets. CNS and neurological disorders 3 (2): 105-111

Lee J.-H./Gomora J. C./Cribbs L. L./Perez-Reyes E. (1999)

Nickel block of three cloned T-type Calcium channels: Low concentrations selectively block $\alpha 1H$.

Biophysical Journal 77 : 3034-3042

Lee J.-H./Daud A. N./Cribbs L. L./Lacerda A. E./Pereverzev A./Klößner U./Schneider T./Perez-Reyes E. (1999)

Cloning and Expression of a Novel Member of the Low Voltage-Activated T-Type Calcium Channel Family.

The Journal of Neuroscience 19 (6): 1912-1921

Lüllmann H./Mohr K./Hein L. (16. Auflage 2006)

Pharmakologie und Toxikologie, S. 352f.

Matthes J./Huber I./Haaf O./Antepohl W./Striessnig J./Herzig S. (2000)

Pharmacodynamic interaction between Mibefradil and other calcium channel blockers.

Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology 361: 578-583

Michels G./Matthes J./Handrock R./Kuchinke U./Groner F./Cribbs L. L./Pereverzev A./Schneider T./Perez-Reyes E./Herzig S. (2002)

Single-channel pharmacology of Mibefradil in human native T-type and recombinant Ca_v3.2 calcium channels.

Molecular Pharmacology 61: 682-694

Mishra S. K./Hermsmeyer (1994)

Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967.

Circulation Research 75: 144-148

Monteil A./Chemin J./Bourinet E./Menessier G./Lory P./Nargeot J. (2000)

Molecular and functional properties of the human alpha (1G) subunit that forms T-type calcium channels.

Journal of Biological Chemistry 275 (9): 6090-6100

Mullins M. E./Horowitz B. Z./Linden D. H. J./Smith G. W./Norton R. L./Stump J. (1998)

Life-Threatening Interaction of Mibefradil and β -Blockers with Dihydropyridine Calcium Channel Blockers.

JAMA 280 (2): 157-158

Nelson M. T./Joksovic P. M./Perez-Reyes E./Todorovic S. M. (2005)

Painful to a T.

The Journal of Neurosciences 25: 8766-8775

Nicholl D. S. T. (2. Auflage 2002)

Gentechnische Methoden, Spektrum-Verlag, S. 31f.

Nowycky M. C./Fox A. P./Tsien R. W. (1985)

Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity.

Nature 316: 440-443

Numberger M./Draguhn A. (1996)

Patch-Clamp-Technik, Spektrum-Verlag

Ophoff R. A./Terwindt G. M./Vergouwe M. N./van Eijk R./Oefner P. J./Hoffmann S. M. G. (1997)

Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4.

Cell 87: 543-552

Perez-Reyes E./Cribbs L. L./Daud A./Lacerda A. E./Barclay J./Williamson M. P./Fox M./Rees M./Lee J.-H. (1998)

Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel.

Nature 391 (6670): 896-900

Perez-Reyes E. (2003)

Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels.

Physiological Reviews 83: 117-161

Perez-Reyes E. (2006)

Molecular characterization of T-type calcium channels.

Cell Calcium 40: 89-96

Priest B./Kaczorowski G. J./Garcia M. L. (2006)

Ion channel modulators: new targets and new indications for old targets.

Current opinion in drug discovery & development 9 (5): 587-594

Rücker G./Neugebauer M./Willems G. (1992)

Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S. 240ff.

Saegusa H./Kurihara T./Zong S./Kazuno A./Matsuda Y./Han W./Toriyama H./Tanabe T. (2001)

Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca^{2+} channel.

The EMBO Journal 20 (10): 2349-2356

Schlingensiefel K.H./Platon J.

Eigenverantwortliche Marktücknahme von POSICOR, öffentlicher Brief der Hoffmann-La Roche AG vom 05.06. 1998.

Scholz J./C. J. Woolf (2002)

Can we conquer pain?

Nature Neuroscience 5: 1062-1067

Schröder F./Handrock R./Beuckelmann D./Hirt S./Hullin R./Priebe L./Schwinger R. H. G./Weil J./Herzig S. (1996)

Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle.

Circulation 98: 969-976

Scott D. A./Wright C. E./Angus J. A. (2002)

Actions of intrathecal ω -conotoxins CVID, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in the rat.

European Journal of Pharmacology 451 (3): 279-286

Smith M. T./Cabot P. J./Ross F. B./Robertson A. D./Lewis R.J. (2002)

The novel N-Type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices.

Pain 96: 119-127

Staats P. S./Yewarwood T./ Charapata S. G./Presley R. W./Wallace M. S./Byas-Smith M./Fisher R./Bryce D. A./Mangieri E. A./Luther R. R./Mayo M./McGuire D./Ellis D. (2004)

Intrathecal Ziconotide in the treatment of Refractory Pain in Patients with Cancer or AIDS.

JAMA 291 (1): 63-70

Steinberger M./Beyer A. (2005)

Tumorschmerzen – Diagnostik und Therapie

Deutsche Medizinische Wochenschrift 130: 1449-1456

Talley E. M./Cribbs L. L./Lee J.-H./Daud A./Perez-Reyes E./Bayliss D.A. (1999)

Differential Distribution of Three Members of a Gene Family Encoding Low Voltage-Activated (T-Type) Calcium Channels.

Journal of Neuroscience 19 (6) : 1895-1911

Todorovic S. M./Jevtovic-Todorovic V./Mennerick S./Perez-Reyes E./Zorumski C. F. (2001a)

Ca_v3.2 Channel is a Molecular Substrate for Inhibition of T-Type Calcium Currents in Rat Sensory Neurons by Nitrous Oxide.

Molecular Pharmacology 60 : 603-610

Todorovic S. M./Jevtovic-Todorovic V./Meyenburg A./Mennerick S./Perez-Reyes E./Romano C./Olney J. W./Zorumski C. F. (2001b)

Redox Modulation of T-Type Calcium Channels in Rat Peripheral Nociceptors.

Neuron 31 : 75-85

Todorovic S. M./Meyenburg A./Jevtovic-Todorovic V. (2002)

Mechanical and thermal aninociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker.

Brain Research 951 (2): 336-340

Todorovic S. M./Meyenburg A./Jevtovic-Todorovic V. (2004a)

Redox modulation of peripheral T-type Ca^{2+} channels in vivo: alteration of nerve injury-induced thermal hyperalgesia.

Pain 109 (3): 328-339

Todorovic S. M./Pathirathna S./Brimelow S. C./Jagodic M. M./Ko S.H./Jiang X./Nilsson K. R./Zorumski C. F./Covey D. F./Jevtovic-Todorovic V. (2004b)

5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca^{2+} channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. Molecular pharmacology 66 (5):1223-1235

Tytgat J./Vereecke J./Carmeliet E. (1996)

Mechanism of L- and T-type Ca^{2+} channel blockade by flunarizine in ventricular myocytes of the guinea-pig.

European journal of pharmacology 296 (2): 189-97

Vanegas G./Ripamonti C./Sbanotto A./De Conno F. (1998)

Side effects of morphine administration in cancer patients.

Cancer Nursin 21 (4): 289-297

Varadi G./Strobeck M./Koch S./Caglioti L./Zucchi C./Palyi G. (1999)

Molecular Elements of Ion Permeation and Selectivity within Calcium Channels. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 34 (3): 181-214

Welsby P. J./Wang H./Wolfe J. T./Colbran R. J./Johnson M. L./Barrett P. Q. (2003)

A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca^{2+} /Calmodulin-dependant kinase II.

The Journal of Neuroscience 23 (31): 10116-10121

Wiffen P./Collins S./ Mc Quay H./ Carroll D./ Jadad A./ Moore A. (2005)

Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain.

Cochrane Database of systematic reviews 2005 (2007 Issue 1), CD001133

Yamakura T./Harris R. A. (2000)

Effects of Gaseous Anesthetics Nitrous Oxide and Xenon on Ligand-gated Ion Channels: Comparison with Isoflurane and Ethanol.

Anesthesiology 93 (4): 1095-1101

Zamponi G.W./Bourinet E./Snutch T.P. (1996)

Nickel Block of a Family of Neuronal Calcium Channels: Subtype- and Subunit-Dependent Action at Multiple Sites.

Journal of Membrane Biology 151 (1): 77-90

Zamponi G. W. (1. Auflage 2005)

Voltage -gated Calcium Channels, 77f.