

I

Aus dem Institut für Klinische Physiologie der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Elektrophysiologische Charakterisierung künstlicher Ionenkanäle in lebenden Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Pawel Fidzinski aus Breslau

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. O. Strauß
2. Prof. Dr. R. Grantyn
3. Priv. Doz. Dr. F. Kirchhoff

eingereicht: 03. Juni 2005

Datum der Promotion: 20. März 2006

Abstract (deutsch)

Durch Ausübung physiologischer Grundfunktionen spielen Ionenkanäle eine entscheidende Rolle für die reguläre Funktion von Zellen. Zum besseren Verständnis ihrer Struktur und Funktion sind Untersuchungen natürlicher und künstlicher Ionenkanäle wichtige Werkzeuge. Großes analytisches und therapeutisches Potential ist in der Untersuchung künstlicher Kanäle in lebenden Zellen vorhanden, was bisher wenig Beachtung fand. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der künstlichen Ionenkanäle THF-gram, THF-gram-TBDPS sowie linked-gram-TBDPS auf elektrophysiologische Eigenschaften boviner Trabekelwerkszellen des Auges anhand von Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus analysiert. Die Untersuchung brachte folgende Erkenntnisse: 1. Die Inkorporation aller drei Verbindungen war erfolgreich, was sich durch Anstieg der Stromdichte und Verschiebung des Umkehrpotentials zeigte. 2. Einbau von THF-gram und THF-gram-TBDPS war mit dem Überleben der Zellen vereinbar, während linked-gram-TBDPS aufgrund einer sehr potenten Antwort bereits bei sehr geringen Konzentrationen zum raschen Zelltod führte. 3. Eine Asymmetrie der Stromantwort zugunsten stärkerer Auswärtsströme wurde bei THF-gram und in schwächerer Ausprägung bei THF-gram-TBDPS festgestellt. Linked-gram-TBDPS zeigte keine derartige Asymmetrie. 4. Unter Verwendung von Cs^+ als Ladungsträger war der beobachtete Anstieg der Stromdichte bei allen drei Verbindungen eindeutig stärker als unter physiologischen Bedingungen (Na^+/K^+). 5. Die dargestellten Erkenntnisse sind ein erster Schritt zur therapeutischen Anwendung von künstlichen Ionenkanälen. Eine Weiterentwicklung in Richtung höherer Selektivität und besserer Kontrolle ist jedoch genauso erforderlich wie die Klärung der klinischen Umsetzbarkeit.

Abstract (english)

Ion channels play a pivotal role for regular cell function. To better understand their structure and function, investigation of both natural and artificial ion channels is being performed to date. Investigation of artificial channels in living cells hides a big potential, however, little attention has been paid to this field so far. In this work, the effect of the artificial ion channels THF-gram, THF-gram-TBDPS and linked-gram-TBDPS on electrophysiological properties of bovine trabecular meshwork cells was investigated with the patch-clamp-technique. Following results were obtained: 1. Incorporation of all three compounds was successful, which was proven by increase of current density and cell depolarisation. 2. The cells survived after incorporation of THF-gram and THF-gram-TBDPS but not after linked-gram-TBDPS, which resulted in cell death at very low concentrations. 3. Larger outward currents were observed with THF-gram and, at a lower extent, with THF-gram-TBDPS. Linked-gram-TBDPS did not show such an asymmetry. 4. With Cs⁺ as charge carrier all three compounds showed a stronger increase of current density than under physiological conditions (Na⁺/K⁺). 5. The described results are a first step towards therapeutic application of artificial ion channels, however, further development towards higher selectivity and better control is as necessary as clarification of clinical feasibility.

artificial ion channels, patch-clamp-technique, gramicidin A, trabecular meshwork

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Kontrolle der Ionenverteilung zwischen dem Zellinneren und der Umgebung ist eine Grundvoraussetzung für reguläre Zellfunktion. In jedem komplexen Organismus werden daher Transportmechanismen für Ionen benötigt. Diese Aufgabe wird u.a. von Ionenkanälen übernommen, die mit hoher Effizienz Kationenflux und Anionenflux entlang von Konzentrations- oder Elektrogradienten durch die Zellmembran vermitteln. Elektrische Phänomene, die durch die Aktivität von Ionenkanälen generiert werden, sind z.B. an der Erhaltung des Ruhemembranpotentials, der Nervensignalfortleitung und auch an Kontraktionsprozessen beteiligt (Ackerman & Clapham, 1997; Hamill, et al., 1981). Dadurch werden erst komplexe Funktionen wie Herzschlag, Fortbewegung oder Gedanken möglich.

Die Relevanz von Ionenkanälen wird noch deutlicher durch ihre pathophysiologische Bedeutung. Ausbleibende Expression oder fehlerhafte Funktion führen zur Manifestation einer Vielfalt von hereditären Erkrankungen. Durch Mutationen in Genen, die für Ionenkanalproteine kodieren oder in Sequenzen, die deren Expression steuern, kommt es zur fehlenden oder fehlerhaften Funktion der Kanäle. Die Konsequenzen sind vom betroffenen Kanaltyp abhängig und werden unter anderem als zystische Fibrose (Davis et al., 1996), Long-QT-Syndrom (Keating, 1996), hereditärer Bluthochdruck (Shimkets et al., 1994) oder verschiedene Typen von Myotonien (Hudson et al., 1995) manifest.

Nicht nur in angeborenen, sondern auch in erworbenen Krankheiten spielen Ionenkanäle mitunter eine entscheidende Rolle. Das Spektrum solcher Krankheiten reicht von gastroenterologischen Leiden wie dem peptischen Ulkus oder infektiösen Diarrhöen bis zu neurologischen Funktionsstörungen (Bernard et al., 2004; Flach et al., 2004; Laohachai et al., 2003; Peskar et al., 2002). Sogar bei Asthma und bei allergischen Reaktionen konnte die Beteiligung von Ionenkanälen gezeigt werden (Bradding & Conley, 2002). Als Angriffsziel von Medikamenten haben sich Ionenkanäle in der Therapie vieler Erkrankungen bewährt. Die prominentesten Beispiele sind chronische Herzinsuffizienz, Bluthochdruck sowie Diabetes mellitus, bei denen die Hemmung von Calcium- beziehungsweise Kaliumkanälen einen

wesentlichen Teil des therapeutischen Managements darstellt (Elkayam, 1998; Mannhold, 2004; Romero et al., 2003).

1.1.1 Historische Grundlagen

Erstes Interesse für die Elektrizität lebender Organismen ist ins achtzehnte Jahrhundert mit Galvani's Theorie von „Bioelektrizität“ zu datieren (Abbildung 1.1). Luigi Galvani, seiner Nachwelt besser als Erfinder der Batterie bekannt, stellte die Hypothese auf, dass Elektrizität an elementaren physiologischen Funktionen wie Muskelkontraktion oder Signalfortleitung in Nerven beteiligt ist. Seine Erkenntnisse läuteten das Ende der mittelalterlichen Auffassung von „animalischen Geistern“ und „mysteriösen Fluiden“ als auslösende Medien für Muskelbewegung ein (Piccolino, 1998).

Das 19. Jahrhundert brachte weitere Fortschritte im Verständnis elektrophysiologischer Phänomene. Aus dieser Zeit stammt die erste Erwähnung der Porentheorie als mögliche Erklärung für Osmoseprozesse. Die führende wissenschaftliche Gruppe auf dem Gebiet der Elektrophysiologie war als die Berlin-Gruppe bekannt und bestand aus Wissenschaftlern und Schülern um Johannes Müller (Hille, 1992; Lohff, 2001). Der Gruppe gelang es, zum ersten Mal die Geschwindigkeit der Nervensignalfortleitung zu messen sowie ein Phänomen zu beobachten, das sie „negative Fluktuation“ nannten und das später als Aktionspotential bekannt wurde (Goldensohn, 1998). Wenige Jahrzehnte später führte Bernstein die gleichen Experimente mit genaueren Messmethoden durch. Seine Resultate und Overton's Permeabilitätsexperimente an Muskelzellen führten zur gemeinsamen Hypothese, dass Ionen durch Diffusionsprozesse an Signalfortleitung und Kontraktion beteiligt sein müssen (Bernstein, 1912; Nilius, 2003).

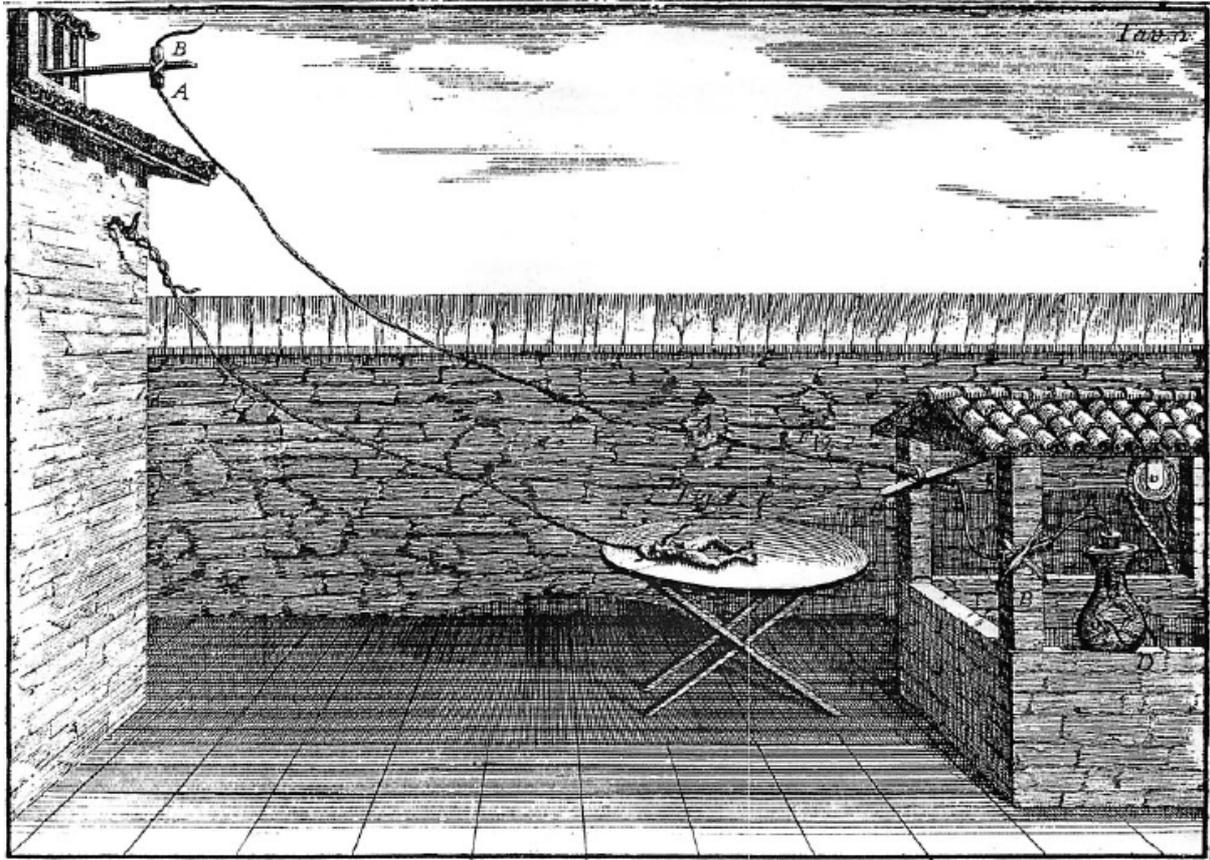


Abbildung 1.1 Ein Experiment von Galvani, das zu seiner Zeit großes Aufsehen erregte, war das „Froschschenkelexperiment“. Galvani verband einen offenpräparierten Oberschenkelmuskel mit einem Metalldraht, dessen andere Ende auf dem Dach befestigt war. Während eines Gewitters konnte Galvani Muskelzuckungen beobachten, die laut seinem Bericht im Augenblick des Blitzes auftraten, lange Zeit bevor der Donner gehört werden konnte. Die gezeigte Grafik stammt aus Galvanis Publikation „De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarius“ (aus Piccolino, 1998).

Um 1930 begann mit Hodgkin und Mitarbeitern eine neue Ära für die Elektrophysiologie. Die Anwendung der Voltage-Clamp-Technik am Riesenaxon des Tintenfisches gipfelte in der ersten wissenschaftlichen Erklärung des Aktionspotentials (Hodgkin & Huxley, 1952). Diese Erklärung ging davon aus, dass das Aktionspotential durch spannungsabhängige Veränderung der Membranleitfähigkeiten für Kalium- und Natriumionen entstand (Hodgkin & Keynes, 1955). Spätere Experimente mit blockierenden Substanzen wie z.B. Tetrodotoxin (TTX) oder

Tetraethylammonium (TEA) unterstützten diese Theorie (Narahashi et al., 1964; Tasaki & Hagiwara, 1957).

Der erste umfassende und detaillierte Nachweis von Ionenkanälen wurde schließlich im Jahr 1976 von Neher und Sakmann mit der Entwicklung und Anwendung der Patch-Clamp-Technik geliefert. Den beiden Wissenschaftlern gelang es, Einzelkanalmessungen von Acetylcholinrezeptoren an Froschmuskelzellen durchzuführen und somit eine Antwort darauf zu geben, dass Ionenkanäle verantwortlich für die beobachteten Ströme waren (Hille, 1992; Neher & Sakmann, 1976). Die Patch-Clamp-Technik und ihre Optimierung durch Entwicklung des „Gigaohm-Seal“ (G Ω -Seal) im Jahr 1981 (Hamill et al., 1981) war der Wegbereiter für die Verknüpfung von elektrischen Ereignissen mit Ionenkanalproteinen. Für ihre Leistungen wurden Neher und Sakmann 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Die letzten zwanzig Jahre brachten neue Methoden und Weiterentwicklungen. Das Klonen von Kanalgenen oder die Isolation von Kanalproteinen aus Membranextrakten wurden zu Standardwerkzeugen ihrer Erforschung (Hartshorne et al., 1986; Noda et al., 1983). Rekombinante DNS-Technologie und sogenannte „site-directed mutagenesis“ brachten neues Wissen über Struktur-Funktionsbeziehungen (Russo, 2003). In den letzten Jahren standen EDV-unterstützte Simulationen sowie röntgenkristallographische Methoden im Mittelpunkt der Forschung. Kaliumkanäle gehören heute zu den bestuntersuchten Strukturen, das fehlende Wissen wird aber auch bei anderen Kanälen nachgeholt (Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2003; Kuo et al., 2003; Wendt et al., 2003).

1.1.2 Aktueller Wissensstand über Ionenkanäle

In der heutigen wissenschaftlichen Auffassung sind Ionenkanäle transmembranäre Glykoproteine, welche ionendurchlässige Poren bilden. Wie solche Poren entstehen, soll am Beispiel eines spannungsabhängigen Kaliumkanals verdeutlicht werden (Abbildung 1.2): vier Untereinheiten, auch α -Untereinheiten genannt, bilden in der Membran eine Pore. Jede der α -Untereinheiten besteht aus 6 transmembranären Domänen (S1-S6) sowie aus den jeweiligen Verbindungssegmenten (loops) zwischen den Domänen, die extrazellulär oder intrazellulär verlaufen. Eine besondere Funktion wird von dem Segment zwischen den Domänen S5 und S6 übernommen, welches die Pore bildet. Die Domäne S4 übernimmt die

Aufgabe eines Spannungssensors, der bei Änderungen des Membranpotentials eine Konformationsänderung bewirkt.

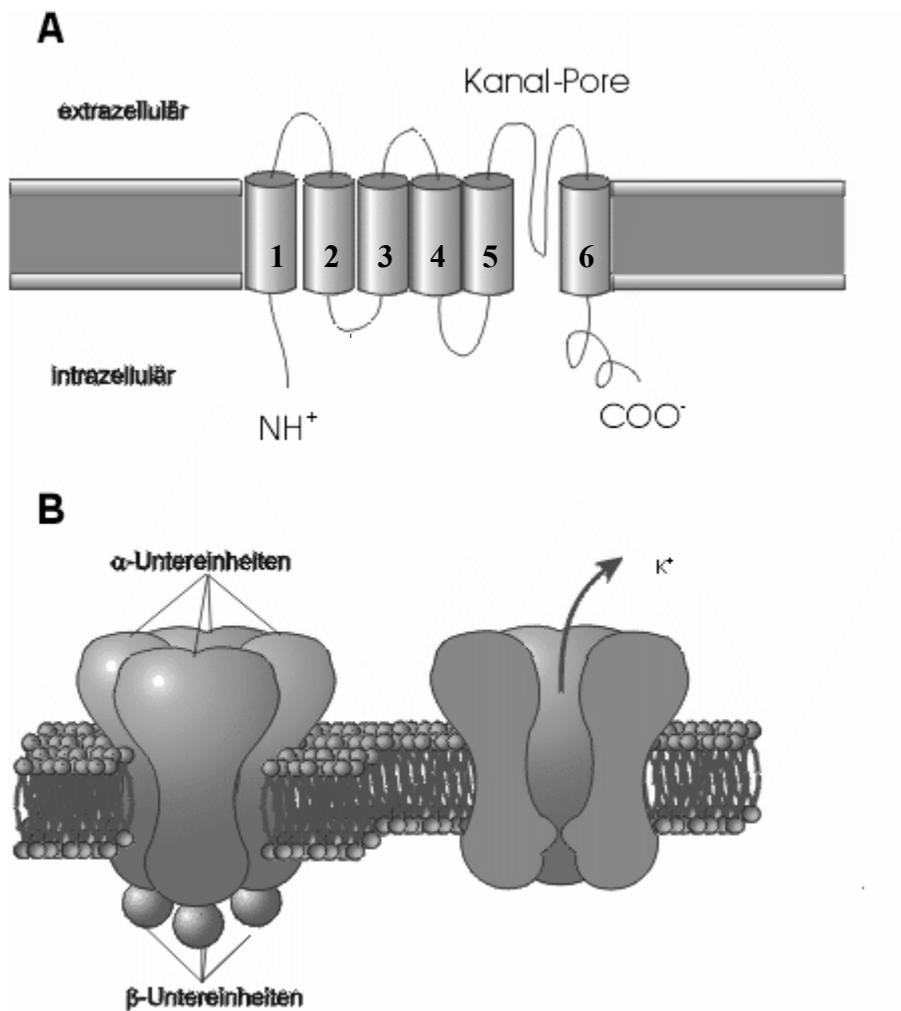


Abbildung 1.2 Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. (A) gibt die Anordnung der α -Untereinheit mit 6 transmembranären Domänen in der Zellmembran wieder. In (B) richten sich vier α -Untereinheiten zu einer Pore aus wobei das Erbindestück zwischen S5 und S6 dem Poreninneren zugewandt ist. Zusätzlich können auf der intrazellulären Seite vier β -Untereinheiten an den Kanal gebunden sein (aus Schmidt, 1998).

Ionenkanäle werden nach ihrem Selektivitätsverhalten oder nach ihrer Aktivierbarkeit unterschieden. Selektive Kanäle haben eine selektive Permeabilität für ein bestimmtes Ion, z.B. für Kalium, die ca. vier Zehnerpotenzen höher ist als für anderen Ionen. Kaliumselektive Kanäle spielen eine wichtige Rolle für die Regulation des Ruhemembranpotentials (Hille, 1992); in glatten Muskelzellen nehmen sie dadurch Einfluss auf die Kontraktilität (Nelson & Quayle, 1995). Natrium- und Chloridkanäle sind essentiell für Signaltransfer in Neuronen, schließlich sind Calciumkanäle bei Kontraktionsvorgängen maßgeblich beteiligt (Hille, 1992). Der Vollständigkeit halber sollten an dieser Stelle Aquaporine erwähnt werden, dessen Funktion als selektive Kanäle für Wassermoleküle in der voletzten Dekade eingehend untersucht wurde (Heymann et al., 1998). Nicht selektive Kanäle sind meist für mehrere Ionen eines Typs durchlässig, z.B. für Kationen. Die Permeabilitäten für einzelne Ionen unterscheiden sich hier nur geringfügig. Als Beispiele kann man hier den Acetylcholinrezeptor oder TRP-Kanäle anführen (Barrantes, 1997; Beech et al., 2004).

Die Aktivierbarkeit, besser bekannt als „gating“, beschreibt die Eigenschaft der Kanäle, sich in einem stochastischen Prozess zu öffnen und wieder zu schließen. Die Offenwahrscheinlichkeit und die mittlere Offenzeit des Kanals sind entscheidend für den Gesamtstrom, der durch die Membran fließt. Aktivierungsmechanismen steigern sowohl die Offenwahrscheinlichkeit als auch die mittlere Offenzeit des Kanals und bewirken einen Stromanstieg. Es gibt spannungsabhängige Kanäle, z.B. Natriumkanäle in Neuronen (Arhem, 2004), deren Offenwahrscheinlichkeit in einem bestimmten Spannungsbereich höher als bei anderen Potentialen ist. Ligandenabhängige Kanäle benötigen zur Aktivierung eine bestimmte Substanz, z.B. Acetylcholin oder Glycin (Reeves & Lummis, 2002), die an den Kanal bindet und ihn somit aktiviert. Schließlich gibt es noch mechanosensitive Kanäle, die mit dem Zytoskelett verbunden sind und auf mechanische Reize reagieren (Sukharev & Anishkin, 2004). Die genannten Aktivierungsmechanismen können auch parallel zueinander wirken, was beim Maxi-K-Kanal zu sehen ist. Dieser wird über das Membranpotential und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert, was bei glatten Muskelzellen einen wichtigen Rückkopplungsmechanismus für die Kontraktilität darstellt (Rothberg, 2004).

Wie funktioniert Ionentransfer durch einen Kanal auf molekularer Ebene? In wässriger Lösung sind Ionen von einer Hydrathülle umgeben, wodurch ein optimaler, energiearmer Zustand entsteht. Die Wassermoleküle richten sich als Dipole so aus, dass einem Ion immer

entgegengesetzte Ladungen gegenüberstehen. Beim Eintritt in einen Ionenkanal verlieren die Ionen diese Hydrathülle. Damit ein effizienter Transportvorgang annähernd der Diffusion mit Transportraten von 10^4 bis 10^8 Ionen pro Sekunde möglich ist, muss das Ion beim Kanaldurchtritt mit seiner Umgebung einen optimalen Energiezustand eingehen, indem der Kanal die Hydrathülle imitiert. Je nach Selektivität des Kanals sind dem Kanalinneren entweder positiv oder negativ geladene Aminosäurenreste zugewandt. Im Fall eines Kaliumkanals sind es z.B. Sauerstoffatome der Carboxylgruppen, die negativ geladen sind und somit bei Interaktion mit einem Kation einen energiearmen Zustand ermöglichen (Kuo et al., 2003).

Die entgegengesetzte Ladung von Ion und innerer Oberfläche des Durchtrittskanals ist jedoch nicht hauptsächlich entscheidend für Kanalselektivität. Viel wichtiger sind die Übergänge zwischen Hydrathülle und Kanal. Hier spielen die Durchmesser der Poren und der Ionen eine wichtige Rolle. So sind z.B. im Kaliumkanal Tryptophanreste so angeordnet, dass sie den Durchmesser des Durchtrittskanals fixieren, indem sie mit angrenzenden Fettsäuren eine lipophile Interaktion eingehen (Doyle et al., 1998). Die Fixierung führt dazu, dass Kaliumionen mit einem Durchmesser von 133 pm den Energieverlust durch Dehydratation besser kompensieren können als Natriumionen mit 95 pm. Durch diese günstigen Distanzverhältnisse zwischen Kaliumion und den Aminosäuren im Durchtrittskanal des Kaliumkanals wird seine Selektivität erklärt (Hille, 1992).

1.2 Gramicidin A

Die Natur hat mehr als einen Weg entwickelt, um Ionen durch Lipidmembranen zu schleusen. Zum Schutzrepertoire einiger Bakterienstämme gehört die Ausschüttung von kanalaktiven Peptiden. Solche Kanäle bauen sich aus dem extrazellulären Raum heraus in fremde Membranen ein, stören den Elektrolythaushalt und führen schließlich zum Zelltod. Viele dieser Substanzen waren als Antibiotika bekannt, bevor ihr Wirkmechanismus der Porenbildung entdeckt wurde. Dazu gehören unter anderem Amphotericin B, Nystatin, das Peptaibol Alamethicin und Gramicidin A (Urry et al., 1971).

Aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen Struktur eignen sich diese Substanzen als Modelle, um die physiko-chemischen Interaktionen zu studieren, die für die Passage von Ionen durch Ionenkanäle wirksam sind. Gramicidin A ist eine der am besten untersuchten Verbindungen.

Die geringe Größe des Moleküls, die rasche und stabile Formation von Kanälen in Membranen und die Möglichkeit röntgenkristallographischer Charakterisierung ermöglichen die Untersuchung prinzipieller Eigenschaften von Ionenkanälen an einem reduzierten und leicht zugänglichen Modell (Wallace, 1998; Wallace, 2000). Interessanterweise war Gramicidin A die erste Substanz, mit deren Hilfe Einzelkanalereignisse in Bilayer-Membranen gemessen wurden, und dies bereits einige Jahre bevor diese Leistung an nativen Kanälen in Zellen erbracht wurde (Bean et al., 1969; Hladky & Haydon, 1970).

Seinen Namen verdankt Gramicidin der Fähigkeit zur Tötung grampositiver Bakterien. Rene Dubos war der erste Wissenschaftler, der die Substanz 1939 aus dem Bakterium *Bacillus brevis* extrahierte und als hochwirksames Antibiotikum einzusetzen hoffte (Hotchkiss & Dubos, 1940). Die Idee der klinischen Anwendung wurde jedoch rasch wegen seiner humantoxischen Wirkung verworfen.

Gramicidin A ist ein Polypeptid aus 15 Aminosäuren mit alternierender Sequenz von linksdrehenden (L-) und rechtsdrehenden (D-) Aminosäuren (Abbildung 1.3). Bedingt durch die alternierende Sequenz bilden β -Helices die Sekundärstruktur, als Tertiärstruktur sind zwei Formen möglich, die Doppelhelix- und die Helixdimerform. Im ersten Fall sind ähnlich der DNS zwei β -Helices umeinander geschlungen. Bei der zweiten Form stehen sich zwei β -Helices mit den N-Termini gegenüber (Abbildung 1.4). Die Helixdimerform ist die aktive Form für Ionentransport. Nur bei dieser Konformation ist der innere Radius groß genug, um Ionenpassage zu ermöglichen. Die strukturelle Basis der Pore unterscheidet sich deutlich von nativen Kanälen, der Durchtrittskanal führt direkt durch das Innere der Helix. Durch Assoziation und Dissoziation der Monomere entsteht ein Wechsel zwischen offenem und geschlossenem Zustand. Die Ausbildung der kanalaktiven Konformation ist der angelegten Spannung proportional abhängig; diese Abhängigkeit ist durch weitere Faktoren wie ionale Zusammensetzung der Lösungen oder verwendete Membranart beeinflussbar (Sandblom et al, 2001). Die Länge des Moleküls fällt mit 260 pm in die Dimension von Phospholipiddoppelmembranen, so dass der Membraneinbau problemlos erfolgen kann (Wallace, 1998; Wallace, 2000).

HCO-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-Trp-D-Leu-**Trp**-D-Leu-
Trp-D-Leu-Trp-NHCH₂CH₂OH

Abbildung 1.3 Aufbau von Gramicidin A (Legende siehe Abkürzungsliste). In der Natur vorkommendes Gramicidin (=Gramicidin D) ist eine Vermischung aus drei Isoformen (Panchal et al., 2002): 80% Gramicidin A, 5% Gramicidin B, das an der Position 11 (fett markiert) Phenylalanin anstelle von Tryptophan trägt, sowie 15% Gramicidin C, dessen Position 11 mit Tyrosin besetzt ist.

Die Tertiärstruktur sowie die Funktion von Gramicidin sind direkt auf beteiligte Aminosäuren zurückzuführen. Für die Stabilisierung des Moleküls in der Membran sind die Seitenketten der N-ständigen Tryptophane verantwortlich, die mit anliegenden Fettsäuren interagieren. Hingegen vermutet man in der Valin-reichen Region am C-Ende entsprechend den Aminosäuren 1-8 (gezählt vom C-Ende) einen Selektivitätsfilter für Kationen, da hier negativ geladene Carboxylreste dem Poreninneren zugewandt sind. Das Selektivitätsverhalten von Gramicidin A entspricht der Eisenman-Reihe I für monovalente Kationen mit $Rb^+ > Cs^+ > K^+ > Na^+$ bei einem Verhältnis der Leitfähigkeiten von ca. 3:1 (Chadwick & Cardew, 1999). Nach heutigem Wissensstand erfolgt der Ionentransfer bei Gramicidin A ebenfalls durch Abstreifen der Hydrathülle und Eintreten des Kations in den Durchgangstunnel, in dem negativ geladene Gruppen als Leitschiene dienen. Die Reihenfolge der Leitfähigkeiten erklärt sich aus dem Durchmesser Verhältnis der Pore und der jeweiligen Ionen zueinander.

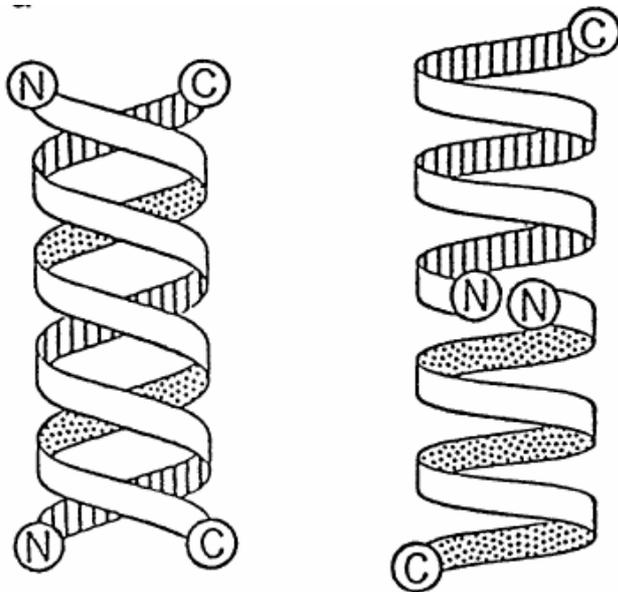


Abbildung 1.4: Mögliche Konformationen von Gramicidin. Die Doppelhelix (DH)-Konformation (links) ist für Ionentransfer ungünstiger als die Helixdimer (HD)-Konformation (rechts) (aus Wallace, 1998).

Neben der Erforschung des nativen Gramicidin A haben sich einige Arbeitsgruppen mit Modifikationen des Moleküls beschäftigt. So entstanden unter anderem kovalent gebundenes „Doppelgramicidin“, das nicht dissoziiert, sowie lichtempfindliches Gramicidin, das nur nach Lichteinfall bestimmter Wellenlänge aktiv wird (Armstrong et al., 2001; Borisenko et al., 2000; Kumita et al., 2000; Stankovic et al., 1989). Derartige Modifikationen ebneten den Weg für artifizielle Ionenkanäle, da offensichtlich wurde, dass strukturelle Veränderungen die Funktion als Ionenkanal erhalten und zum Teil sogar verstärken konnten.

1.3 Synthetische Ionenkanäle

Synthetische Ionenkanäle sind für die Forschung aus zwei Gründen interessant. Einerseits tragen Untersuchungen von Kanalmodellen zum besseren Verständnis natürlicher Kanäle bei, wie es bei Gramicidin A der Fall ist. Anhand solcher Modelle können die Beziehungen von

Struktur und Funktion besonders gut studiert werden. Andererseits ist die Nachahmung physiologischer Kanalfunktion ein möglicher Ansatz zur Therapie von Channelopathien (Kanalerkrankungen). Eines der wichtigsten Langzeitziele ist es, Aktivierbarkeit und Selektivitätsverhalten derart zu beeinflussen, dass fehlerhafte oder fehlende Kanalfunktion ersetzt werden kann. Dieser Ansatz macht die pathophysiologische Relevanz synthetischer Ionenkanäle deutlich.

Die ersten artifiziellen Ionenkanäle wurden 1982 synthetisiert. Allerdings konnten diese Strukturen nur divalente Kobaltionen transportieren (Tabushi et al., 1982). In den darauffolgenden 20 Jahren entstanden etliche Modelle zur Imitation natürlicher Kanalfunktion, die physiologisch bedeutsame Ionen wie Natrium oder Kalium transportieren konnten. Dabei wurden sowohl Ansätze zur Kanalsynthese auf der Basis von Peptiden als auch unter Verwendung komplexer organischer Verbindungen, z.B. hydrophiler Moleküle, verfolgt (Ghadiri et al., 1994; Gokel & Mukhopadhyay, 2001; Gokel et al., 2001; Schrey et al., 2000).

1.3.1 THF-Gramicidin-Hybride und „kovalentes“ Gramicidin

In der Arbeitsgruppe um Koert werden Tetrahydrofurane (THF) als Ionenkanalbausteine untersucht. Tetrahydrofurane sind Ringmoleküle, die mit Kationen Komplexe eingehen, daher sind sie für die Aufgabe des Ionentransportes gut geeignet. Um sie in Peptidstrukturen einbinden zu können, mussten sie jedoch modifiziert werden. Entsprechend der nativ vorkommenden Aminosäuren wurde dem THF-Molekül ein N-Terminus (NH_2) sowie ein C-Terminus (COOH) angehängt (Abbildung 1.5), so dass eine neue, synthetische Verbindung entstand, die THF-Aminosäure (Schrey et al., 1999; Stankovic & Schreiber, 1991). Nun war eine Leitstruktur notwendig, um die THF-Bausteine in eine funktionelle Position zu bringen. Dafür wurde ein Molekül ausgewählt, dessen Struktur und Funktion weitgehend bekannt ist und das sich als Ionenkanal bereits bewährt hatte: Gramicidin A.

Die Aminosäuren 1-8 von Gramicidin A, welche potentiell als Leitstruktur für den Ionendurchtritt dienen (Kapitel 1.2), wurden durch vier THF-Bausteine ersetzt (Abbildung 1.5). Gramicidin A ist nur als Dimer aktiv. Aus diesem Grund wurde der N-Terminus dieser neuen Verbindung mit dem N-Terminus eines weiteren Gramicidinmoleküls kovalent

verbunden, um die Porenbildung zu erleichtern. Als Verbindungsstück (Linker) wurde dabei ein Tartratmolekül verwendet, das in früheren Studien bereits als Linker zwischen zwei Gramacidinmolekülen untersucht worden war (Armstrong et al., 2001; Stankovic et al., 1989). So entstand THF-Gramicidin (THF-gram). Eine weitere Verbindung entstand durch Modifikation der Endgruppen von THF-gram. Die Änderung bestand darin, die freien Ethanolaminenden mit zusätzlichen chemischen Bausteinen zu verknüpfen. Diese Bausteine dienen als Schutzgruppen vor Abbau durch Proteasen und Peptidasen und bestehen aus t-Butyldiphenylsilyl (TBDPS), einer komplexen chemischen Verbindung. Diese zweite Verbindung wurde THF-gram-TBDPS genannt (Schrey et al., 2000). Schließlich wurde eine dritte Verbindung synthetisiert, das linked-gram-TBDPS. Hier wurden die N-Termini von zwei Gramacidinmolekülen mit einem Linkermolekül aus Bernsteinsäure (*Succinyl*) kovalent verbunden, ohne Änderungen der Gramacidinsequenz vorzunehmen. Succinyl wurde ausgewählt, weil es am wenigsten die Ionenkanalfunktion beeinträchtigen würde, da in kernspinspektroskopischen Untersuchungen das succinylverbundene Gramicidin im Vergleich mit anderen Linkern am ehesten der Helixdimerkonformation ähnelte. Auch bei der letzten Verbindung wurden am C-Terminus TBDPS-Schutzgruppen eingefügt (Arndt et al., 2001).

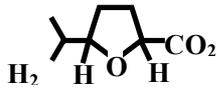
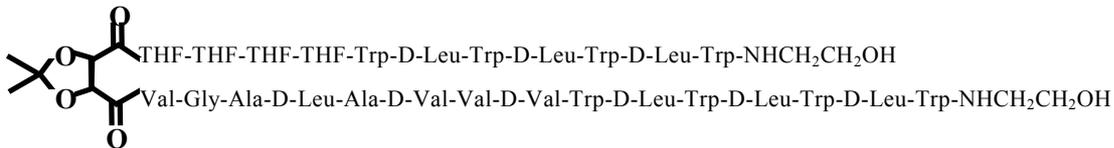
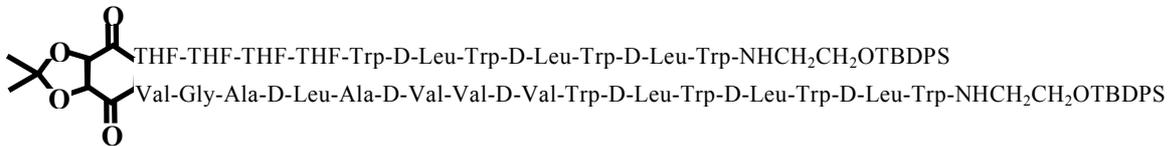
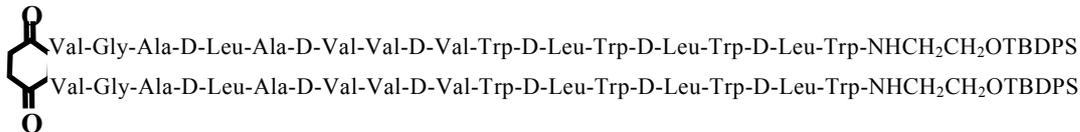
**H-THF-OH****THF-gram****THF-gram-TBDPS****Linked-gram-TBDPS**

Abbildung 1.5 Aufbau der THF-Aminosäure, der THF-Gramicidin-Hybride sowie des Linked-gram-TBDPS (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Koert, Universität Marburg).

Alle Verbindungen wurden säulenchromatographisch gereinigt. Methanol und DMSO dienten als Mediatorsubstanzen, um die Substanzen in wässrige Lösung zu bringen. Zunächst wurde die Leitfähigkeit anhand von Einzelkanalaufnahmen in Bilayermembranen bestimmt.

Bilayermembranen sind ein etabliertes Modell, das unter anderem zur Untersuchung von Ionenkanälen verwendet wird: zwei Doppelkammern werden von einer Platte getrennt, die eine 150 µm breite Öffnung enthält. Diese Öffnung wird mit einem Gemisch von Sojabohnenlecithin und n-Dekan beschichtet, das sich rasch zu einer Phospholipiddoppelmembran umorganisiert (Schrey et al., 2000). Anschließend werden in eine der Kammern die Substanzen appliziert. Die darauffolgende Messung von Ionenströmen

zwischen beiden Kammern dient der quantitativen und qualitativen Bestimmung von Ionenkanaleigenschaften der getesteten Substanzen (Gokel & Mukhopadhyay, 2001).

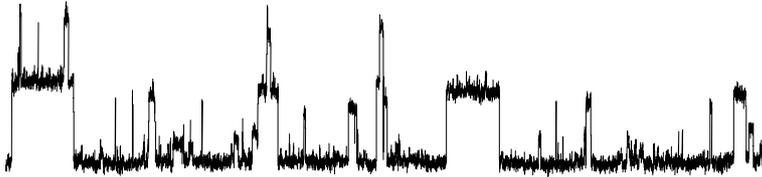
In derartigem Versuchsaufbau wurde THF-gram auf seine Fähigkeit zum Ionentransport getestet. Hier zeigte sich THF-gram tatsächlich aktiv als Ionenkanal mit dafür typischen, stochastisch auftretenden Einzelkanalereignissen. Es wurden mehrere Einzelkanalleitfähigkeitsstufen beobachtet, was durch mehrere kanalaktive Konformationen zu erklären wäre (Abbildung 1.6). Das Selektivitätsverhalten war dem der Mutterverbindung Gramicidin A ähnlich und zeigte folgende Ionenpräferenz: $\text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, wobei zwischen Ammonium- und Natriumionen ein Verhältnis von 2.6 : 1 für die Leitfähigkeit sowie 10 : 1 für die Permeabilität kalkuliert wurde.

Ein ähnliches Verhalten zeigte die zweite synthetische Verbindung, THF-gram-TBDPS. Auch in diesem Fall war typische Kanalaktivität mit Öffnungen und Schließungen zu beobachten, allerdings fiel diese schwächer aus, die Einzelkanalleitfähigkeit war ca. 10-40% geringer als bei THF-gram. Veränderung der aktiven Membrankonformation durch TBDPS-Schutzgruppen liefert die wahrscheinlichste Erklärung für die beeinträchtigte Leitfähigkeit, da diese Schutzgruppen große Moleküle sind und dementsprechend eine räumliche Störung darstellen. Die errechnete Ionenselektivität von THF-gram-TBDPS war vergleichbar mit THF-gram bei einem Verhältnis von 3.7 : 1 für die Leitfähigkeit sowie 10 : 1 für die Permeabilität.

Die Untersuchung von linked-gram-TBDPS ergab ein ungewöhnliches Aktivitätsmuster. Dieses Muster entsprach nicht den typischen Einzelkanalereignissen mit Öffnungen und Schließungen (Abbildung 1.7). Bereits bei einer Konzentration von 10^{-14} mol/l wurde erste Kanalaktivität beobachtet. Es kam kontinuierlich zu neuen Kanalöffnungen, die sich summierten, so dass auch die Gesamtleitfähigkeit anstieg. Kanalschließungen waren bis auf einzelne Ausnahmen nicht zu beobachten, die Moleküle behielten ihre aktive Konfiguration länger als 30 min. Die Einzelkanalleitfähigkeit dieser Verbindung war allerdings schwächer als beim nativen Gramicidin, was sich am wahrscheinlichsten durch die TBDPS-Schutzgruppe einerseits und das hydrophobe Verhalten des Linkermoleküls andererseits erklären liesse.

THF-gram

2 s
1 pA



THF-gram-TBDPS



Abbildung 1.6 Einzelkanalaktivität von THF-gram und THF-gram-TBDPS (jeweils 10^{-8} M) durch Bilayermembranen in 1 molarer KCl-Lösung nach Anlegen einer Spannung von 100 mV (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Koert, Universität Marburg).

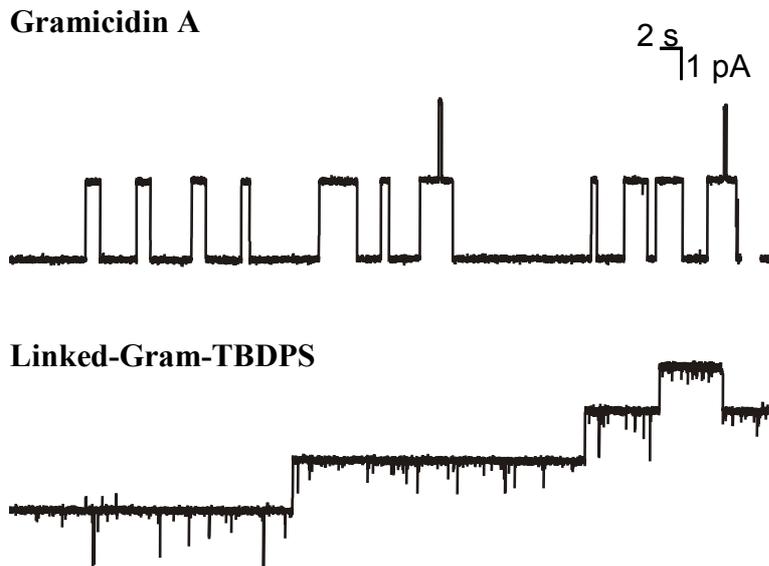


Abbildung 1.7 Einzelkanalaktivität von Gramicidin A (10^{-12} M) und linked-gram-TBDPS (10^{-14} M) in Bilayermembranen in 1 molarer KCl-Lösung nach Anlegen einer Spannung von 100 mV (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Koert, Universität Marburg).

1.4 Glaukom

Auch unter der Bezeichnung „grüner Star“ bekannt, ist das Glaukom ein ophthalmologisches Krankheitsbild, das durch progressive Degeneration retinaler Ganglienzellen und ihrer Axone gekennzeichnet ist. Die Konsequenz der Degeneration ist ein langsam fortschreitender Gesichtsfeldverlust, der schließlich zur völligen Blindheit führt (Fechtner & Weinreb, 1994). Das Glaukom ist neben diabetischer Retinopathie und altersbedingter Makuladegeneration eine der häufigsten Erblindungsursachen in hochentwickelten Ländern. Von der Erkrankung sind in der gesamten Weltbevölkerung mehr als 50 Millionen Menschen betroffen; davon sind ca. 6 Millionen bilateral erblindet (Quigley, 1996).

Man kennt unterschiedliche Glaukomformen. Die am häufigsten verwendete Einteilung unterscheidet zwischen Offenwinkel- und Winkelblockglaukomen, jede dieser Formen kann je nach Entstehungsursache weiter in primäre oder sekundäre Formen eingeteilt werden. Das

primäre Offenwinkelglaukom stellt mit annähernd 90% aller Glaukomformen die am häufigsten auftretende Variante in der westlichen Welt dar (Pfeiffer, 2001).

Die Pathophysiologie des Glaukoms ist komplex und bis heute nicht bis in alle Details verstanden. Im Fall des primären Offenwinkelglaukoms könnten mehrere Faktoren die Ursache des Zelluntergangs von retinalen Ganglienzellen sein, die toxische Wirkung erhöhter Glutamatspiegel gilt dabei als wahrscheinlichster Kandidat. Als weitere, möglicherweise ursächliche Faktoren werden erhöhter intraokulärer Druck, der Einfluss von Immunmodulatoren, z.B. TNF- α , sowie lokale retinale Hypoxie diskutiert (Weinreb & Khaw, 2004).

Erhöhter intraokulärer Druck ist der einzige Faktor, der nachweislich mit Ganglienzelluntergang assoziiert ist, wobei keine Klarheit darüber besteht, ob dieser Faktor Ursache oder Konsequenz der Erkrankung ist. Der vermutete Mechanismus, der von erhöhtem Druck zu Ganglienzellverlust führt, wird durch drei Hauptkomponenten bestimmt: Einerseits sind die Ganglienzellen durch mechanischen Stress aufgrund der erhöhten lokalen Druckgradienten direkt beeinträchtigt. Ein weiterer, indirekter Effekt wird an der Lamina cribrosa vermutet, einer tunnelartigen Struktur für Axone des Nervus opticus. Durch erhöhten Druck wird die Lamina deformiert, was zur Beeinträchtigung des axoplasmatischen Transportes und der Versorgung des Ganglienzellsoma führt. Schließlich trägt der veränderte Druckgradient zur Minderperfusion der Retina und somit zur Hypoxie bei, was den Degenerationsprozess zusätzlich beschleunigt (Bellezza, et al. 2003; Fechtner & Weinreb, 1994; Quigley et al., 2000).

1.4.1 Physiologie des Kammerwassertransportes und des Trabekelwerks

Wie kommt es zum erhöhten Augeninnendruck beim primären Offenwinkelglaukom? Der physiologische Druck ist durch das Gleichgewicht zwischen Sekretion, Transport und Drainage von Kammerwasser in der Augenkammer definiert. Störung dieses Gleichgewichtes, entweder durch erhöhte Sekretion oder verminderten Abfluss, führt zum erhöhten Druck. Die Sekretion von Kammerwasser erfolgt auf zellulärer Ebene über das Ziliarepithel, einem zweischichtigen Epithel, das die Fortsätze des Ziliarkörpers in der hinteren Augenkammer abschließt. Das Kammerwasser fließt anschließend zwischen Iris und

Linse in die vordere Augenkammer, um im Kammerwinkel über den Schlemm-Kanal wieder in das Blut- und Lymphsystem aufgenommen zu werden (Abbildung 1.8).

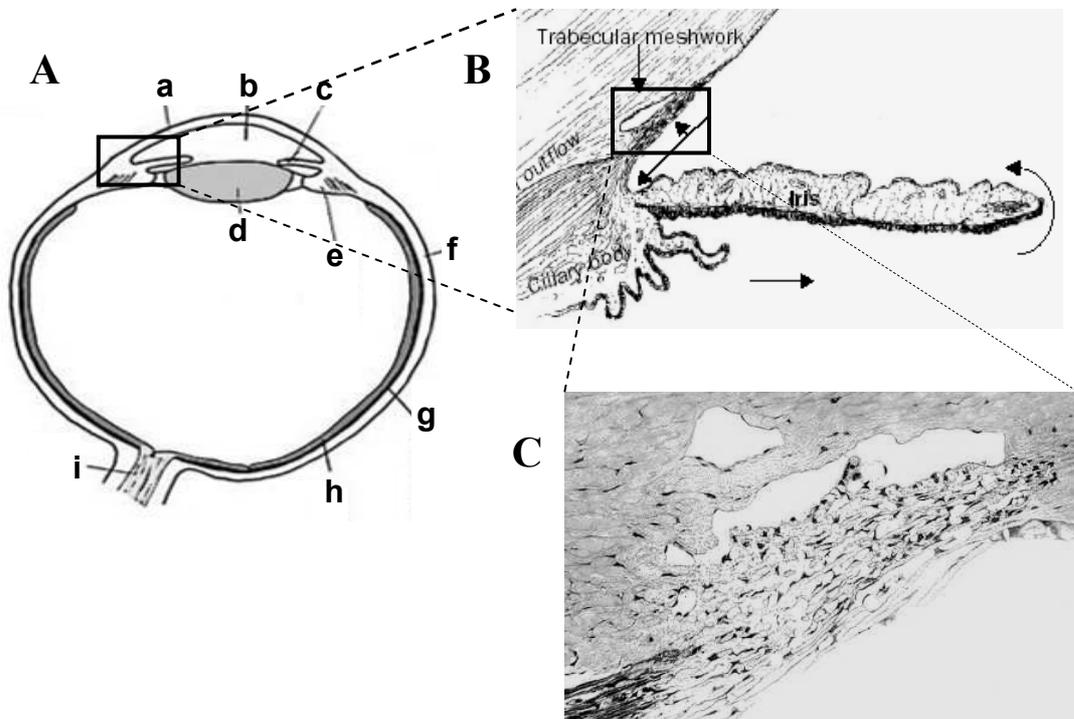


Abbildung 1.8 Anatomie des Auges im schematischen Längsschnitt (A): a) Kornea, b) vordere Augenkammer, c) Iris, d) Linse, e) Ziliarkörper, f) Sklera, g) Choroidea, h) Retina, i) Nervus opticus. Zeichnung (B aus Weinreb & Khaw, 2004) und Kryostatschnitt (C, mit freundlicher Genehmigung der University of California Davis, Sacramento) sollen die genaue Lokalisation des Trabekelwerks und den Kammerwasserfluss (Pfeile) deutlich machen.

Der Abfluss des Kammerwassers erfolgt größtenteils durch das Trabekelwerk, einen netzwerkartigen Zellverbund im Kammerwinkel. Das Kammerwasser fließt zwischen den einzelnen Trabekeln in den Schlemmkanal. Bei großem Abstand der einzelnen Trabekel untereinander kann die Abflussrate hoch sein, ein dichtes Trabekelwerk stellt eine Abflussbarriere dar. Jahrelang wurde das Trabekelwerk als passives Gewebe angesehen, dessen Spannungszustand vom Ziliarmuskel reguliert wird, mit dem es über Zonulafasern und Skleralsporn verbunden ist (Gong et al., 1996). Heute ist bekannt, dass das Trabekelwerk als kontraktiles Gewebe zusammen mit dem Ziliarkörper an der Abflussregulation beteiligt

ist. Die Zellen des Trabekelwerkes zeigen Eigenschaften, die mit glatten Muskelzellen vergleichbar sind. Kontraktion des Trabekelwerkes reduziert den Kammerwasserabfluss, Relaxation erhöht die Abflussrate. Es ist möglich, diesen Mechanismus pharmakologisch zu beeinflussen (Stumpff & Wiederholt, 2000; Wiederholt et al., 2000). Aus diesem Grund eignet sich das Trabekelwerk gut als pharmakologisches Zielgewebe, insbesondere weil es im Gegensatz zum Ziliarmuskel nicht an der Akkomodation der Linse beteiligt ist.

Die physiologische Regulation der Trabekelwerkskontraktilität erfolgt über einen Ca^{2+} -abhängigen sowie einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus. Beim Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus stellt das korrekte Zusammenspiel von Ionenkanälen einen der wichtigsten Faktoren dar. Erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zur Kontraktion des Gewebes. Die dafür notwendigen Calciumionen stammen aus zellinternen Speichern sowie aus dem extrazellulären Raum. Im letzteren Fall gelangen sie über Calciumkanäle vom L-Typ ins Zytosol. Die Calciumkanäle sind spannungsabhängig; sie werden bei einer Depolarisation aktiviert. Auswärts rektifizierende Kaliumkanäle vom Maxi-K-Typ sind maßgeblich an der Regulation des Membranpotentials beteiligt. Die Aktivität der Maxi-K-Kanäle ist von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig, bei erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration führt ihre vermehrte Aktivität zur Hyperpolarisation. Dieser Rückkopplungsmechanismus beeinflusst die intrazelluläre Calciumkonzentration, folglich auch die Kontraktionseigenschaften der Zellen. Kontraktilität glatter Muskelzellen ist über einen bestimmten Bereich linear abhängig vom Membranpotential (Greger & Windhorst, 1996). Die Aktivität der Maxi-K Kaliumkanäle ist somit entscheidend für Relaxation des Trabekelwerkes (Stumpff et al., 1997).

1.5 Fragestellung und Ziel

Die Untersuchung synthetischer Ionenkanäle in Bilayermembranen hat eine Menge zum Verständnis der Ionenkanäle, ihrer Struktur und Funktion beigetragen. Der therapeutische Einsatz erweist sich jedoch als komplexe Aufgabe und Herausforderung. Um als Ersatz fehlender Kanalfunktion zu dienen oder die Zelleigenschaften zu modifizieren, müssen künstliche Kanäle in einem komplexen biologischen Milieu funktionell sein. Ungeachtet ihrer Bedeutung für potentielle Anwendung ist die Untersuchung von künstlichen Kanälen in lebenden Zellen ein Bereich der Wissenschaft, der bisher bis auf einzelne Ausnahmen wenig Beachtung fand (Rottenberg & Koeppe, 1989).

In dieser Arbeit sollten daher die folgenden Untersuchungen erfolgen:

1. Ermittlung der Wirksamkeit von THF-gram, THF-gram-TBDPS und Linked-gram-TBDPS als Ionenkanäle in lebenden Zellen.
2. Analyse des Kanaleinbaus unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses auf physiologische Zellfunktion.
3. Untersuchung der Wirksamkeit von Gramicidin A, um die synthetischen Strukturen mit der Muttersubstanz zu vergleichen.

Als zu untersuchendes Material wurden kultivierte Zellen vom Trabekelwerk des bovinen Auges (BTM) ausgewählt. Bereits aus technischen Gründen sind BTM-Zellen für diese Aufgabe gut geeignet. Die Zellkultur und die Zellpräparation sind gut etabliert. Die Anwendung der Patch-Clamp-Technik ist bei BTM-Zellen ausgereift, die Zellen bilden relativ schnell und häufig $G\Omega$ -Seals aus und bleiben über längere Zeiträume stabil. In früheren Untersuchungen wurden BTM-Zellen elektrophysiologisch charakterisiert (Stumpff et al., 1997), ihr Verhalten entspricht weitestgehend humanen Trabekelwerkszellen.

Ein weiterer Grund für die Auswahl war die pathophysiologische Relevanz von Ionenkanälen für das Zielgewebe, insbesondere der Einfluss des Membranpotentials auf die Trabekelwerkskontraktilität.

2 Methoden

2.1 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode zur Beobachtung und Analyse von Ionenkanalströmen in Zellen und Membranen. Die hohe zeitliche Auflösung dieser Methode, ihre Genauigkeit sowie die hohe Geschwindigkeit der Signalübertragung machen Strommessung auf Einzelkanalebene möglich. Die im Jahr 1976 publizierte Methode wurde von Neher und Sakmann entwickelt und stellt heute die Basis für zahlreiche Methoden der modernen Elektrophysiologie dar.

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Weiterentwicklung der Voltage-Clamp-Technik. Bei Voltage-Clamp werden Zellströme und Membranpotentiale mit Hilfe eines Verstärkers sowie zwei Elektroden, einer intrazellulär und einer extrazellulär platzierten, gemessen. Mit einem Rückkopplungsmechanismus, der die Membranspannung mit Hilfe eines kompensatorischen Stroms auf einen vorgegebenen Wert fixiert, macht die Voltage-Clamp-Technik Messungen von einzelnen, beim Aktionspotential beteiligten Ereignissen möglich. Die Verfeinerung dieses Mechanismus führt zur Patch-Clamp-Technik, bei der Ströme auf Einzelkanalebene gemessen werden können: Ein Membranfleck wird durch elektrisch dichte Verbindung zwischen Membran und Pipettenspitze isoliert. Diese Verbindung wird als $G\Omega$ -Seal bezeichnet, da die vorliegenden Widerstände im Gigaohmbereich liegen. Mit dem $G\Omega$ -Seal wird das Problem des Hintergrundrauschens vermindert, da Leckströme zwischen Membranoberfläche und Pipettenspitze auf ein Minimum reduziert werden. Eine zusätzliche Innovation ist die Verwendung eines optimierten Verstärkers. Dieser Verstärker erlaubt es, nur eine Elektrode sowohl zur Messung des Potentials als auch zur Strominjektion zu verwenden. Die Badelektrode stellt nur einen Bezugspunkt dar, weswegen sie auch Referenzelektrode genannt wird (Molleman, 2003; Numberger & Draguhn, 1996).

In einem Patch-Clamp-Experiment wird das zu untersuchende Material, ein Gewebeschnitt oder einzelne Zellen, in der Flusskammer platziert und mit der Badlösung geflutet. Unter visueller Kontrolle mit Invertmikroskop sowie Kamera und Monitor (Abbildung 2.1) wird eine adäquate Zelle ausgewählt. Anschließend taucht man die Patchpipette in die Badlösung

und führt sie behutsam in unmittelbare Nähe der Zelle, bis ein Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zellmembran entsteht. Der Kontakt löst einen Anstieg des Widerstandes aus, was durch einen Stromabfall des vom Verstärker ausgesandten Kontrollstromes erkennbar wird (Abbildung 2.2). Das Ansetzen von Unterdruck in der Pipette führt nun zur Entwicklung eines G Ω -Seal, was auch als „Cell-Attached“-Modus bekannt ist (Abbildung 2.3A). Ausgehend von dieser Basiskonfiguration gelangt man zu drei Folgekonfigurationen, die unterschiedliche Arten der Messung ermöglichen: Whole-Cell, Inside-Out und Outside-Out (Abbildung 2.3B-D). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Whole-Cell-Konfiguration verwendet. Bei dieser Konfiguration werden keine Einzelkanalströme, sondern die Gesamtstromantwort einer Zelle als Summe aller aktiven Kanäle gemessen. Nach Ausbilden der gewünschten Konfiguration kann das eigentliche Experiment beginnen. Am Beispiel der Whole-Cell-Konfiguration soll der Ablauf verdeutlicht werden:

Das Potential der untersuchten Zelle wird konstant gehalten und der dazu notwendige Kompensationsstrom gemessen. Die gleichzeitige Strommessung und Potentialkontrolle wird durch eine Strom-Spannungswandlung bewerkstelligt (siehe Abbildung 2.4), dessen wichtigste Komponenten der Operationsverstärker (OPA) und der Referenzwiderstand sind. Der Verstärker misst am Eingang kontinuierlich das Membranpotential der untersuchten Zelle (U_{pip}), die der Pipettenspannung entspricht, und vergleicht den Wert mit der Kommandospannung (U_{soil}), die von der Steuereinheit vorgegeben ist. Bei Übereinstimmung fließt kein Strom durch das System. Bei Abweichungen der Werte durch Änderung von entweder U_{pip} oder U_{soil} entsteht am Verstärkerausgang eine Spannung, die dieser Differenz proportional und extrem verstärkt ist. Nun fließt aufgrund der Spannungsdifferenz zwischen Punkt 1 und Punkt 2 solange ein Strom über den Referenzwiderstand, bis die Spannungsdifferenz am Verstärkereingang aufgehoben ist. Erst mit Hilfe des Referenzwiderstandes ist eine Reaktion auf Spannungswechsel im Mikrosekundenbereich (μs) möglich, was unerlässlich für hohe zeitliche Auflösung bei der Strommessung ist. Störgrößen wie die Membrankapazität, die Pipettenkapazität oder die Eigenkapazität von R_f werden über weitere kompensatorische Rückkopplungskreise kompensiert.

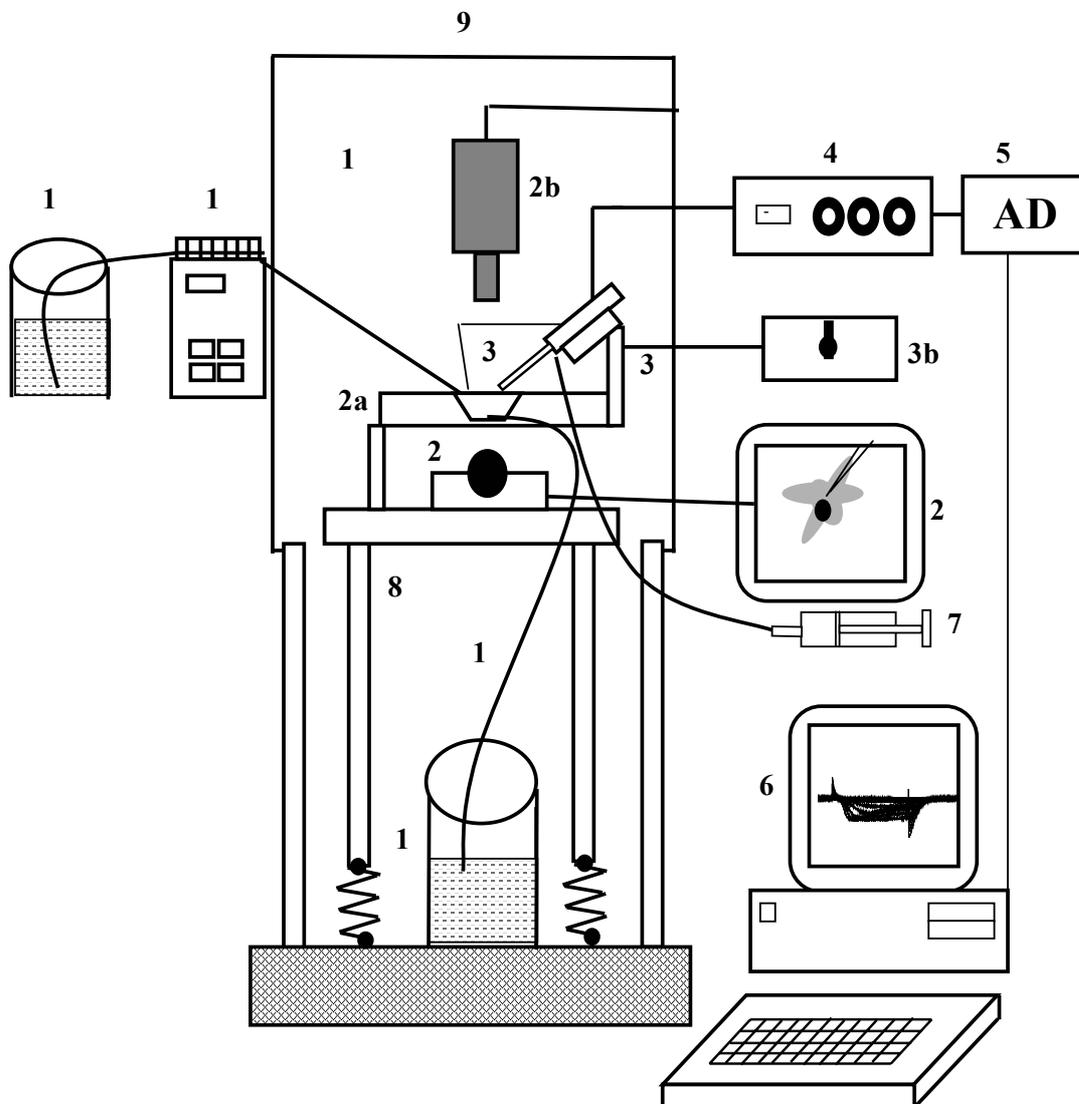


Abbildung 2.1 Vereinfachtes Schema des Patch-Clamp-Experimentaufbaus: (1) Perfusionssystem mit: frischer Badlösung (a), Rollerpumpe (b), zuführendem Schlauch (c), abführendem Schlauch (d), benutzter Badlösung (e), (2) Invertmikroskop mit: Perfusionskammer auf einer beweglichen Metallplatte (a), Lichtquelle (b) und Monitor (c), (3) Mikromanipulatoreinheit mit: Patchpipette und Referenzelektrode (a), Mikromanipulator (b), (4) Patch-Clamp-Verstärker EPC-7, (5) AD/DA-Wandler, (6) Computer mit TIDA-Software zur Datenaufnahme und Analyse, (7) Schlauchsystem für Pipettendruck, (8) schwingungsgedämpfter Tisch, (9) Faradaykäfig (angepasst aus Rosenthal, 2000).

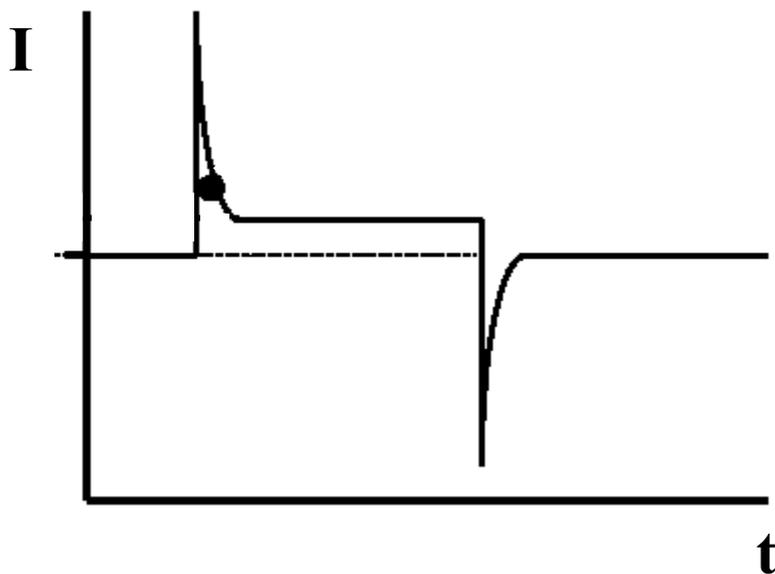


Abbildung 2.2: Prinzip der Stromantwort auf Testpuls während der Entstehung eines $G\Omega$ -Seals und einer Whole-Cell-Konfiguration. Nachdem der Cell-Attached-Modus erreicht bzw. ein $G\Omega$ -Seal gebildet ist, fällt die Stromantwort nach einem Spannungspuls wegen des hohen Widerstandes auf < 10 pA, was durch die gestrichelte Linie verdeutlicht wird. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Stromantwort nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration. Nach Ansetzen von Spannung kommt es zu Stromfluss. Die Stromspitzen (\bullet) jeweils am Anfang und Ende des Spannungspulses sind durch kapazitive Ströme aufgrund von Pipetten- und Membrankapazität sowie aufgrund von Verzögerung durch den Zugangswiderstand zu erklären (aus Molleman, 2003).

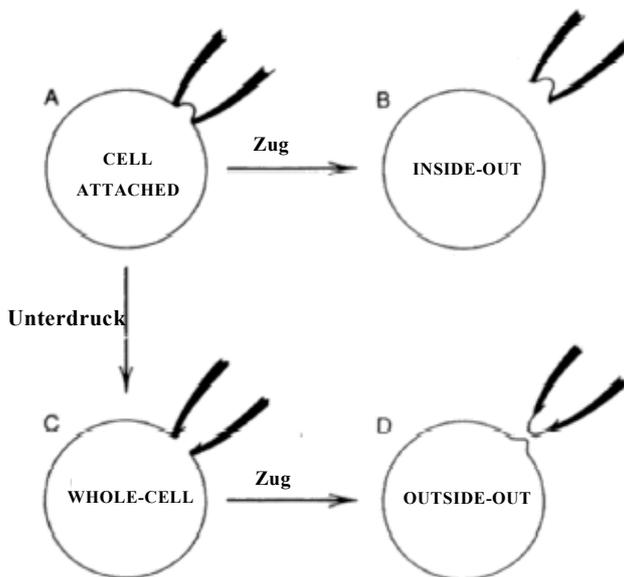


Abbildung 2.3: Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik. Nach Ausbilden des Cell-Attached-Modus gelangt man durch Ansetzen von Unterdruck bzw. Zug an der Pipette zu den gewünschten Konfigurationen (aus Corey & Stevens, 2004).

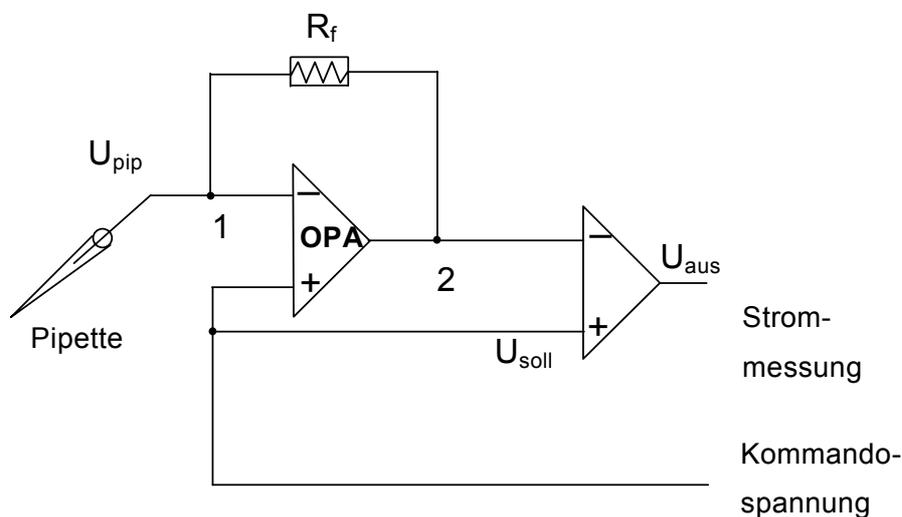


Abbildung 2.4: Schema des Strom-Spannungswandlers beim Patch-Clamp-Experiment. Legende: OPA – Operationsverstärker, R_f – Referenzwiderstand, U_{soll} – Kommandospannung, U_{pip} – Membranpotential, U_{aus} – Ausgangsspannung, Punkte 1 und 2 – siehe Haupttext (aus Numberger & Draguhn, 1996).

2.1.1 Experimentaufbau

Die Perfusion erfolgte mit Hilfe von Rollerpumpe und Schlauchsystem in einer Perfusionsrate von ca. 5 ml pro Minute. Für jedes Experiment wurde ein neues Deckglas mit Zellen verwendet. Inkubationsexperimente erforderten keinen Austausch von Badlösung während des Experiments. Die Perfusionskammer war auf einer horizontal beweglichen Arbeitsplatte befestigt, die horizontal in alle Richtungen bewegt werden konnte. Auf diese Weise war das Aufsuchen einer geeigneten Zelle möglich.

Die Patch- und die Referenzelektrode bestanden aus dünnen Silberdrähten, die mit einer Schicht Silberchlorid überzogen waren. Die Patchelektrode war mit einem elektrisch betriebenen Mikromanipulator verbunden (Scientific Precision Instruments SPI, Oppenheim/Rhein), der präzise dreidimensionale Bewegungen der Pipette ermöglichte. Weiterhin war die Pipette mit einem Schlauchsystem ausgestattet, um den Druck an der Pipettenspitze variieren zu können. Die Schläuche verbanden die Pipette über einen Dreiwegehahn mit einer Wassersäule oder einer Kolbenpumpe, so dass je nach Bedarf das Anlegen eines Über- oder Unterdruckes möglich war.

Die Position der Zellen und der Pipette wurde mit einem Invertmikroskop der Firma Zeiss und einer Kamera (Sony) verfolgt. Das Mikroskop, die Kamera sowie die Manipulatoreinheit (Abbildung 2.1) wurden auf einem schwingungsgedämpften Tisch angebracht, um mechanische Störeinflüsse zu vermeiden. Ein Faradaykäfig über dem schwingungsgedämpften Tisch diente der Vermeidung von Störeinflüssen durch Parasitärinduktivität. Signalübertragung und Datenerfassung erfolgten außerhalb des Faradaykäfigs mit Hilfe eines Patch-Clamp-Verstärkers (EPC-7, HEKA, Lamprecht), eines AD/DA-Wandlers (Batelle, Frankfurt) sowie eines Computers, der mit entsprechender Software (TIDA, Turbo Pascal Interface for Data Acquisition, HEKA) zur Datenaufnahme und -analyse ausgestattet war.

Alle Komponenten des Systems waren elektrisch geerdet.

2.1.2 Praktische Durchführung

Bei allen durchgeführten Experimenten wurde die Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik verwendet. Die Auswahl dieser Konfiguration hatte mehrere Gründe. Erstens blieb die Zelle als eine intakte biologische Einheit erhalten, was entscheidend für das Experimentdesign war. Zweitens lieferte die Exposition der gesamten Zellmembran eine Oberfläche für die Kanalinkorporation, die groß genug war, um alle neu eingebauten und aktiven Kanaleinheiten durch einen Stromanstieg sichtbar zu machen.

Im Verlauf eines Experimentes konnte nur die Zusammensetzung der Badlösung verändert werden, folglich wurden die Kanäle nur von der extrazellulären Seite her appliziert. Die Zugabe von kanalaktiven Substanzen in der Pipettenlösung hätte einen sofortigen Einbau der Kanäle zur Folge gehabt, so dass kein Unterschied zur Ausgangssituation hätte festgestellt werden können und somit die Fragestellung verfehlt worden wäre.

Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt. Wenige Minuten vor Experimentbeginn wurden frische Patchpipetten hergestellt. Als Material kamen dabei Röhrchen aus Borosilikatglas (Clark, Malsfeld) zum Einsatz, die mit Hilfe eines automatischen Pipettenziehgerätes (DMZ Universal Microelectrode Puller, Zeitz, Augsburg) in zwei Arbeitsschritten zu Patchpipetten umgeformt wurden. Die fertige Patchpipette wurde mit Pipettenlösung gefüllt und über die Patchelektrode gestülpt, nachdem sichergestellt wurde, dass die Pipette keine Luftbläschen in der Lösung enthielt.

Nach dem Übertragen des Deckglases mit den Zellen in die Perfusionskammer wurde mit Hilfe des Mikroskops und der Kamera eine adäquate Zelle ausgewählt. Runde, am Deckglasboden haftende Zellen wurden als geeignet angesehen. In der Lösung frei flottierende Zellen sowie Zellen mit unregelmäßiger Morphologie wurden nicht verwendet. Solche Zellen hielten häufig der elektrischen Stimulation nicht stand und brachen entweder auf oder verloren die Verbindung mit der Pipette.

Im nächsten Schritt wurde die Pipette eingetaucht und unter visueller Kontrolle vorsichtig mit Hilfe des Mikromanipulators in die Nähe der ausgewählten Zelle gebracht. Direkt nach dem Eintauchen der Pipette wurde der Pipettenwiderstand bestimmt, der zwischen 3-5 M Ω betrug. Dabei herrschte ein leichter Überdruck an der Pipettenspitze, um Verstopfung der

Spitze durch eventuelle Verschmutzungen zu vermeiden sowie die extrazelluläre Matrix der Zelle beim Zellkontakt fernzuhalten.

Zur Beurteilung der Experimentsituation verwendete man nach Eintauchen der Pipette zu Testzwecken einen 10 mV starken Spannungspuls von 30 ms Dauer. Dieser Testpuls ermöglichte die Bewertung von Pipettenwiderstand, die Kompensation des Offsetpotentials¹ und das korrekte Entstehen eines G Ω -Seals bzw. einer Whole-Cell-Konfiguration durch Beobachtung der Stromantwort. Dieser Testpuls war immer dann aktiv, wenn keines der Pulsprotokolle benutzt wurde (Kapitel 2.1.3).

Nach dem Berühren der Zelle mit der Pipettenspitze, was durch Abfall des Kontrollstromes sichtbar war, wurde das Kommandopotential auf -40 mV gesetzt. Dieses Potential entspricht etwa dem Ruhemembranpotential der BTM-Zellen und erleichterte somit die Formation eines G Ω -Seals. Anschließend wurde der positive Druck an der Pipettenspitze durch einen leicht negativen Druck ersetzt, indem die Stellung des Dreiwegehahns verändert und der Druckkolben vorsichtig betätigt wurde. Auf diese Weise wurde zuerst ein G Ω -Seal und durch weiteres Ansaugen schließlich die Whole-Cell-Konfiguration erreicht. Die Ausbildung eines G Ω -Seals wurde dann als erfolgreich angesehen, wenn der Teststrom auf < 10 pA beim Testpuls von 10 mV reduziert wurde. Der anschließende Aufbau einer Whole-Cell-Konfiguration war dann durch Anstieg der kapazitiven Ströme jeweils am Anfang und Ende des Pulses sichtbar (Abbildung 2.2). Vor Ansetzen eines Pulsprotokolls erfolgte die Kalkulation der Membrankapazität aus dem Integral unter den kapazitiven Stromspitzen, diese wurde soweit möglich über den Verstärker kompensiert. Der Zugangswiderstand wurde ebenfalls (auf einen Wert von 5 M Ω) kompensiert.

¹ Unter Offsetpotential versteht man alle Spannungen, die aufgrund von Übergängen zwischen unterschiedlichen Materialien und Lösungen entstehen, z.B. Silberdraht und Badlösung. Damit eine fehlerfreie Messung erfolgen kann, ist die Kompensation dieses Potentials vor Experimentbeginn notwendig.

2.1.3 Elektrische Stimulation und Pulsprotokolle

Abgesehen vom Testpuls vor Beginn des Experimentes wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Stimulations- oder Pulsprotokolle verwendet. Mit der ersten Stimulation, die aufgrund ihrer Dauer R50-Pulsprotokoll genannt wurde, erfolgte eine Momentaufnahme der zellulären Stromantwort auf verschiedene Potentiale. Ausgehend vom Initialwert von -40 mV (0 mV bei cäsiumhaltigen Lösungen), welcher etwa dem Ruhemembranpotential von BTM-Zellen entspricht, wurde die Zelle insgesamt 18 verschiedenen Spannungen von je 50 ms Dauer ausgesetzt. Die Amplitudendifferenz zwischen aufeinander folgenden Spannungsschritten betrug 10 mV. Mit den ersten 9 Schritten wurde die Zelle bis auf ein Potential von $+50$ mV depolarisiert, anschließend folgten 9 hyperpolarisierende Schritte bis zu einem Spannungswert von -130 mV (Abbildung 2.5). Dieses Protokoll ermöglichte die exakte Zuordnung der gemessenen Stromstärke zum exponierten Potential und somit die Berechnung einer Strom/Spannungskurve.

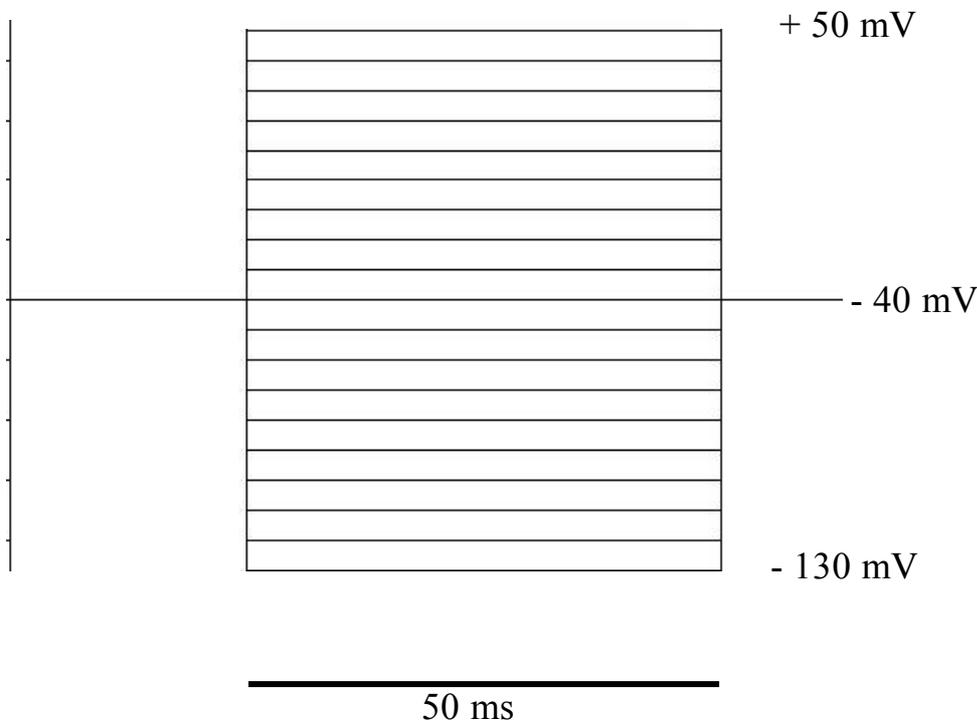


Abbildung 2.5: Schema des R50 - Pulsprotokolls. Spannungsangaben geben Werte am Pulsbeginn sowie Maximal- und Minimalpotential an.

Die zweite Stimulation, das Verlaufsprotokoll (Abbildung 2.6), war eine kontinuierliche Aufnahme über 125 s mit einer Aufnahme­frequenz von 100 Hz. Es wurde zur Beobachtung von akuten Veränderungen der Membranleitfähigkeit während des Experiments verwendet, insbesondere war es wichtig, solche Veränderungen direkt nach Applikation der untersuchten Substanzen zu verfolgen. Ähnlich wie beim R50-Protokoll wurde auch beim Verlaufsprotokoll das Ausgangspotential mit -40 mV gewählt. Anschließend wurde die Zelle insgesamt 10 Spannungsschritten von jeweils 100 ms Dauer ausgesetzt. Die Differenz zwischen den einzelnen Schritten betrug jeweils 20 mV, die maximalen Potentialamplituden erreichten jeweils Werte von -140 mV und 60 mV. Jedem Spannungsschritt folgte eine Neutralperiode (-40 mV/100ms). Das Ende der Sequenz bildete eine 500 ms lange Phase mit dem Neutralpotential von -40 mV. Die Stimulationssequenz dauerte insgesamt 2,5 s und wurde im Verlauf des Protokolls 50 Mal wiederholt.

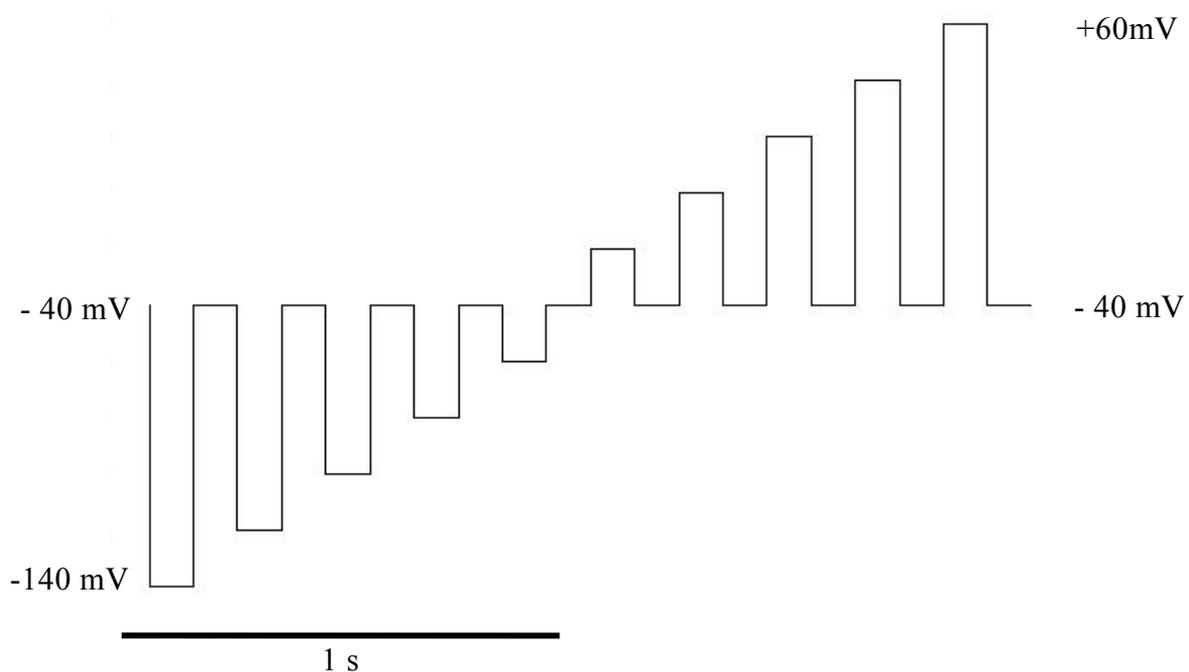


Abbildung 2.6: Stimulationssequenz des Verlaufsprotokolls. Spannungsangaben geben Ausgangswerte sowie Maximalwerte des angesetzten Potentials wieder.

2.1.4 Statistische Auswertung und Analyse

Pro Experimentserie lag die Gesamtzahl (**n**) der untersuchten Zellen zwischen 3 und 8. Alle Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert mit Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde je nach Experiment der t-Test für gepaarte oder ungepaarte Experimente verwendet. Bei gepaarten Versuchen kamen im Verlauf eines Experimentes verschiedene Lösungen, z.B. mit oder ohne kanalaktive Substanzen, zum Einsatz. Gepaarte Experimente verglichen die Werte von einer Zelle jeweils vor und nach Substanzgabe. Als ungepaartes Experiment wurde die Gegenüberstellung von Zellkohorten angesehen, die entweder mit reiner Badlösung oder mit Badlösung und gelöster Prüfsubstanz inkubiert wurden. Die geprüften Größen wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn das Ergebnis des t-Tests (P-Wert) kleiner als 0.05 war. Abhängig vom P-Wert wurden drei Signifikanzlevel definiert: * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$ sowie *** für $p < 0.001$.

Als primäre Zielvariablen wurden die Dichte und das Umkehrpotential der Ganzzellströme von BTM - Zellen nach Applikation der Substanzen definiert und mit den Ausgangswerten vor Substanzgabe verglichen.

Die Stärke der gemessenen Stromantwort einer Zelle ist proportional zur Zellgröße. Daher wurden zur Normierung gemessener Ströme auf die Zellgröße Stromdichten anstelle von Leitfähigkeiten herangezogen. Die **Stromdichte** wurde aus dem Quotienten aus gemessenem Gesamtstrom und Zellkapazität kalkuliert (pA/pF), da letztere direkt proportional zur Zellgröße ist. Zur genaueren Beurteilung wurden die Stromdichten von Auswärts- und Einwärtsströmen verglichen. Stromdifferenzen mit positivem Vorzeichen, die meist nach einer Depolarisation erfasst wurden, wurden als Auswärtsströme definiert. Dementsprechend wurden als Einwärtsströme Stromdifferenzen mit negativem Vorzeichen definiert.

Die **Auswärtsstromdichte** wurde aus der Stromantwort bei maximaler Depolarisation (+60 mV) und die **Einwärtsstromdichte** anhand der Stromstärke bei maximaler Hyperpolarisation (-140 mV) kalkuliert. Als **Gesamtstromdichte** wurde die Summe beider Werte betrachtet.

Die Veränderung des **Umkehrpotentials** wurde als Differenz des Umkehrpotentials vor und nach Substanzgabe festgestellt und in mV bestimmt. Dabei verstand man unter Umkehrpotential die Spannung, bei welcher der Membranstrom den Wert 0 einnahm.

Sekundäre Variablen waren die **Reaktionszeit** nach Substanzgabe bis zum ersten Anstieg der Leitfähigkeit (gemessen in s) sowie die **Geschwindigkeit des Stromanstiegs** (pA/s).

Um akute Veränderungen der Leitfähigkeit besser beurteilen zu können, wurden mehrere Verlaufsprotokolle eines Experiments in chronologischer Folge verbunden. Auf diese Weise war auf einer Abbildung der Verlauf des gesamten Experimentes sichtbar.

2.2 Zellpräparation

Bovine Augen wurden vom Schlachthof bezogen und innerhalb von 6 Stunden nach Tod des Tieres auf Eis ins Labor transportiert. Die Augen wurden unter einem Mikroskop unter semisterilen Bedingungen präpariert. Das Trabekelwerk wurde vom umgebenden Gewebe gelöst und in kurze Streifen geschnitten. Die Scheiben wurden anschließend in eine Petrischale überführt, mit einem Deckglas bedeckt und mit Zellmedium gefüllt, das 10% fetales Kälberserum enthielt. Die Petrischalen wurden in einem Brutschrank aufbewahrt, der auf 37° C temperiert und mit 5 % CO₂-haltiger Luft gefüllt war. Zweimal wöchentlich wurde das Medium ausgetauscht. Nach der Ausbildung einer konfluenten Zellschicht (Monolayer) wurden die Zellen unter Einsatz der Trypsin/EDTA-Methode passagiert. Dazu wurde das Medium aus der Schale entfernt, die Zellen mit einer Ca/Mg-freier PBS-Lösung gespült und die Schale mit 1ml Trypsinlösung gefüllt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37° C und anschließender mechanischer Agitation löste sich die Zellschicht vom Schalenboden. Die trypsinierten Zellen wurden mit neuem Medium versetzt und auf drei neue Schalen verteilt.

Für Experimente wurden nur Zellen aus der dritten Passage verwendet. Ähnlich dem Passageprozess wurde die Zellschicht mit Trypsin behandelt und mit frischem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen auf kleine Deckgläser verteilt und für 0.5-2.0 Stunden im Brutschrank inkubiert, damit sie erneut eine Haftung mit dem Deckglas entwickelten. Nach der Inkubationsperiode wurden die Deckgläser in die Perfusionskammer übertragen und mit Badlösung geflutet.

2.3 Substanzen und Lösungen

2.3.1 Zellkultur

Zellkulturmedien und Zusatzlösungen wurden von Biochrom (Berlin) bezogen. Für alle Prozeduren wurde die gleiche Zusammensetzung des Mediums verwendet. Diese bestand aus "Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)", das mit 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereichert war. Zusätzlich wurde für Passageprozeduren und Experimentvorbereitung zur enzymatischen Verdauung der Zellkontakte eine Trypsinlösung (Biochrom) verwendet. Die Spülung der Zellen erfolgte mit einer Ca/Mg-freien Lösung (PBS).

2.3.2 Lösungen für Patch-Clamp-Experimente

Für jedes Experiment waren je zwei Lösungen erforderlich, Bad- und Pipettenlösung. Da zwei verschiedene Kombinationen von Ladungsträgern getestet werden sollten, wurden zwei Sätze von Lösungen verwendet. Die Zusammensetzung des ersten Satzes entsprach physiologischen Bedingungen mit Natrium- und Kaliumionen als Ladungsträgern, dementsprechend war in der intrazellulären Lösung eine hohe Kaliumkonzentration, in der extrazellulären Lösung eine hohe Natriumkonzentration vorzufinden. Beim zweiten Satz wurde Natrium bzw. Kalium durch Cäsium ersetzt, um die Leitfähigkeit für dieses Ion zu prüfen. Die Konzentration übriger Ionen entsprach den physiologischen Konzentrationen. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für Patch-Clamp-Experimente. Alle Angaben bis auf pH in mmol/l.

Lösung	Bad 1	Bad 2	Pipette 1	Pipette 2
Ladungsträger	Na ⁺ /K ⁺	Cs ⁺	Na ⁺ /K ⁺	Cs ⁺
NaCl	141	10	10	10
CsCl	-	131	-	-
Cs-methansulfonat	-	-	-	119
KCl	4	4	-	-
K-glutamat	-	-	119	-
CaCl ₂	1.7	1.7	0.5	0.5
MgCl ₂	0.9	0.9	-	-
MgSO ₄	-	-	0.9	0.9
K ₂ HPO ₄	-	-	1	-
HEPES	10	10	10	10
Ca-EGTA	-	-	5.5	5.5
Glukose	5	5	-	-
pH	7.4	7.4	7.2	7.2

Die verwendeten Chemikalien wurden bei Sigma (München), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) erworben. Alle Lösungen wurden nach Zubereitung gefiltert und auf korrekte Osmolarität geprüft, welche zwischen 270 und 290 mosm/l lag. Um den pH-Wert stabil zu halten, wurden die Lösungen mit Tris/HEPES gepuffert. Der pH-Wert der Badlösung betrug 7.4 und der Pipettenlösung 7.2. Die Zugabe von Ca-EGTA in den Pipettenlösungen hatte die Pufferung der Calciumkonzentration auf exakt 12 nmol/l zum Ziel. Auf diese Weise wurde die Aktivierung von calciumabhängigen Maxi-K Kanälen reduziert, die in BTM Zellen exprimiert werden und einen bedeutenden Beitrag zur elektrophysiologischen Antwort der Zelle leisten (Wiederholt et al., 2000). Badlösungen wurden im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt und innerhalb von 7 Tagen aufgebraucht. Die Zugabe von Glukose erfolgte direkt vor Experimentbeginn. Pipettenlösungen wurden nach Herstellung in Eppendorfröhrchen mit

je 1ml Inhalt aliquotiert, bei -20° C eingefroren und nach Bedarf aufgetaut. Alle Lösungen wurden vor Experimentbeginn auf Raumtemperatur gebracht.

2.3.3 Synthetische Ionenkanäle

Mit Ausnahme von Gramacidin A, das bei Fluka (Buchs/CH) erworben wurde, wurden alle Substanzen durch das Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, vertreten durch Prof. Ulrich Koert, synthetisiert und für biologische Untersuchung zur Verfügung gestellt. Dazu gehörten THF-gram-TBDPS, THF-gram und linked-gram-TBDPS. Alle Substanzen waren säulenchromatographisch (HPLC) gereinigt. Die Synthese lieferte Feststoffe, daher wurden die Verbindungen in Methanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Nach Zugabe der gelösten Substanzen zur Badlösung überstieg die Konzentration der Lösungsmittel niemals den Anteil von 0.5%, bezogen auf das Volumenverhältnis (Vol./Vol.). In allen Experimenten wurden die Ionenkanäle extrazellulär appliziert; d.h. sie wurden ausschließlich der Badlösung zugeführt. Die Pipettenlösung war jederzeit frei von den untersuchten Substanzen.

3 Ergebnisse

In der Whole-Cell-Konfiguration waren stabile Aufnahmen zwischen 5-20 min möglich. Längere Aufnahmezeiten wurden durch Instabilität der hochohmigen Zell-Pipettenverbindung sowie durch Aufbrechen der Zellmembran verhindert. Die Kontrolle der Membranleitfähigkeit erfolgte mittels Messung von Membranströmen unter Einsatz von zwei Pulsprotokollen (Kapitel 2.1.3). Es wurden nur Zellen eingeschlossen und den untersuchten Substanzen ausgesetzt, deren Kontrollströme über eine Zeitspanne von mindestens 5 min stabil waren.

Aufgrund der komplexen Synthese war die Verfügbarkeit der untersuchten Substanzen limitiert, was nur eine beschränkte Anzahl von Experimenten pro Experimentserie ermöglichte.

3.1 Kontrollexperimente

Messungen mit verschiedenen Ladungsträgern (Na^+/K^+ oder Cs^+) wurden separat analysiert. Kontrollwerte für Stromdichte, Zellkapazität, Zellwiderstand und Umkehrpotential wurden vor Applikation der untersuchten Substanzen aufgenommen. In jedem Experiment wurden die Zellströme nach Erreichen des Whole-Cell-Modus über 60-120 s ohne Substanzapplikation aufgenommen. Somit konnte die Registrierung der Kontrollwerte erfolgen sowie instabile oder oszillierende Zellen ausgeschlossen werden.

BTM-Zellen zeigten eine Gesamtstromdichte von $4.0 \pm 0.5 \text{ pApF}^{-1}$ ($n = 69$) für Na^+/K^+ und $5.2 \pm 0.4 \text{ pApF}^{-1}$ ($n = 31$) für Cs^+ als Ladungsträger. Bei beiden Ladungsträger war der Anteil der Auswärtskomponente am Gesamtstrom mit $69.5 \pm 1.1 \%$ für Na^+/K^+ ($p < 0.001$) sowie $75.8 \pm 1.7 \%$ ($p < 0.001$) für Cs^+ stärker als die Einwärtskomponente. Die Zellkapazität wurde mit $60.3 \pm 5.4 \text{ pF}$ (Na^+/K^+ , $n = 69$) beziehungsweise $62.5 \pm 9.0 \text{ pF}$ (Cs^+ , $n = 31$) gemessen. Der Zugangswiderstand der Zellen betrug vor Kompensation $10.1 \pm 0.6 \text{ M}\Omega$ bei Na^+/K^+ und $11.1 \pm 1.0 \text{ M}\Omega$ bei Cs^+ . Bei den genannten Werten wurde zwischen verschiedenen Ladungsträgern kein Unterschied festgestellt. Die Betrachtung der Kontrollwerte von Umkehrpotentialen ergab jedoch, dass unter Cs^+ -haltigen Bedingungen das Umkehrpotential

mit -15.9 ± 2.8 mV signifikant positiver ($p < 0.001$) als in physiologischer Umgebung war. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht für die beiden verwendeten Lösungskombinationen wieder.

Tabelle 3.1 Kontrollwerte von BTM-Zellen für verschiedene Lösungen/Ladungsträger, die durch gemessene Ströme von Na^+/K^+ oder Cs^+ Ionen repräsentiert waren. Die Werte waren voneinander nicht signifikant unterschiedlich. Die einzige Größe, die einen signifikanten Unterschied zeigte, war das Umkehrpotential (fett markiert).

Ladungs-träger	Umkehrpotential (mV)	Stromdichte (pApF^{-1})	Zellkapazität (pF)	Zellwiderstand ($\text{M}\Omega$)	Zellanzahl (n)
Na^+/K^+	-39.2 ± 1.7 mV	4.0 ± 0.5	60.3 ± 5.4	10.1 ± 0.6	69
Cs^+	-15.9 ± 2.8 mV	5.2 ± 0.4	62.5 ± 9.0	11.1 ± 1.0	31

Um einen möglichen Einfluss der Lösungsmittel auf die Stromantwort auszuschließen, wurden BTM-Zellen nach extrazellulärer Applikation von 0.5% DMSO (Vol./Vol.) bzw. 0.5% Methanol untersucht. Die gewählte Konzentration von 0.5 % der Badlösung entsprach der maximal verwendeten Konzentration, um künstliche Ionenkanäle in Lösung zu bringen.

10 min nach Applikation von 0.5% DMSO veränderte sich die Stromdichte der BTM-Zellen auf 92.2 ± 9 % ($n = 3$) des Ausgangwertes. Das Umkehrpotential veränderte sich entsprechend um $\Delta +1.0 \pm 1.5$ mV ($n = 3$). In ähnlicher Weise bewirkte eine 0.5%-ige Konzentration von Methanol in der Badlösung eine Veränderung der Stromdichte auf 97.3 ± 11.3 % ($n = 3$) des Ausgangwertes und eine Verschiebung des Umkehrpotentials um $\Delta -0.53 \pm 2.8$ mV ($n = 3$). Die Werte vor und nach Applikation von DMSO bzw. Methanol waren voneinander nicht signifikant unterschiedlich. Abbildung 3.1 zeigt Verlaufsprotokolle von Zellen, die mit DMSO bzw. Methanol inkubiert wurden.

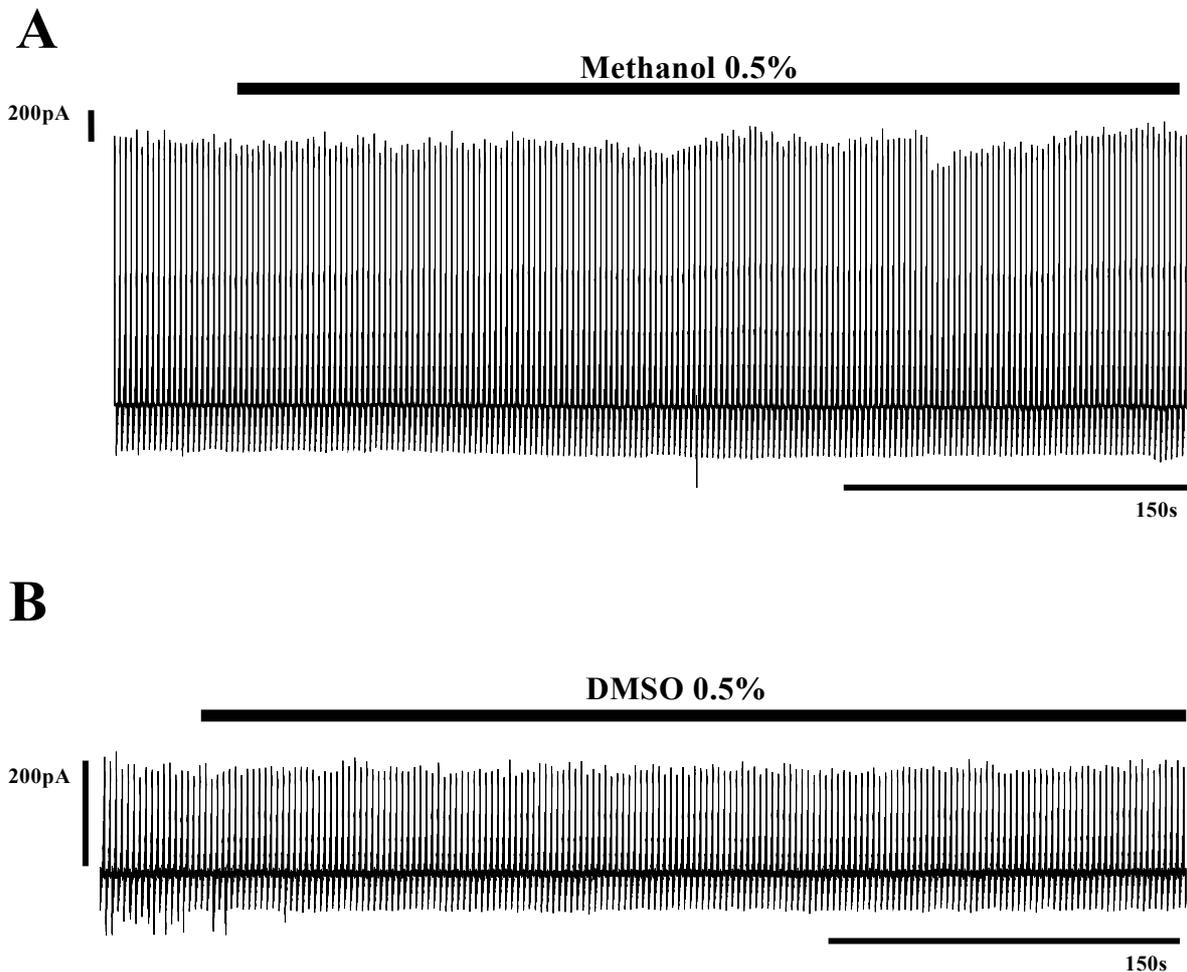


Abbildung 3.1 Verlaufsprotokolle von BTM-Zellen, die entweder Methanol (A) oder DMSO (B) in einer Konzentration von 0.5% ausgesetzt wurden. Das Experiment mit Methanol wurde mit einer intrazellulären Lösung durchgeführt, welche nicht mit Ca-EGTA gepuffert war. Dies führte zu einer starken Aktivierung von auswärtsrektifizierenden, calciumabhängigen Maxi-K-Kanälen, sichtbar an der starken Stromantwort nach Depolarisation. Um diese Aktivierung zu vermeiden und mögliche Effekte künstlicher Ionenkanäle besser erkennbar zu machen, wurde in allen folgenden Experimenten inklusive des DMSO-Kontrollversuchs (B) mit Hilfe vom Ca-EGTA-Puffer die intrazelluläre Calciumkonzentration bei 12 nM (siehe Methoden) aufrechterhalten. Die niedrige Konzentration hatte wie erwartet eine Reduktion der Auswärtsströme zur Folge, was auf die schwächere Aktivierung von Maxi-K-Kanälen zurückzuführen war.

3.2 THF-gram

Der Einfluss von THF-gram auf die Leitfähigkeit von BTM-Zellen wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^{-6} M und 10^{-8} M untersucht. Bei diesen Konzentrationen zeigten die Zellen einen eindeutigen Anstieg der Membranstromdichte mit einer ausgeprägten Auswärtskomponente sowie eine Veränderung des Umkehrpotentials in Richtung positiverer Werte. Die maximale Ausprägung der Effekte war in einem Zeitraum zwischen 10 – 15 min nach Applikation von THF-gram zu beobachten. Eine Konzentrationsabhängigkeit wurde für die Zeitspanne zwischen Beginn der Substanzapplikation und erstem Effekteintritt festgestellt. In keinem der Experimente wurden Auswascheffekte beobachtet, die Veränderungen der Stromantwort blieben auch bei Spülung der Zellen mit substanzfreier Badlösung erhalten.

3.2.1 Experimente mit Na^+/K^+ als Ladungsträger

Unter physiologischen Bedingungen, d.h. mit Natrium- und Kaliumionen als Ladungsträger, wurde unter Verwendung einer THF-gram-Konzentration von 10^{-6} M ein Anstieg der Gesamtstromdichte um $\Delta +5.8 \pm 2.0 \text{ pApF}^{-1}$ ($n = 7$) beobachtet. Unter Kontrollbedingungen betrug dabei die Stromdichte $3.0 \pm 0.6 \text{ pApF}^{-1}$ und stieg auf den Maximalwert von $8.8 \pm 2.0 \text{ pApF}^{-1}$ nach Substanzapplikation. Bei 70% der untersuchten BTM-Zellen war ein Effekt zu beobachten, die restlichen Zellen zeigten keine Änderung der Stromantwort auf THF-gram. Die veränderte Leitfähigkeit der Zellmembran führte zu einer Verlagerung des Umkehrpotentials um $\Delta +12.1 \pm 3.4 \text{ mV}$ ($n = 7$) vom Initialwert von $-48.1 \pm 4.8 \text{ mV}$, so dass das Umkehrpotential nach Substanzgabe $-36.0 \pm 2.1 \text{ mV}$ betrug. Die beobachteten Veränderungen waren signifikant unterschiedlich zu Kontrollwerten (Abbildung 3.2). Eine exemplarische Darstellung der THF-gram-Effekte auf die Zellantwort ist in Abbildung 3.3 sowie Abbildung 3.4 dargestellt.

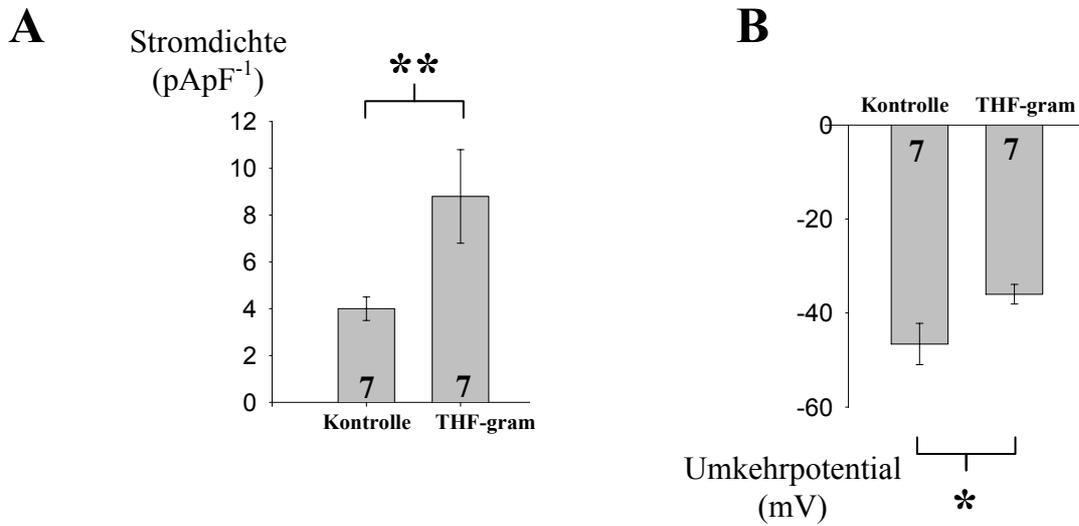


Abbildung 3.2 Gegenüberstellung von Membranstromdichte (A) sowie Umkehrpotential (B) jeweils vor und nach Applikation von THF-gram (10^{-6} M). Die dargestellten Balken repräsentieren Mittelwerte mit eingezeichneten Standardfehlerbereichen, Zahlen beziehen sich auf die untersuchte Zellzahl, der Asterisk auf den Signifikanzlevel der Differenz beider Balken.

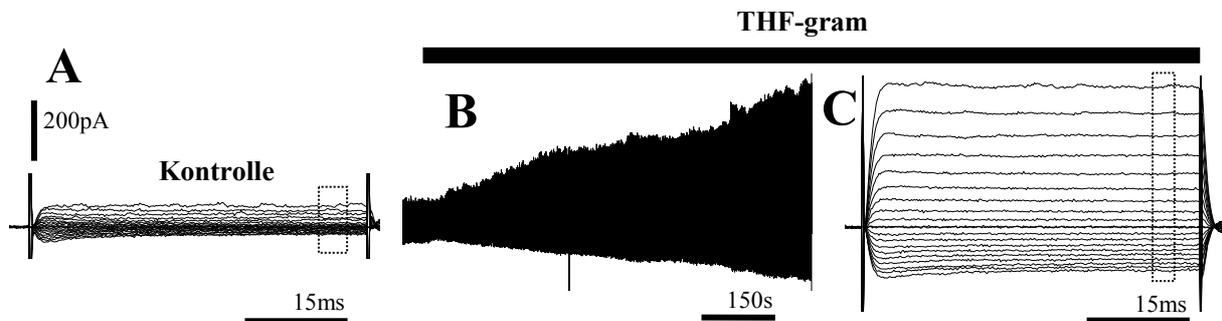


Abbildung 3.3 Effekt der THF-gram-Applikation (10^{-6} M) auf Membranströme einer BTM-Zelle. R50-Protokolle (A und C) zeigen die Stromantwort auf Hyper- bzw. Depolarisation jeweils vor und nach Substanzgabe, das Verlaufprotokoll (B) dokumentiert die kontinuierliche Zunahme der Leitfähigkeit (der Balken zeigt die Applikationsdauer an).

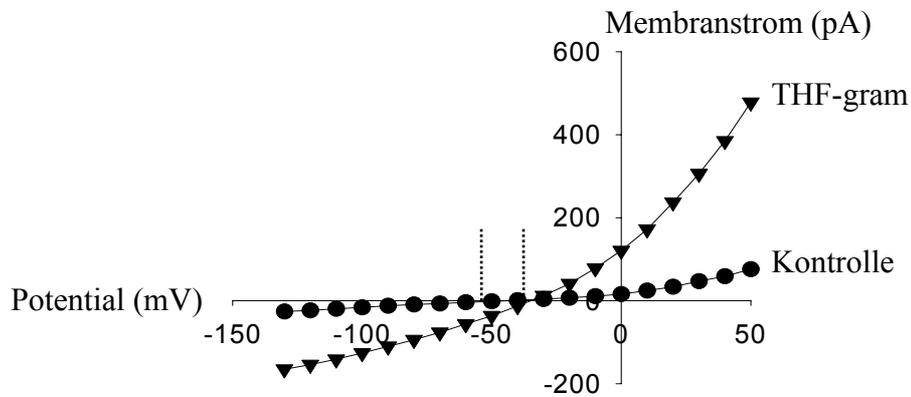


Abbildung 3.4 Im Diagramm werden die Strom/Spannungslinien dargestellt, die jeweils aus den Protokollen von Abbildung 3.3 A und C kalkuliert wurden. Die Änderung des Kurvensteilheit verdeutlicht dabei den Anstieg der Leitfähigkeit, die Verlagerung des Schnittpunktes mit der X-Achse (punktierter Linien) die Änderung des Umkehrpotentials.

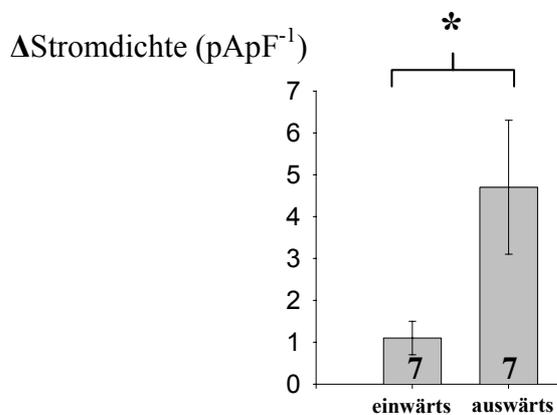


Abbildung 3.5 Vergleich der maximalen zusätzlichen (Δ) Auswärts- und Einwärtsstromdichten nach THF-gram-Applikation bei einer Konzentration von 10^{-6} M. Die Werte für beide Balken wurden aus Ergebnissen kalkuliert, die von gleichen Zellen stammten.

Der durch THF-gram induzierte Anstieg der Stromdichte war asymmetrisch. Der Anstieg der Auswärtsstromdichte war bei der Konzentration von 10^{-6} M mit $\Delta+4.7 \pm 1.6$ pApF $^{-1}$ (n = 7) stärker ausgeprägt als der Anstieg der Einwärtskomponente, der bei $\Delta+1.1 \pm 0.4$ pApF $^{-1}$ (n = 7) lag. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Abbildung 3.5). Untersuchungen mit geringeren Konzentrationen von THF-gram (10^{-7} M und 10^{-8} M), zeigten ein Verhalten von BTM-Zellen, das mit den Resultaten bei 10^{-6} molarer Konzentration vergleichbar war. Bei beiden Konzentrationen führte die Exposition mit THF-gram zu einem Anstieg der Leitfähigkeit sowie einer Verlagerung des Umkehrpotentials in Richtung positiver Werte.

Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Veränderungen der Stromantwort nach Applikation von THF-gram traten mit einer zeitlichen Verzögerung auf, die von der verwendeten Konzentration abhängig war. Bei einer Konzentration von 10^{-6} M waren erste Effekte 103 ± 26 s ($n = 7$) nach Beginn der Applikation sichtbar. Eine geringere Konzentration hatte eine größere Verzögerung der Stromantwort zur Folge, mit 119.0 ± 48.3 s ($n = 4$) bei 10^{-7} M und 240.4 ± 39.8 s ($n = 5$) bei 10^{-8} M. Die Reaktionszeiten bei verschiedenen Konzentrationen waren voneinander bei folgenden Gegenüberstellungen signifikant unterschiedlich: 10^{-6} vs. 10^{-8} M sowie 10^{-7} vs. 10^{-8} M (Abbildung 3.6). Folglich wurde die Reaktionszeit zwischen THF-gram-Applikation und erstem beobachteten Effekt als konzentrationsabhängig im Bereich 10^{-6} - 10^{-8} M beurteilt.

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der Experimente mit THF-gram für die Konzentrationen 10^{-7} M and 10^{-8} M. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Sternchen deuten den Signifikanzlevel an. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: D_0 – Stromdichte unter Kontrollbedingungen; D_S – Stromdichte nach Substanzapplikation; D_{in} – zusätzliche (Δ) Einwärtsstromdichte nach Substanzapplikation; D_{out} – zusätzliche (Δ) Auswärtsstromdichte nach Substanzapplikation; P_0 – Umkehrpotential unter Kontrollbedingungen; P_S – Umkehrpotential nach Substanzapplikation; n.s. – nicht signifikant.

Konzentration (mol/l)	10^{-7}	10^{-8}
Anzahl reagierender Zellen	4	5
Anzahl untersuchter Zellen	5	6
Verhältnis reagierende/untersuchte Zellen in %	80	83
D_0 in pApF ⁻¹	4.4 \pm 1.8	8.9 \pm 4.9
D_S in pApF ⁻¹	11.5 \pm 3.4	17.7 \pm 5.9
Differenz $\Delta D_S - D_0$ in pApF ⁻¹	7.1 \pm 1.7	8.8 \pm 2.5
p-Wert von $\Delta(D_S - D_0)$, Signifikanzlevel	0.024, *	0.023, *
D_{In} in pApF ⁻¹	2.8 \pm 1.4	2.6 \pm 1.2
D_{Out} in pApF ⁻¹	4.4 \pm 1.1	6.2 \pm 1.5
p-Wert of D_{In} vs. D_{Out} , Signifikanzlevel	0.41, n.s.	0.033 *
P_0 in mV	-42.7 \pm 7.5	-47.5 \pm 15.5
P_S in mV	-22.3 \pm 10.5	-32.0 \pm 12.5
$\Delta(P_S - P_0)$ in mV	20.3 \pm 7.7	15.5 \pm 3.4
p- Wert of $\Delta(P_S - P_0)$, Signifikanzlevel	0.094, n.s.	0.019, *

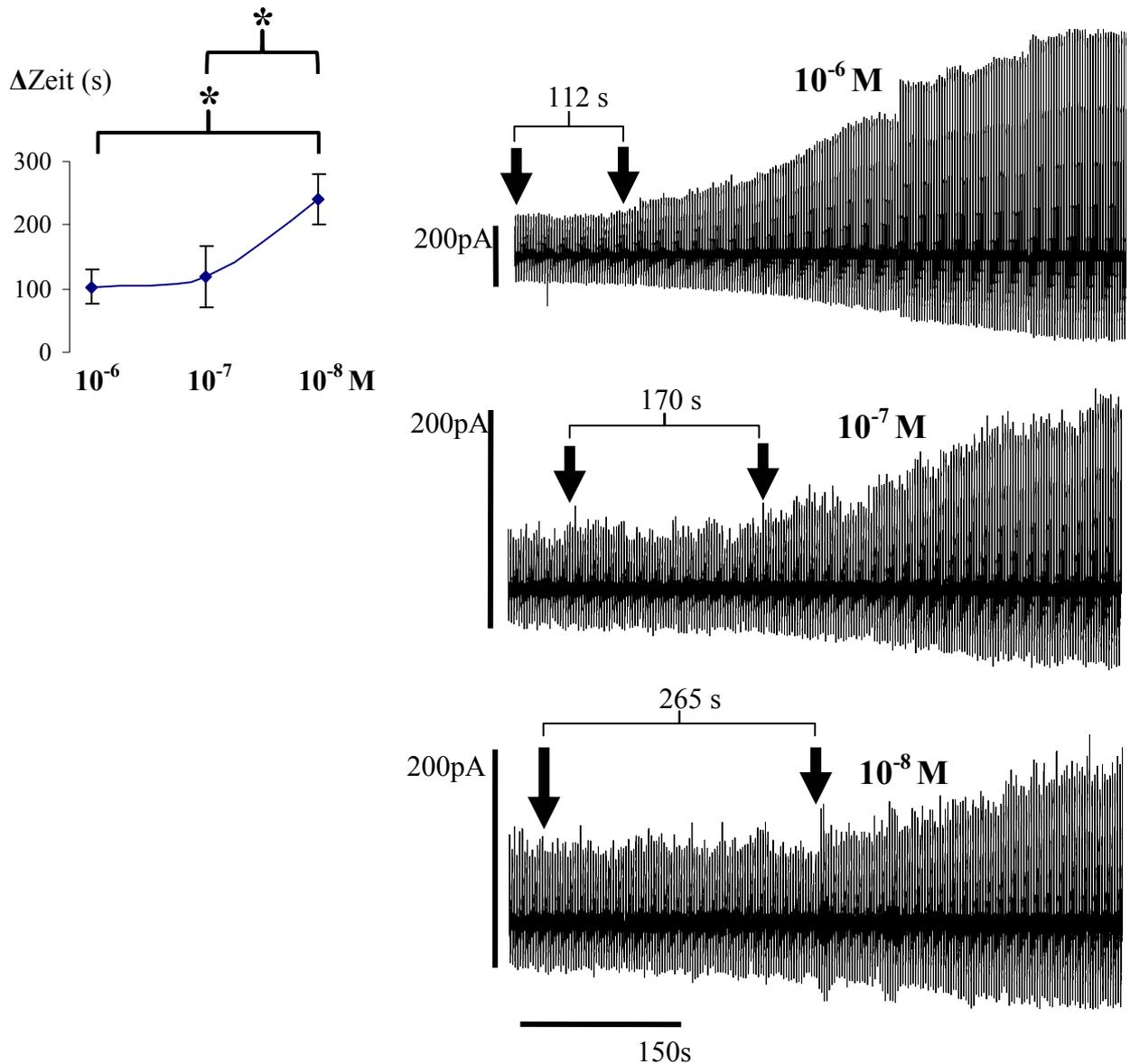


Abbildung 3.6 Konzentrationsabhängigkeit von THF-gram tritt als zeitliche Verzögerung des Stromanstiegs nach Substanzapplikation in Erscheinung. Die Abbildungen zeigen Verlaufsprotokolle von drei Zellen, denen THF-gram in abnehmender Konzentration (10^{-6} – 10^{-8} M von oben nach unten) appliziert wurde. Pfeile deuten jeweils auf den Applikationsbeginn sowie auf den ersten Stromanstieg. Im Diagramm (links) ist die verwendete Konzentration gegen die zeitliche Verzögerung des Effekteintritts aufgetragen. Alle Angaben als Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2.2 Experimente mit Cs⁺ als Ladungsträger

In Experimenten mit künstlichen Membranen wurde für THF-gram eine Ionenselektivität in folgender Reihenfolge festgestellt: NH₄⁺ > Cs⁺ > K⁺ > Na⁺. Diese Selektivität entspricht der Eisenmanreihe I für Kationen (Schrey et al., 2000). Damit das Selektivitätsverhalten auch in BTM-Zellen untersucht und mögliche Unterschiede in der Stromdichte und Antwortmuster erkannt werden konnten, wurde die Wirkung von THF-gram mit Cäsium als Ladungsträger überprüft (Kapitel 2.3.2). Dabei wurde eine THF-gram-Konzentration von 10⁻⁶ M verwendet. Unter diesen Bedingungen zeigten 62.5 % der untersuchten BTM-Zellen eine Veränderung von Stromdichte und Umkehrpotential nach Applikation von THF-gram. Der Anstieg der Stromdichte betrug bei reagierenden Zellen $\Delta+17.5 \pm 2.6$ pApF⁻¹, das Umkehrpotential verschob sich um $\Delta+4.6 \pm 1.0$ mV von initial -9.0 ± 2.4 mV auf -4.4 ± 2.6 mV nach Applikation (n = 5). Sowohl für die Stromdichte (p = 0.0026) als auch für das Umkehrpotential (p = 0.009) waren die Veränderungen statistisch signifikant. Überraschenderweise wurde auch unter cäsiumhaltigen Bedingungen eine Asymmetrie der Stromantwort festgestellt, die ähnlich der Reaktion unter physiologischen Bedingungen (Na⁺/K⁺) war. Der Anstieg der Auswärtsstromdichte ($\Delta+12.4 \pm 2.0$ pApF⁻¹, n = 5) war signifikant höher (p = 0.009) als der Wert für die zusätzliche Einwärtsstromdichte, der bei $\Delta+5.1 \pm 0.8$ pApF⁻¹ (n = 5) lag. Die zeitliche Verzögerung zwischen Applikationszeitpunkt und Effekteintritt betrug unter Cs⁺ 61.2 ± 18.1 s (n = 5).

3.2.3 Vergleich von Effekten zwischen verwendeten Ladungsträgern

Beim Vergleich der Effekte von THF-gram unter verschiedenen Ladungsträgern (also Na⁺/K⁺ vs. Cs⁺) ergab die Auswertung folgende Resultate: zusätzliche Stromdichte nach THF-Applikation war signifikant höher für Cs⁺ als für Na⁺/K⁺ (Abbildung 3.7). Die Asymmetrie der Stromantwort war bei Cs⁺ als Ladungsträger jedoch schwächer ausgeprägt als unter physiologischen Bedingungen. Die zusätzliche Einwärtsstromdichte betrug bei Na⁺/K⁺ $23 \pm 3.1\%$ (n = 7) der Auswärtsstromdichte und war damit deutlich kleiner als der entsprechende Anteil unter Verwendung von Cs⁺, der bei $42.2 \pm 5.2\%$ (n = 5) lag. Ein Vergleich der Umkehrpotentiale war nur bedingt möglich, da bereits die Verwendung von Cs⁺ im

Kontrollexperiment das Umkehrpotential in positiver Richtung verschob (Kapitel 3.1). Was die Reaktionszeit betrifft, zeigten die Zellen bei vergleichbarer Konzentration keinen signifikanten Unterschied zwischen Cs^+ and Na^+/K^+ . BTM-Zellen, die mit Cs^+ -haltiger Lösung versetzt wurden, zeigten jedoch eine leichte Tendenz zu schnellerer Reaktion (61 ± 18 s; $n = 5$) als Zellen, die mit physiologischer Lösung gespült waren (103 ± 26 s; $n = 7$).

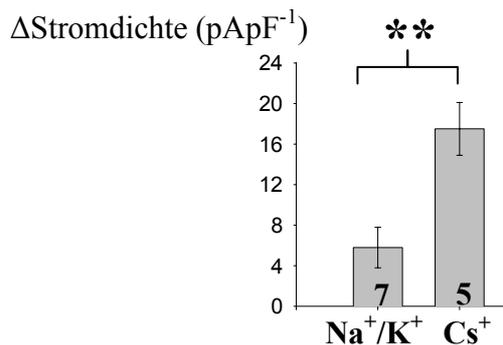


Abbildung 3.7 Der durch THF-gram (10^{-6} M) induzierte Anstieg der Stromantwort war von den verwendeten Lösungsträgern abhängig. Das Balkendiagramm zeigt mittlere Stromdichten sowie Standardfehlerbereiche für unterschiedliche Ladungsträger.

3.3 THF-gram-TBDPS

Aufnahmen von Strömen in Bilayer-Membranen hatten gezeigt, dass das Anhängen von TBDPS-Schutzgruppen die Kanaleigenschaften der THF-gram-Hybride verändern kann (Schrey et al., 2000). Um die Wirkung der geschützten Verbindung auf die Stromantwort von BTM-Zellen zu untersuchen sowie mögliche Unterschiede gegenüber dem ungeschützten THF-gram zu ermitteln, wurde das Verhalten der Zellen nach Applikation von THF-gram-TBDPS untersucht. Übereinstimmend mit den Resultaten aus Bilayerexperimenten wurde festgestellt, dass unter THF-gram-TBDPS der Einfluss auf die Stromantwort schwächer ausfiel als unter THF-gram. Auch in diesem Fall waren die Veränderungen nach Substanzapplikation durch Auswaschen nicht reversibel. Signifikante Effekte wurden nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-7} M beobachtet, ab einer Konzentration von 10^{-8} M waren keine Veränderungen sichtbar (Tabelle 3.3). Konsistent mit

der schwachen Antwort war auch der geringe Anteil der reagierenden Zellen, der bei 10^{-6} M nur bei 30% der untersuchten Zellen lag. Daher wurde eine zweite Experimentreihe durchgeführt, bei der die Zellen über 1 Stunde mit THF-gram-TBDPS inkubiert wurden. Diese Experimentreihe diente dazu, mögliche Effekte nach längerer Substanzexposition aufzudecken.

3.3.1 Akute Experimente mit Na^+/K^+ als Ladungsträger

Nach Zugabe von THF-gram-TBDPS (10^{-6} M) zur Badlösung und anschließender Applikation zeigten 7 von 23 BTM-Zellen ($\approx 30\%$) signifikante Veränderungen im elektrophysiologischen Verhalten. Die maximale Stromantwort trat 15-20 min nach Applikation auf, erste Effekte waren nach 204.6 ± 44.5 s ($n = 7$) sichtbar. Die Stromdichte stieg signifikant ($p = 0.04$) von initial 3.6 ± 0.8 pApF $^{-1}$ bis auf 9.6 ± 3.1 pApF $^{-1}$ an ($\Delta +6.0 \pm 2.4$ pApF $^{-1}$, $n = 7$). Eine signifikante Verschiebung des Umkehrpotentials von -37.7 ± 6.0 auf -16.7 ± 4.8 mV ($\Delta +21.0 \pm 4.5$ mV, $n = 7$, $p = 0.003$) konnte ebenfalls festgestellt werden. Abbildung 3.8 zeigt eine exemplarische Stromantwort einer BTM-Zelle nach Applikation von THF-gram-TBDPS.

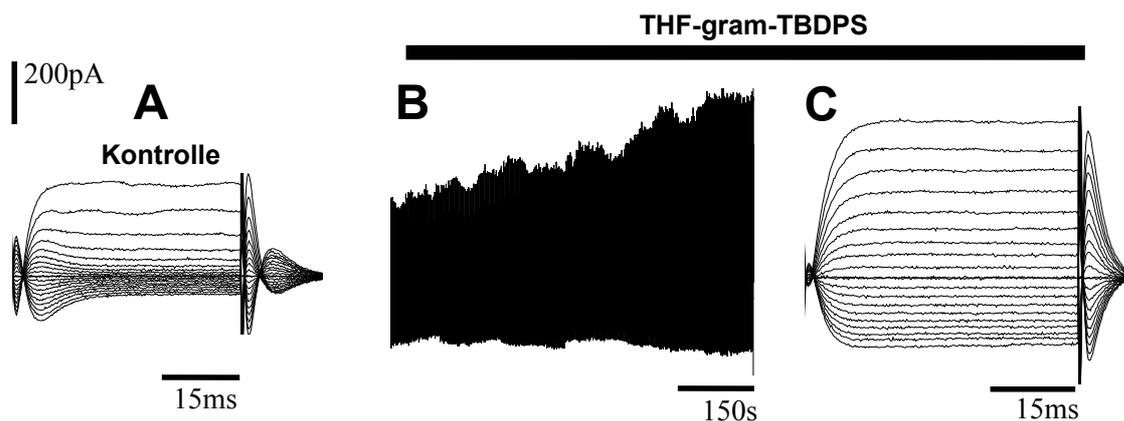


Abbildung 3.8 Elektrophysiologische Antwort von BTM-Zellen auf Applikation von THF-gram-TBDPS (10^{-7} M). Die Abbildungen zeigen respektive Stromaufzeichnungen unter Kontrollbedingungen (A) und nach Substanzapplikation (B und C). Schwarzer Balken zeigt die Applikationszeit.

Eine Asymmetrie zwischen der Auswärts- und Einwärtsstromdichte konnte bei THF-gram-TBDPS nicht beobachtet werden. Einige untersuchte Zellen zeigten zwar eine leichte Tendenz zu höherer Auswärtsstromdichte ($3.9 \pm 1.9 \text{ pApF}^{-1}$ auswärts vs. $3.5 \pm 2.1 \text{ pApF}^{-1}$ einwärts; $n = 7$), dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

In Einzelkanalmessungen fand man heraus, dass Gadoliniumionen (Gd^{3+}) eine inhibitorische Wirkung auf die Kanalaktivität von THF-gram-TBDPS ausüben (*nicht veröffentlichte Beobachtung aus dem Institut für Chemie, HU Berlin, Prof. Koert*). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch in biologischen Membranen auftritt, wurden diejenigen BTM-Zellen, die einen Stromanstieg zeigten, im Anschluss an die Applikation von THF-gram-TBDPS mit Gd^{3+} ($0.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) behandelt. Die initiale Stromamplitude von $185.2 \pm 51.7 \text{ pA}$ stieg nach Zugabe von THF-gram-TBDPS bis auf $622.0 \pm 268.5 \text{ pA}$. Anschließende Applikation von Gd^{3+} reduzierte den Strom auf $211.5 \pm 82.0 \text{ pA}$ (Abbildung 3.9) und somit auf einen mit der Kontrolle vergleichbaren Wert. Aufgrund einer sehr geringen Fallzahl von $n=4$ wurde für die beobachteten Effekte eine statistische Signifikanz nicht erreicht, der p-Wert betrug 0.14 für die zusätzlichen Ströme nach THF-gram-TBDPS Applikation versus Kontrolle und 0.2 für die Reduktion dieser Ströme nach Zugabe von Gd^{3+} . Bei Kontrollversuchen stellte sich jedoch heraus, dass bei unbehandelten Zellen die Applikation von Gd^{3+} auch die natürliche Stromantwort reduziert bzw. fast komplett auslöscht. Gadolinium ist bekannt als unspezifischer Inhibitor von Ionenkanälen (Popp et al., 1993). Da nicht unterschieden werden konnte, ob die Stromreduktion durch Gd^{3+} auf Inhibition natürlicher oder künstlicher Kanäle zurückzuführen war und somit kein weiterer Erkenntnisgewinn erfolgen konnte, wurde auf weitere Experimente mit Gd^{3+} verzichtet.

3.3.2 Inkubationsexperimente

Bei kurzzeitiger Exposition (10-15 min) mit THF-gram-TBDPS zeigte nur ein geringer Anteil von BTM-Zellen eine Reaktion im Sinne eines Stromanstiegs. Um herauszufinden, ob die Reaktion nach längerer Exposition bei einem größeren Prozentsatz der Zellen auftritt oder ob die Stromantwort ein verändertes Bild zeigt, wurde nach üblicher Präparation (Kapitel 2.3.1) ein zusätzlicher Schritt eingeführt. In diesem Schritt wurden die Zellen vor

Versuchsbeginn eine Stunde lang im serumfreien Medium inkubiert, das mit 10^{-6} M THF-gram-TBDPS versetzt war. Inkubation in Serum mit 0.5% DMSO diente als Negativkontrolle. Da Kontroll- und Zielwerte bei diesem Experimentdesign von verschiedenen Zellen stammten, wurde zur statistischen Analyse der T-Test für nicht gepaarte Experimente verwendet.

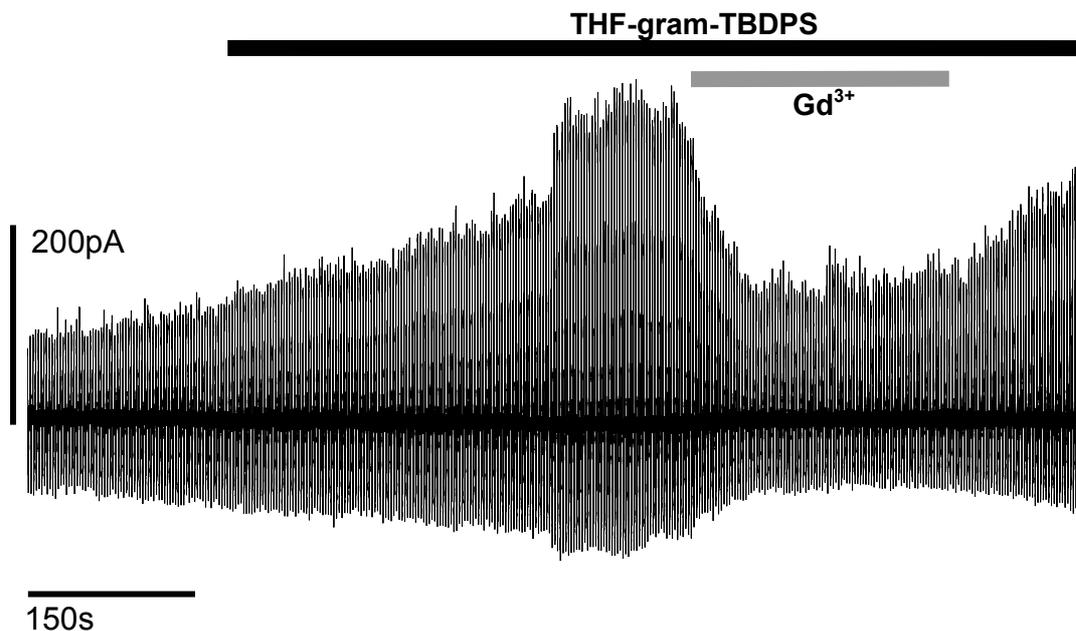


Abbildung 3.9 Einfluss von Gd³⁺ auf Stromantwort nach Applikation von THF-gram-TBDPS. Gd³⁺ ($0.5 \cdot 10^{-3}$ M) reduzierte den THF-gram-TBDPS (10^{-6} M) induzierten Stromanstieg wieder auf Ausgangswerte. Nach Auswaschen von Gd³⁺ setzte sich der Anstieg der Leitfähigkeit fort.

Die Verlängerung der Expositionszeit führte tatsächlich zu einer größeren Zahl reagierender Zellen (sog. responder). In 35 von 41 ($\approx 85\%$) Patch-Clamp-Experimenten zeigten die untersuchten Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich höhere Stromdichten sowie eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiveren Werten. Die Stromdichten betragen 7.1 ± 1.6 pApF⁻¹ (n = 35) für Zellen, die mit THF-gram-TBDPS inkubiert wurden sowie 2.4 ± 0.5 pApF⁻¹ (n = 10) bei den Kontrollen. Konsistent dazu lag das Umkehrpotential von behandelten Zellen bei -6.3 ± 2.1 mV (n = 35), was deutlich positiver als das

Kontrollpotential war $(-20.9 \pm 6.0 \text{ mV}; n = 10)$. Sowohl die Werte für Stromdichte als auch für das Umkehrpotential waren signifikant unterschiedlich ($p < 0.01$) zwischen Kontrolle und Inkubation mit THF-gram-TBDPS. Abbildung 3.10 zeigt die Verteilung der Umkehrpotentiale bei Zellen, die mit THF-gram-TBDPS inkubiert wurden.

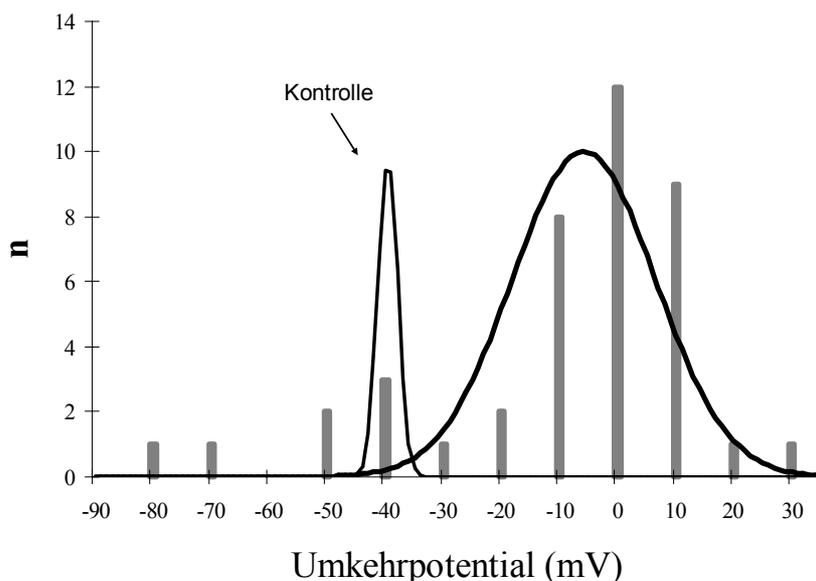


Abbildung 3.10 Umkehrpotentiale von BTM-Zellen nach Inkubation mit THF-gram-TBDPS (10^{-6} M) über 1h. Für eine übersichtliche Darstellung wurden die erfassten Potentiale in Spannungsbereiche von jeweils 10 mV aufgeteilt, die bei -85 bis -76 mV begannen und bei +25 bis +34 mV endeten. Im Diagramm beziehen sich die Balken auf die jeweiligen Fallzahlen in den Spannungsbereichen, die fettmarkierte Kurve spiegelt die Gaußverteilung wieder, die von der gesamten mit THF-gram inkubierten Zellpopulation berechnet wurde (mittleres Umkehrpotential: -6.3 mV). Zum Vergleich ist die Gaußverteilung der Kontrollzellen dargestellt (schmale Kurve).

3.3.3 Experimente mit Cs^+ als Ladungsträger

Analog zu Experimenten mit dem ungeschützten THF-gram wurde die Verbindung THF-gram-TBDPS auf ihr Selektivitätsverhalten hin untersucht. Es wurden erneut cäsiumhaltige Lösungen verwendet, die Stromantwort nach Substanzapplikation aufgenommen, und die

Ergebnisse mit Resultaten aus der Versuchsreihe mit physiologischer Badlösung (Na^+/K^+) verglichen.

Der Anteil der BTM- Zellen, die eine Reaktion zeigten, lag bei 50 - 55 % (10^{-6} M) und war somit geringfügig höher als unter physiologischen Bedingungen. Bei beiden Konzentrationen wurde sowohl ein signifikanter Anstieg der Stromdichte als auch eine positive Verschiebung des Umkehrpotentials beobachtet. Der Anstieg der Stromdichte war etwas stärker ausgeprägt als unter Na^+/K^+ , allerdings wurde wegen großer Streuung der Daten keine Signifikanz erreicht (Abbildung 3.11). Eine Asymmetrie von Einwärts zu Auswärtsströmen wurde nicht beobachtet. Genaue Angaben sind in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

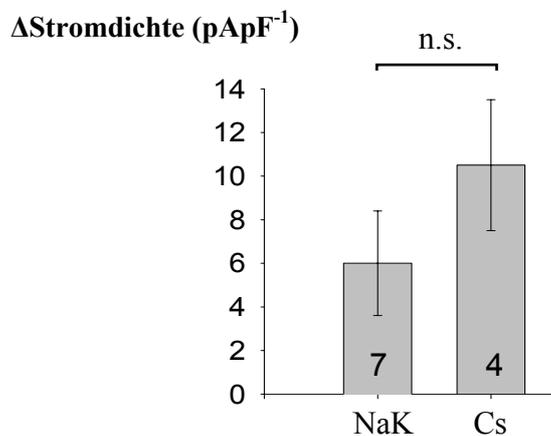


Abbildung 3.11 Zusätzliche Stromdichte nach Applikation von THF-gram-TBDPS (10^{-6} M) mit unterschiedlichen Ladungsträgern. Zahlenangaben in Balken beziehen sich auf die untersuchten Zellzahlen.

Tabelle 3.3 Zusammenfassung aller Experimente mit THF-gram-TBDPS, die nicht im Haupttext besprochen wurden. Abkürzungslegende: D_0 – Stromdichte unter Kontrollbedingungen; D_S – Stromdichte nach Substanzapplikation; D_{in} – zusätzliche (Δ) Einwärtsstromdichte nach Substanzapplikation; D_{out} – zusätzliche (Δ) Auswärtsstromdichte nach Substanzapplikation; P_0 – Umkehrpotential unter Kontrollbedingungen; P_S – Umkehrpotential nach Substanzapplikation; n.s. – nicht signifikant.

Konzentration (mol/l)	10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}
Ladungsträger	Na^+/K^+	Na^+/K^+	Cs^+
Anzahl reagierender Zellen	4	3	6
Durchgeführte Experimente	12	8	11
Rate reagierender Zellen in %	33.3	37.5	54.5
D_0 in $pApF^{-1}$	6.0 ± 2.6	6.5 ± 2.6	7.0 ± 2.5
D_S in $pApF^{-1}$	10.2 ± 4.2	10.0 ± 2.9	10.5 ± 3.3
Differenz $\Delta D_S - D_0$ in $pApF^{-1}$	4.2 ± 1.8	3.6 ± 0.5	3.5 ± 1.0
p-Wert von $\Delta(D_S - D_0)$, Signifikanz	0.1, n.s.	0.019, *	0.016, *
D_{In} in $pApF^{-1}$	1.0 ± 0.7	1.9 ± 0.6	0.7 ± 0.2
D_{Out} in $pApF^{-1}$	3.2 ± 1.2	1.6 ± 0.6	2.3 ± 0.9
p-Wert von D_{In} vs. D_{Out}, Signifikanz	n.s.	n.s.	0.08 n.s.
P_0 in mV	-35.5 ± 12.1	-28.7 ± 7.7	-5.0 ± 1.8
P_S in mV	-36.2 ± 10.5	-6.7 ± 9.0	2.5 ± 2.3
$\Delta P_S - P_0$ in mV	0.7 ± 3.7	22.0 ± 8.1	7.5 ± 1.3
p-Wert von $\Delta(P_S - P_0)$, Signifikanz	n.s.	0.07, n.s.	0.004, **

3.4 Linked-gram-TBDPS und Gramicidin A

Die Struktur der in dieser Arbeit untersuchten künstlichen Kanäle basierte auf Gramicidin A, das in der Dimerkonfiguration als Porenbildner und kationenselektiver Kanal wirksam ist. Die Primärstruktur von Gramicidin A wurde durch Ersatz der Aminosäuren an Position 1-8 durch THF-Aminosäuren und die Verbindung zweier Moleküle mit einem Linker modifiziert, so dass drei neue Verbindungen entstanden (Kapitel 1.3). Um den Einfluss des Linkers auf die Funktion zu eruieren und diesen Einfluss von den durch Ersatz der Aminosäuren ausgelösten Effekten zu unterscheiden, wurde die Verbindung linked-gram-TBDPS untersucht, welche eine kovalente Verbindung zweier Gramicidin A – Moleküle darstellt. Die Beobachtungen wurden mit den Effekten der Applikation von nativem Gramicidin A verglichen.

3.4.1 Gramicidin A

Ähnlich wie beim Experimentdesign mit THF-gram wurde die Wirkung von Gramicidin A bei zwei Konzentrationen (10^{-6} M and 10^{-7} M) sowie mit unterschiedlichen Ladungsträgern (Na^+/K^+ bzw. Cs^+) untersucht. Im Gegensatz zu Experimenten mit THF-Verbindungen zeigten alle untersuchten Zellen (100%) eine Reaktion auf Gramicidin A. Ein Auswascheffekt war nicht zu beobachten. Bei 10^{-6} M war der erste Effekt 115 ± 20 s ($n = 8$) nach Applikation sichtbar, die maximalen Werte wurden 5-10 min nach Beginn bei einer Anstiegsrate für die Leitfähigkeit von 1.7 ± 0.3 pA/s erreicht. Der Effekt war so deutlich ausgeprägt, dass der Potential-Umkehrpunkt in den negativen Strombereich verschoben wurde, was am Drift der Basislinie zu erkennen war (Abbildung 3.12). In jeder untersuchten Zelle führten die Veränderungen nach 10-15 min zum Zelltod.

Unter physiologischen Bedingungen (Na^+/K^+) bewirkte eine 10^{-6} molare Konzentration von Gramicidin A in der Badlösung einen enormen Anstieg der Gesamtstromdichte um $\Delta 23.8 \pm 3.7$ pApF⁻¹ ($n = 8$; $p < 0.001$). Davon gingen 13.5 ± 1.9 pApF⁻¹ auf Auswärtsströme zurück, während die Einwärtsstromdichte 10.2 ± 1.9 pApF⁻¹ betrug. Zwischen der Auswärts- und Einwärtskomponente war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p = 0.24$). Das

Umkehrpotential erfuhr eine Verschiebung von $\Delta + 22.6 \pm 8$ mV ($n = 8$; $p < 0.05$) ausgehend von $- 35.2 \pm 7.6$ mV bei der Kontrolle bis zu $- 12.6 \pm 2.6$ mV nach Substanzapplikation. Ähnliche Resultate wurden auch bei einer geringeren Konzentration von 10^{-7} M erzielt (Tabelle 3.4).

Wie erwartet, erwies sich Gramicidin A auch in Experimenten mit Cs^+ als hauptsächlicher Ladungsträger als eine sehr effektive Substanz. Die Wirkung war mit der Versuchsreihe bei physiologischen Bedingungen vergleichbar, die Stromdichte stieg nach Applikation von Gramicidin A (10^{-6} M) signifikant um $\Delta 22.1 \pm 3.4$ pA/pF $^{-1}$ ($n = 6$, $p < 0.001$) von initial 6.3 ± 2.2 pA/pF $^{-1}$ bis auf 28.4 ± 4.3 pA/pF $^{-1}$ an. Das Umkehrpotential, das am Beginn der Experimente -29.9 ± 9.6 mV betrug, stieg auf den neuen Wert von -13.5 ± 9.4 . Folglich betrug die Verschiebung $\Delta +16.3 \pm 7.2$ mV ($n=6$), was einen signifikanten Unterschied darstellte ($p < 0.05$).

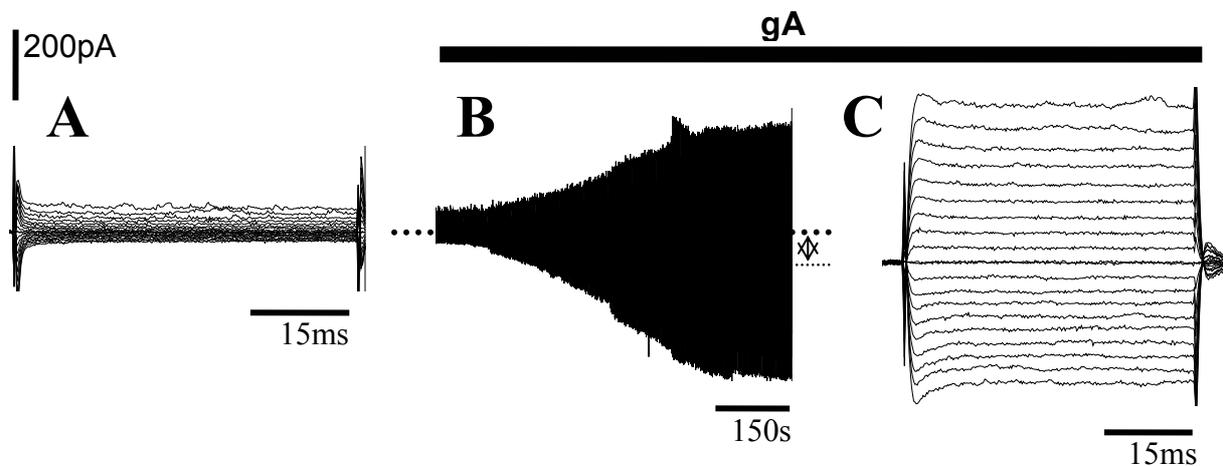


Abbildung 3.12 Effekt von Gramicidin A (10^{-6} M) auf die Stromantwort von BTM-Zellen. R50-Protokolle zeigen die asymmetrische Distribution der Ströme vor Applikation (A) und die komplette Aufhebung der Zellmembranpolarität nach Exposition mit der Substanz (C). Im Verlaufprotokoll (B) ist der Stromanstieg nach Applikation sowie die Verschiebung der Basislinie (\Downarrow) gezeigt. Die fette gestrichelte Linie zeigt den Level der Basislinie vor, die schmale gestrichelte Linie nach Applikation von Gramicidin A.

Tabelle 3.4 Effekte von Gramicidin A auf das elektrophysiologische Verhalten von BTM-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen und Ladungsträgern. Legende: D_0 – Stromdichte unter Kontrollbedingungen; D_S – Stromdichte nach Substanzapplikation; D_{in} – zusätzliche (Δ) Einwärtsstromdichte nach Substanzapplikation; D_{out} – zusätzliche (Δ) Auswärtsstromdichte nach Substanzapplikation; P_0 – Umkehrpotential unter Kontrollbedingungen; P_S – Umkehrpotential nach Substanzapplikation; n.s. – nicht signifikant.

Konzentration (mol/l)	10^{-7}	10^{-7}	10^{-6}
Ladungsträger	Na^+/K^+	Cs^+	Cs^+
Anzahl reagierender Zellen	3	7	6
Durchgeführte Experimente	3	7	6
Rate reagierender Zellen in %	100	100	100
D_0 in $pApF^{-1}$	4.1 ± 0.8	11.6 ± 3.5	6.3 ± 2.2
D_S in $pApF^{-1}$	36.7 ± 12.5	44.3 ± 6.5	28.4 ± 4.3
Differenz $\Delta D_S - D_0$ in $pApF^{-1}$	32.7 ± 11.8	32.7 ± 3.8	22.1 ± 3.4
p-Wert von $\Delta(D_S - D_0)$, Signifikanz	0.1, n.s.	0.016, *	0.01, **
D_{in} in $pApF^{-1}$	14.9 ± 5.3	15.2 ± 3.1	11.5 ± 1.9
D_{out} in $pApF^{-1}$	17.8 ± 6.5	15.9 ± 2.0	10.6 ± 1.5
p-Wert von D_{in} vs. D_{out}, Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.
P_0 in mV	-42 ± 5.7	-15.5 ± 8.6	-29.9 ± 9.6
P_S in mV	-10.1 ± 1.6	1.0 ± 3.0	-13.5 ± 9.4
$\Delta P_S - P_0$ in mV	31.9 ± 5.9	16.5 ± 1.8	16.3 ± 7.2
p-Wert von $\Delta(P_S - P_0)$, Signifikanz	0.038, *	0.002, **	0.04, *

3.4.2 Linked-gram-TBDPS

BTM-Zellen zeigten von allen in dieser Arbeit getesteten Substanzen bei linked-gram-TBDPS die stärksten und schnellsten Effekte. Bereits eine Konzentration von 10^{-14} M war ausreichend, um eine Reaktion der Zellen in Form eines Stromanstiegs hervorzurufen. Bei 10^{-12} M erfolgte die Zellantwort in kürzester Zeit, bereits 33.3 ± 7.2 s ($n = 6$) nach Beginn der Applikation kam es zum Anstieg der Membranleitfähigkeit mit einer mittleren Anstiegsrate von 5.0 ± 1.2 pA/s ($n=6$). Bei dieser Anstiegsgeschwindigkeit waren die Maximalwerte spätestens nach 2 min Expositionszeit erreicht. Der Effekt war so stark ausgeprägt, dass er bei 100% der untersuchten Zellen zum Zelltod führte, der 5-10 min nach Applikationsbeginn auftrat. Ähnlich der Beobachtung bei Gramacidin A verschob auch linked-gram-TBDPS die Basislinie in Richtung negativer Ströme (Abbildung 3.13).

Bei Na^+/K^+ als Ladungsträger und einer Konzentration von 10^{-12} M stieg nach Exposition mit linked-gram-TBDPS die Gesamtstromdichte um $\Delta 8.6 \pm 1.9$ pApF $^{-1}$ ($n = 5$, $p < 0.01$), ausgehend vom Kontrollwert von 6.6 ± 3.0 pApF $^{-1}$ bis zum Maximum von 15.2 ± 4.4 pApF $^{-1}$, das 230% der Kontrollstromdichte entspricht. Eine Asymmetrie zwischen Einwärts- und Auswärtsströmen konnte nicht festgestellt werden. Das Umkehrpotential erfuhr eine Verschiebung um $\Delta +11.4 \pm 4.0$ mV ($n = 5$, $p < 0.05$), von initial -24.8 ± 6.8 mV auf -13.4 ± 7.7 mV. Mit Cs^+ als Ladungsträger betrug der Anstieg der Gesamtstromdichte $\Delta 18.4 \pm 2.4$ pApF $^{-1}$ ($n = 3$, $p < 0.05$). Das Umkehrpotential wurde von -22.3 ± 4.7 mV auf -15.7 ± 2.6 mV ($n=3$) verlagert, aufgrund der kleinen Zellzahl war dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant. Bei einer Konzentration von 10^{-14} M wurden vergleichbare Effekte in einem geringeren Ausmaß beobachtet (Tabelle 3.5).

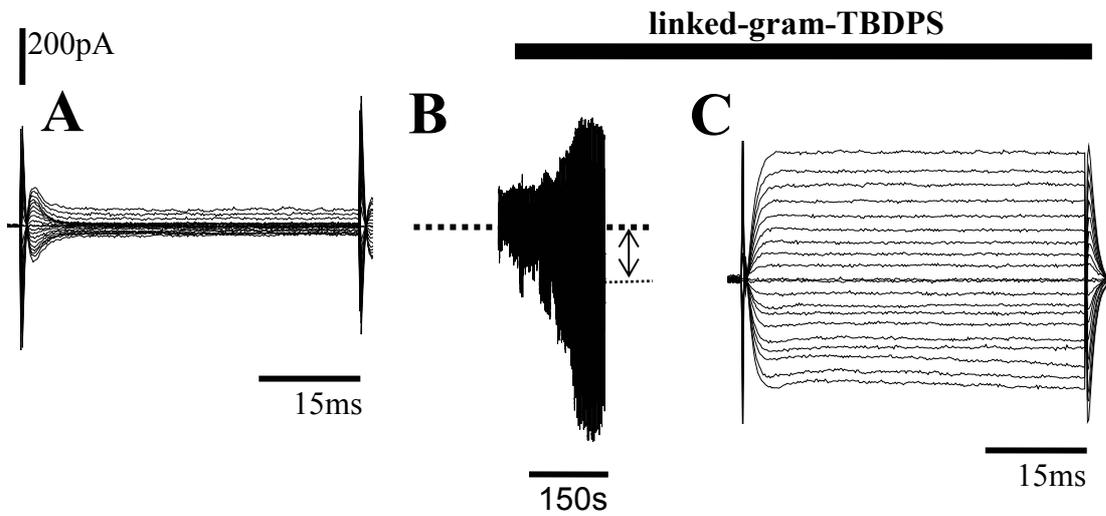


Abbildung 3.13 Wirkung von linked-gram-TBDPS (10^{-12} M) auf die Stromantwort einer BTM-Zelle. Abbildungen A und C zeigen den Unterschied im Muster der Stromantwort vor und nach Inkorporation der Substanz auf, in Abbildung B wird die Progression des Stromanstiegs sowie der Verlust der Polarität zwischen Auswärts- und Einwärtsströmen deutlich. Ebenso beachtlich wie der Stromanstieg ist die Verschiebung (≈ 200 mA) der Basislinie (=Stromstärke bei Klemmspannung von -40 mV), welche durch den Pfeil (\updownarrow) dargestellt wird.

Tabelle 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation von linked-gram-TBDPS. Legende: D_0 – Stromdichte unter Kontrollbedingungen; D_S – Stromdichte nach Substanzapplikation; D_{in} – zusätzliche (Δ) Einwärtsstromdichte nach Substanzapplikation; D_{out} – zusätzliche (Δ) Auswärtsstromdichte nach Substanzapplikation; P_0 – Umkehrpotential unter Kontrollbedingungen; P_S – Umkehrpotential nach Substanzapplikation; n.s. – nicht signifikant.

Konzentration (mol/l)	10^{-14}	10^{-12}	10^{-12}
Ladungsträger	Na^+/K^+	Na^+/K^+	Cs^+
Anzahl reagierender Zellen	7	5	3
Durchgeführte Experimente	7	5	3
Rate reagierender Zellen in %	100	100	100
D_0 in pApF^{-1}	2.1 ± 1.1	6.6 ± 3.0	6.8 ± 3.0
D_S in pApF^{-1}	5.7 ± 1.9	15.2 ± 4.4	25.2 ± 4.4
Differenz $\Delta D_S - D_0$ in pApF^{-1}	2.8 ± 1.0	8.6 ± 1.9	18.4 ± 2.4
p-Wert von $\Delta(D_S - D_0)$, Signifikanz	0.037, *	0.009, **	0.017, *
D_{in} in pApF^{-1}	0.5 ± 0.2	3.5 ± 0.8	6.1 ± 1.7
D_{out} in pApF^{-1}	2.3 ± 0.9	5.2 ± 1.2	12.3 ± 1.5
p-Wert von D_{in} vs. D_{out} , Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.
P_0 in mV	-36.9 ± 7.3	-24.8 ± 6.8	-22.3 ± 4.7
P_S in mV	-19.8 ± 6.7	-13.4 ± 7.7	-15.7 ± 2.6
$\Delta P_S - P_0$ in mV	17.1 ± 4.6	11.4 ± 4.0	6.7 ± 4.2
p-Wert von $\Delta(P_S - P_0)$, Signifikanz	0.02, *	0.046, *	n.s.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden der Einbau und die Eigenschaften der künstlichen Ionenkanäle THF-gram, THF-gram-TBDPS sowie linked-gram-TBDPS in biologischen Membranen lebender Zellen untersucht. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde nach extrazellulärer Applikation der genannten Substanzen die Stromantwort boviner Trabekelwerkszellen aufgenommen und mit der physiologischen Antwort verglichen. Weiterhin wurde das elektrophysiologische Verhalten der Zellen nach Applikation von Gramicidin A untersucht, um nach Vergleich mit den untersuchten künstlichen Kanälen Rückschlüsse auf Struktur-Funktions-Beziehungen dieser Strukturen gewinnen zu können. Als Methode wurde bei allen Experimenten der Whole-Cell-Modus der Patch-Clamp-Technik angewandt. In der folgenden Diskussion wird deutlich, dass das gewählte Experimentdesign entscheidende Erkenntnisse zur Beantwortung der Fragestellung brachte.

4.1 Charakterisierung der natürlichen Stromantwort von BTM-Zellen

An kultivierten Zellen des bovinen Trabekelwerks wurden die Ströme nach hyperpolarisierendem und depolarisierendem Spannungsreiz aufgenommen. Die Stromantwort entsprach im Wesentlichen dem bekannten Verhalten von BTM-Zellen (siehe Kapitel 1.4.1) mit einer intensiveren Auswärtsstromkomponente. Für die Polarität der Stromantwort ist zum großen Teil die Expression calciumabhängiger, auswärtsrektifizierender Maxi-K-Kanäle in BTM-Zellen verantwortlich, was in früheren Arbeiten bereits beschrieben wurde (Stumpff et al., 1997; Stumpff & Wiederholt, 2000). Dafür spricht auch der geringere Auswärtsstrom in Kontrollversuchen nach Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration (siehe Abbildung 3.1). Es ist anzunehmen, dass außer den Maxi-K-Kanälen weitere Ionenkanäle an der Stromantwort beteiligt waren. Der Beitrag von Chloridkanälen sowie Natriumkanälen zur Stromantwort der Trabekelwerkszellen wurde früher diskutiert (Wiederholt et al., 2000). Weiterhin könnten kationenselektive Kanäle eine Rolle spielen. Ihre Expression wurde bisher in Trabekelwerkszellen nicht untersucht, es ist jedoch bekannt, dass dieser Kanaltyp in glatten Muskelzellen exprimiert wird (So & Kim,

2003), zu denen Trabekelwerkszellen funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Lutjen-Drecoll, 1999). Überraschenderweise war unter cäsiumhaltigen Bedingungen die Polarität der Stromantwort weiterhin erhalten, auch wenn die Cäsiumkonzentrationen von Bad- und Pipettenlösung annähernd gleich waren. Die stärkere Antwort auf Depolarisationsreize wäre durch Ströme durch Chloridkanäle zu erklären, die wegen der Zusammensetzung der Patchlösungen (siehe Tabelle 2.1) nur einwärts möglich waren.

Um die zu untersuchenden Substanzen in der Badlösung applizieren zu können, wurden die Lösungsmittel Methanol und DMSO verwendet. Kontrollversuche unter Verwendung von Methanol und DMSO konnten einen Einfluss der Lösungsmittel auf die zelluläre Stromantwort ausschließen, da diese von der physiologischen nicht zu unterscheiden war. Darüber hinaus zeigten die Kontrollversuche, da die Stromantwort der Zellen auch über längere Zeiträume stabil war und keine oszillatorische Aktivität zeigte.

4.2 Effekte von künstlichen Ionenkanälen auf die Stromantwort von BTM-Zellen

In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass die extrazelluläre Applikation der synthetischen Verbindungen THF-gram, THF-gram-TBDPS und linked-gram-TBDPS eine Veränderung der zellulären Stromantwort bewirkt. Der Einfluss von THF-gram, das einen deutlichen Effekt zeigte, und die etwas schwächer ausgeprägte Wirksamkeit von THF-gram-TBDPS waren mit den physiologischen Zellfunktionen vereinbar und führten nicht zum Zelltod. Hingegen erwies sich linked-gram-TBDPS als eine sehr potente Verbindung, die schon bei sehr geringen Konzentrationen nach kürzester Zeit mit Zelltod einherging. Eine weitere Beobachtung war die Irreversibilität des Einbaus, ein Phänomen, das allen Substanzen gemeinsam war.

4.2.1 THF-gram

Applikation von THF-gram in kultivierten BTM-Zellen bewirkte einen Anstieg der Gesamtstromdichte sowie eine Verlagerung des Umkehrpotentials in positiver Richtung. Es kann angenommen werden, dass die beobachteten Veränderungen auf den Einbau von THF-

gram in die Zellmembran zurückzuführen sind. Die zusätzliche Stromdichte war etwa doppelt so hoch wie der Ausgangswert.

Trotz der deutlichen Veränderungen nach Substanzapplikation im Vergleich zur physiologischen Situation war die erreichte Stromantwort mit den Grundfunktionen der Zelle vereinbar. Eine Inkorporation von THF-gram führte im wirksamen Konzentrationspektrum nicht zum anschließenden Zelltod, wie es z.B. nach Applikation von Gramicidin A der Fall war. Im Vergleich zu Gramicidin A fiel der Anstieg der Stromdichte nach THF-gram moderat aus, was die wahrscheinlichste Erklärung für das Überleben liefert. Diese Beobachtung ist entscheidend für mögliche therapeutische Anwendbarkeit von THF-gram.

Erste Veränderungen der zellulären Stromantwort waren ab einer THF-gram-Konzentration von 10^{-8} M zu beobachten und zeigten eine Sättigung bei 10^{-6} M (Tabelle 3.2). Erstaunlicherweise waren weder die Erhöhung der Stromdichte noch die Verlagerung des Umkehrpotentials proportional zur verwendeten Konzentration, sondern gehorchten vielmehr einem „Alles oder Nichts“-Prinzip. Damit ist die Beobachtung des Ansprechverhaltens von BTM-Zellen auf THF-gram gemeint. Die Zellen zeigten entweder eine Reaktion durch Stromanstieg, welcher nicht proportional zur verwendeten Konzentration war, oder es war keine Änderung des Verhaltens zu beobachten. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte lediglich bei genauerer Analyse des Zeitpunktes vom Effekteintritt festgestellt werden, denn eine Erhöhung der Konzentration führte eindeutig zum schnellerem Einbau der Kanäle in die Zellmembran.

Warum war nur bei 70% der untersuchten Zellen eine Veränderung der Stromantwort zu sehen und warum gehorchte die Stromantwort einem „Alles oder Nichts“-Prinzip ohne Konzentrationsabhängigkeit?

Es ist denkbar, dass THF-gram in lebenden Zellen ein sehr enges Wirkungsspektrum zeigte, dessen Konzentrationsabhängigkeit durch Untersuchung einer Konzentrationreihe mit Zehnerpotenzen nicht aufgedeckt werden konnte. Weiterhin ist es möglich, dass in einigen Zellen die Stromantwort nach Einbau von THF-gram zu schwach war, um eine Differenz zur Kontrolle aufzudecken. Ebenfalls könnten verschiedene Differenzierungsstadien einen Einfluss auf das Zytoskelett und damit die Zellform, die Membranstruktur oder die Beschaffenheit der Glykokalix hatten, was unterschiedliche Bedingungen für den Einbau zur Folge hätte.

Eine weitere Ursache für das „Alles oder Nichts“-Prinzip ist möglicherweise in der Interaktion zwischen Substanz und Zelle zu suchen. Mit höherer Konzentration in der Badlösung stieg die Wahrscheinlichkeit der Interaktion zwischen Substanzmolekül und Zellmembran pro Zeiteinheit an, folglich war eine raschere Inkorporation möglich. Unter THF-gram war kein Auswascheffekt aufgetreten, die vergrößerte Leitfähigkeit blieb auch erhalten, wenn die Zellen nach der Applikation mit THF-gram-freier Badlösung gespült wurden. Daher ist es nicht auszuschließen, dass sich THF-gram in der Membran anreicherte, bis eine Sättigung erreicht war und somit die Konzentration in der Badlösung eine untergeordnete Rolle spielte.

Es sollte auch berücksichtigt werden, dass THF-gram in Bilayermembranen mehrere Leitfähigkeitsstufen aufwies, also mehr als eine aktive Konformation vorliegen musste (Schrey et al., 2000). Es ist also nicht auszuschließen, dass außer den aktiven weitere, inaktive Konformationen auftraten. Im Fall von Gramicidin A und anderen Peptiden ist durch die vorgegebene Aminosäuresequenz die Anzahl der möglichen Konformationen beschränkt. Molekulare Flexibilität der THF-Moleküle macht bei THF-gram mehrere Konformationen wahrscheinlich. Inaktive Formen würden sowohl zur Erklärung der reduzierten Responderrate als auch zum „Alles oder Nichts“-Prinzip beitragen.

Bemerkenswert war die Verschiebung des Umkehrpotentials in Richtung positiver Werte nach Applikation von THF-gram. Diese Verlagerung war deutlich, dennoch blieb das Ruhemembranpotential der Zellen weit unter 0 mV. In Bilayermembranen war die Leitfähigkeit von THF-gram größer für Kalium- als für Natriumionen, daher hätte man annehmen können, dass sich das Ruhemembranpotential in negativer Richtung verschieben würde. Es sollte jedoch beachtet werden, dass im Ruhezustand einer Zelle bereits Kaliumkanäle geöffnet sind, um das Ruhemembranpotential aufrecht zu erhalten. Die zusätzliche Natriumpermeabilität nach Inkorporation von THF-gram erklärt die Verschiebung des Umkehrpotentials. Wie man anhand der Goldman-Gleichung (Abbildung) nachvollziehen kann (Hille, 1992), würde dadurch ein neues Gleichgewicht entstehen, das schließlich zur Verlagerung des Umkehrpotentials zu positiven Werten führte.

$$E = - 60 \text{ mV} * \log \frac{p_K [K]_a * p_{Na} [Na]_a}{p_K [K]_i * p_{Na} [Na]_i}$$

Abbildung 4.1: Goldman- Gleichung (vereinfacht)

Die Ergebnisse, die hier dargestellt wurden, bestätigen größtenteils die Beobachtungen aus Experimenten in künstlichen Bilayermembranen. Die Untersuchung des Selektivitätsverhaltens zeigte ebenfalls Analogien. Vor allem ist die höhere Cs^+ -Leitfähigkeit ein wichtiger Hinweis für die Wirkung von THF-gram in Zellen. Unter cäsiumhaltigen Bedingungen konnten nach Applikation von THF-gram deutlich höhere Stromdichten aufgenommen werden als bei Verwendung physiologischer Lösungen. Es kann angenommen werden, dass die Leitfähigkeit von THF-gram in BTM-Zellen höher für Cs^+ als für K^+ war. Somit ist davon auszugehen, dass die Eigenschaften von THF-gram in Bilayern und Membranen lebender Zellen vergleichbar sind.

Eine Ausnahme war die Polarität der Stromantwort nach Einbau von THF-gram in die Membran, was mit deutlich stärkerer Auswärtsstromkomponente einherging. Diese Polarität wurde in Bilayer-Membranen nicht beobachtet. Die Zellmembran selbst ist im Vergleich zur Bilayermembran ein polares Gebilde, einerseits wegen der extrazellulär lokalisierten Glykokalix, andererseits aufgrund der Membranproteine, welche nur auf einer Seite der Phospholipiddoppelschicht lokalisiert sein können (Vereb et al., 2003). Die Polarität der Membran könnte zur asymmetrischen Ausrichtung des THF-gram-Moleküls führen, das seinerseits asymmetrisch ist. Andererseits könnte die Polarität des Moleküls selbst zur asymmetrischen Stromantwort führen, da der THF-Anteil des Moleküls über einen anderen Mechanismus für Ioneneintritt als der Gramicidin-Anteil verfügt. In Lipidbilayern ist eher ein randomisierter Einbau wahrscheinlich, der die Asymmetrie aufheben würde.

4.2.2 THF-gram-TBDPS

Analog zu THF-gram bewirkte die Applikation von THF-gram-TBDPS eine Veränderung der Stromantwort von BTM-Zellen in Form einer erhöhten Stromdichte und einer Verlagerung des

Ruhemembranpotentials zu positiveren Werten. Bei THF-gram-TBDPS kann ebenso angenommen werden, dass die beobachteten Veränderungen auf Kanaleinbau zurückzuführen sind. Grundlegende, aus den observierten Ergebnissen resultierende Schlussfolgerungen und Überlegungen zum Einbau und zur Wirksamkeit der Verbindung wurden bereits bei THF-gram diskutiert, und ihre Gültigkeit ist ebenfalls für THF-gram-TBDPS wahrscheinlich. Einer weitergehenden Diskussion bedürfen jedoch einige Unterschiede zwischen den beiden Verbindungen.

Die Wirksamkeit von THF-gram-TBDPS in BTM-Zellen war deutlich geringer als unter THF-gram, was nicht durch schwächer ausgeprägten Stromdichteanstieg oder geringere Verlagerung des Umkehrpotentials deutlich wurde; der Einfluss auf diese beiden Größen war mit der Wirkung von THF-gram vergleichbar. Entscheidend waren zwei weitere Beobachtungen. Einerseits zeigte bei THF-gram-TBDPS mit ca. 30% ein deutlich geringerer Anteil der untersuchten BTM-Zellen eine Reaktion nach Substanzexposition, dabei gehorchte die Reaktion auch in diesem Fall dem „Alles oder Nichts“-Prinzip. Andererseits waren erste Veränderungen der Stromantwort mit einer größeren zeitlichen Verzögerung zu beobachten, als es bei THF-gram der Fall war.

Eine Konzentrationsabhängigkeit innerhalb der gewählten Testkonzentrationen konnte bei THF-gram-TBDPS nicht beobachtet werden. Die Löslichkeit der Substanz in DMSO oder Methanol erlaubte eine maximale verwendbare Konzentration von 10^{-6} M. Bei höheren Konzentrationen hätte der Anteil des verwendeten Lösungsmittels in der Lösung 0.5 % Vol./Vol. überschritten, und die Experimente wären damit nicht verwertbar gewesen. Da jedoch signifikante Effekte erst bei 10^{-7} M beobachtet wurden, war der untersuchte Konzentrationsbereich von einer Zehnerpotenz zu gering, um daraus eine Abhängigkeit herleiten zu können.

Der Vergleich von Effekten in Bilayern und Zellen erfordert besondere Beachtung. Die Einzelkanalleitfähigkeit von THF-gram-TBDPS war in Bilayer-Membranen geringer ausgeprägt als bei THF-gram (Schrey et al., 2000), in BTM-Zellen waren aber die Veränderungen der Gesamtstromdichte nach Applikation von THF-gram bzw. THF-gram-TBDPS nicht zu unterscheiden. Allerdings zeigte sich bei THF-gram-TBDPS eine geringere Ansprechrate und späterer Effekteintritt.

Wie sind diese unterschiedlichen Beobachtungen miteinander zu vereinbaren?

Bezüglich der Polarität des Stromdichteanstieges zeigte sich bei THF-gram-TBDPS eine Tendenz zu stärkeren Auswärtsströmen, die jedoch im Gegensatz zu THF-gram nicht signifikant war. Es ist möglich, dass die TBDPS-Schutzgruppen die Polarität der Verbindung bzw. ihrer Ausrichtung in der Membran verhindern oder einschränken. Somit wäre die Flexibilität des Moleküls durch Fixierung der Verbindung in der Membran eingeschränkt. Eine derartige Fixierung hätte zusätzlich eine Behinderung der Übergänge zwischen aktiven und nicht aktiven Konformationen zur Folge, was auch die schwächere Wirkung der Substanz erklären würde.

Bezüglich der Selektivität konnte bei THF-gram-TBDPS kein signifikanter Unterschied zwischen Na^+/K^+ und Cs^+ festgestellt werden, auch wenn eine Tendenz zu stärkerer Cs^+ -Leitfähigkeit zu beobachten war. Die Tendenz ist ein Hinweis darauf, dass THF-gram-TBDPS in biologischen Membranen Selektivitätsverhalten der Eisenmanreihe I zeigt. Eine größere Anzahl untersuchter Zellen pro Experimentserie hätte diese Frage beantworten können, war aber aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit der zu untersuchenden Substanz nicht durchführbar.

Die wahrscheinlichste Antwort ist im strukturellen Unterschied zwischen THF-gram und THF-gram-TBDPS, also erneut bei den TBDPS-Schutzgruppen zu suchen. TBDPS-Schutzgruppen sind hydrophobe Moleküle. Somit könnte die Interaktion des Moleküls mit den hydrophilen Phospholipidköpfen der Zellmembran erschwert sein, was zum langsameren Einbau bzw. schwächerer Zellantwort führen würde. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse aus Inkubationsexperimenten mit THF-gram-TBDPS unterstützt. Die Behinderung des Einbaus durch TBDPS würde den Anstieg der Ansprechrate nach Inkubation von 30% auf über 80 % erklären, da in dem Fall die längere Expositionszeit die erschwerten Einbaubedingungen kompensierte. Interessanterweise hatte die Inkubation keinen Einfluss auf das Ausmaß der Stromdichte, ihr Anstieg war von „akuten“ Experimenten nicht zu unterscheiden. Die letzte Beobachtung wäre im Einklang mit den bisherigen Überlegungen zur Konzentrationsabhängigkeit, da sowohl akut als auch nach Inkubation das „Alles oder Nichts“ Prinzip zu gelten schien.

Darüber hinaus könnte das hydrophobe Verhalten von TBDPS in wässrigen Lösungen einen Einfluss auf die Löslichkeit und das Verhalten des untersuchten Moleküls in der Lösung haben. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Schutzgruppen durch

Wechselwirkung mit den übrigen Bausteinen innerhalb des THF-gram-TBDPS-Moleküls Einfluss auf die Raumstruktur der Verbindung ausübten und somit die Ausbildung zusätzlicher, inaktiver Konformationen begünstigten.

Die erfolgreiche Inkubation von THF-gram-TBDPS lässt nicht nur Mutmaßungen über das molekulare Verhalten der Substanz zu, sondern ist auch eine wichtige Beobachtung für potentielle therapeutische Anwendbarkeit. Dass die Zellen nicht nur nach einer kurzzeitigen, sondern auch nach längerer, 1-2 stündiger Exposition am Leben blieben, ist dabei der wichtigste Faktor. Zum Vergleich führte eine Applikation von Gramicidin A in vergleichbaren Konzentrationen bereits nach 5-10 min zum Zelltod. Daher ist davon auszugehen, dass trotz des Einflusses auf elektrophysiologische Eigenschaften der Einbau von THF-gram-TBDPS mit der biologischen Funktion einer BTM-Zelle auch über längere Zeit vereinbar wäre.

Experimente mit Gd^{3+} als Inhibitor der Kanalaktivität von THF-gram-TBDPS konnten nicht als Bestätigung verwendet werden, dass die beobachteten Veränderungen auf den synthetischen Kanal zurückzuführen waren. Da Gd^{3+} auch dafür bekannt ist, natürlich exprimierte Kationenkanäle zu inhibieren (Popp et al., 1993), konnten die beobachteten Effekte nicht als spezifisch für THF-gram-TBDPS betrachtet werden. Lediglich das Ausmaß der Inhibition würde dafür sprechen, dass ein großer Teil der Stromreduktion auf die Wirkung von Gd^{3+} auf aktive THF-gram-TBDPS-Kanäle zurückzuführen war, denn die Ströme wurden nach Anstieg durch Gd^{3+} annähernd auf das Ausgangsniveau reduziert.

4.2.3 Linked-gram-TBDPS

Die extrazelluläre Exposition von BTM-Zellen mit linked-gram-TBDPS hatte Effekte zur Folge, die in ihrem Ausmaß die Wirkung aller bis dahin getesteten Substanzen, inklusive Gramicidin A, übertrafen. Bereits bei einer Konzentration von 10^{-14} M bewirkte die Applikation einen Anstieg der beobachteten Ströme. Bei dieser Konzentration wurden auch in Bilayern erste Effekte beobachtet (Arndt et al., 2001). Damit scheint linked-gram-TBDPS ein sehr hohe biologische Wirksamkeit aufzuweisen.

Erstaunlich war nicht nur die Stärke der Stromantwort, die bei 10^{-12} M im Ausmaß des Stromdichteanstiegs der Wirkung von Gramicidin A bei 10^{-8} M entsprach, womit linked-

gram-TBDPS weitaus effektiver als THF-gram oder THF-gram-TBDPS war. Bereits bei Gramicidin A wurde im Vergleich zu THF-gram-Hybriden ein rascher Wirkungseintritt und eine hohe Geschwindigkeit des Leitfähigkeitanstiegs auf Maximalwerte beobachtet. Die Applikation von linked-gram-TBDPS übertraf die Effekte von Gramicidin A deutlich, insbesondere was die Reaktionszeit betraf (Abbildung 4.1). Aus dieser Beobachtung ist die Schlussfolgerung möglich, dass auch in biologischen Membranen der rasche Wirkungseintritt durch Stabilisierung des Kanals aus zwei kovalent verbundenen Monomeren erfolgt. Die hohe Geschwindigkeit des Leitfähigkeitanstiegs erklärt sich aus der Permanenz der Kanalaktivität, die auch in Einzelkanalmessungen beobachtet wurde. Nach Membraneinbau war aufgrund des Linkers eine Dissoziation der Peptidbausteine nicht möglich. Die Kanäle folgten somit nicht dem üblichen Prinzip von Öffnung und Schließung, sondern sie blieben dauerhaft offen, was den fast sofortigen Anstieg des Stroms auf den Maximalwert zur Folge hatte. Der einzige limitierende Faktor war die Sättigung der Zellmembran mit Substanzmolekülen. Die Effektivität von linked-gram-TBDPS in BTM-Zellen ist ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der Dimerbildung für Kanalfunktion von Gramicidin A, die ausführlich in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Urry et al., 1971; Wallace, 1998; Wallace, 2000).

Reaktionszeit in s

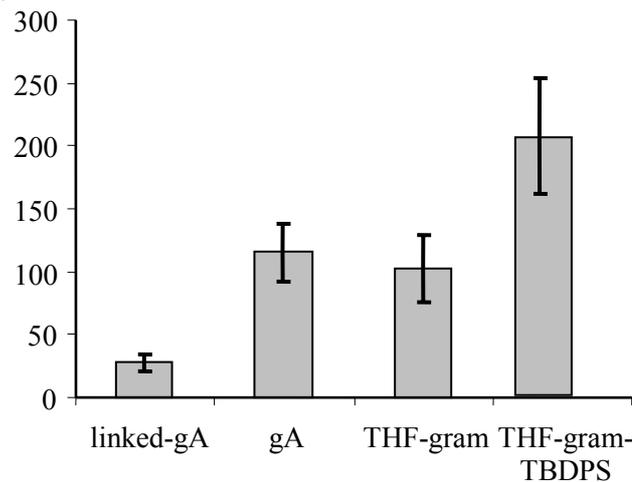


Abbildung 4.2: Vergleich der Reaktionszeiten von BTM-Zellen für den ersten Stromanstieg nach Substanzapplikation. Eindeutig ist der rasche Effekteintritt bei linked-gram-TBDPS (=linked-gA) (gA=Gramicidin A).

Die Wirksamkeit der Substanz erklärt auch die sehr kurzen Überlebenszeiten der BTM-Zellen nach Applikation von linked-gram-TBDPS. Bei der maximal erreichten Leitfähigkeit konnte die Funktion der Zelle nicht aufrechterhalten werden, da die erreichte Membranpermeabilität eine Aufrechterhaltung der physiologischen Ionenkonzentrationen in der Zelle unmöglich machte und zum osmotisch bedingten Zelltod führte.

Eine interessante Überlegung ergibt sich der beobachteten Stromantwort von linked-gram-TBDPS, die trotz ihrer Intensität in beiden Richtungen eine leichte, nicht signifikante Tendenz zu stärkeren Auswärtsströmen zeigte (siehe Tabelle 3.5). Seitens der Struktur der untersuchten Verbindung war keine Polarität zu erwarten, denn die kovalente Bindung ergab eine symmetrische Struktur. Die leichte Auswärtstendenz könnte durch den Einfluss von TBDPS-Schutzgruppen erklärt werden, durch die eine asymmetrische Inkorporation der Verbindung in der Zellmembran denkbar wäre. Diesbezüglich wurden auch ähnliche Beobachtungen und Überlegungen für THF-gram-TBDPS gemacht.

Der potentielle negative Einfluss von TBDPS-Gruppen auf die Wirksamkeit, wie bei THF-gram-TBDPS diskutiert wurde, wird durch die Ergebnisse von linked-gram-TBDPS relativiert. Im letzteren Fall war trotz Schutzgruppen sehr hohe Kanalaktivität vorhanden. Möglich ist jedoch, dass die negativen Effekte der Schutzgruppen durch den immensen Einfluss des Linkers überlagert waren.

Bezüglich des Selektivitätsverhaltens konnte die kovalente Dimerverbindung offensichtlich die Eigenschaften von Gramicidin A konservieren, da mit Cs^+ -haltigen Lösungen eine signifikante Erhöhung der Stromdichte erreicht wurde. Dieser Befund war im Einklang mit Bilayer-Beobachtungen. Eine Erhaltung der Selektivitätseigenschaften von Gramicidin A war zu erwarten, da durch die Modifikation die eigentliche Struktur von Gramicidin A, insbesondere die porenbildende Region von Carboxylgruppen im Inneren der Helix, nicht verändert wurde.

Welche Schlüsse sind aus den vorliegenden Befunden für mögliche Konformationen der Verbindung in biologischen Zellen zu ziehen?

Die Ansprechrate von 100% und die Wirksamkeit der Verbindung könnten darauf hinweisen, dass alle Membrankonformationen von linked-gram-TBDPS dauerhaft aktiv sind bzw. dass nur eine, dauerhaft aktive Konformation existiert. Das Gramicidinmolekül kommt in zwei

Konformationen vor, die sich jeweils aus der unterschiedlichen Anordnung der β -Helix Monomere zueinander ergeben (siehe Kapitel 1.2). Weitere Konformationen sind nicht bekannt. Da bei linked-gram-TBDPS die Flexibilität durch die kovalente Bindung aufgehoben war, ist demnach die Existenz von einer, der Gramicidin HD-Konformation äquivalenten Raumanordnung am wahrscheinlichsten.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal die Implantation synthetischer THF-gram-Hybride sowie eines kovalent verbundenen Gramicidindimers in lebende Zellen beschrieben. Es ist somit der erste erfolgreiche Versuch, synthetische Kanäle in einem dynamischen biologischen System zu untersuchen. Bisher wurden künstliche Kanäle nur in synthetischen Membranen untersucht, die Untersuchung von Ionentransport in lebenden Zellen bezog sich hingegen auf natürlich exprimierte Kanalformen. Mit der Trennung beider Bereiche wurde die Komplexität umgangen, die durch Überlagerung von Effekten natürlicher Kanäle und der zu untersuchenden Substanzen entstand, was auch bei dieser Arbeit einen limitierenden Faktor für die Datenauswertung und Interpretation darstellte. Es ist anzunehmen, dass genau aus diesem Grund Untersuchungen künstlicher Kanäle in biologischen Systemen bisher so wenig Beachtung fanden. Derartige Experimente sind jedoch essentiell, damit künstliche Kanäle nicht nur als Werkzeug zum besseren Verständnis von molekularer Struktur und Funktion natürlicher Kanäle verwendet werden, sondern auch um sie auch als potentielle therapeutische Wirkstoffe zu betrachten.

Zwei kürzlich erschienene Arbeiten, welche zu Beginn dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht waren, beschreiben ebenfalls die Untersuchung künstlicher Kanalstrukturen in lebenden Zellen (Banghart et al., 2004; Leevy et al., 2004). Das wissenschaftliche und therapeutische Potential künstlicher Ionenkanäle lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass mit den genannten Publikationen erst der Beginn der intensiven wissenschaftlichen Auseinandersetzung markiert wird und weitere Resultate folgen werden. Auch im Bereich nativer Kanäle und Untersuchung ihrer Struktur wurden in den letzten Jahren weite Fortschritte erreicht. Die wissenschaftliche Nähe beider Gebiete könnte eine fördernde Wirkung für wissenschaftlichen Austausch und das Entstehen neuer Ideen haben.

Die geringe Zahl von Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Arbeitsgruppen und Publikationen ist ein Nachteil für die vorliegende Diskussion. Beobachtungen aus Bilayern können nur bedingt zum Vergleich herangezogen werden. Daher sind einige Schlussfolgerungen, insbesondere zu möglichen Struktur-Funktionsbeziehungen, als spekulativ zu betrachten. Sie bedürfen weiterer, praktischer Überprüfung, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein soll.

4.3.1 Mögliche Anwendung und Weiterentwicklung untersuchter Substanzen

Unter praktischen Gesichtspunkten repräsentieren die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine wichtige Basis für die Anwendung von THF-gram-Hybriden. Es ist jedoch eine Reihe weiterer Studien notwendig, die sowohl die Weiterentwicklung künstlicher Kanäle mit spezifischen Eigenschaften als auch die Klärung der praktischen Umsetzbarkeit zum Ziel haben. Eine der Anwendungsmöglichkeiten ist der therapeutische Einsatz zum Ersatz fehlender natürlicher Kanalfunktion, was mehrere Anforderungen an die Eigenschaften der synthetischen Kanäle stellt. Als Grundvoraussetzung gilt, dass die Stromantwort nach Membraneinbau mit dem Überleben der Zelle vereinbar sein muss. Ansonsten würde ein derartiger Kanal durch Zerstörung der Zelle seine Zielsetzung, die Modifikation der Zellfunktion, verfehlen. Mit ihrer relativ schwachen Wirkung aufgrund inaktiver Konformationen und erschwertem Membraneinbau erfüllen THF-gram-Hybride diese Voraussetzung. Bei der Experimentdurchführung waren diese Eigenschaften von Nachteil, da sie mit einer geringen Ansprechrate einhergingen und die Untersuchungsbedingungen erschwerten. Unter dem Gesichtspunkt der praktischen Anwendung sind diese Eigenschaften jedoch eine gute Möglichkeit zur Kontrolle der Wirkungsstärke, insbesondere weil eine 100%-ige Einbaurate das physiologische Gleichgewicht stören und somit zum Zelltod führen könnte.

Um optimale Kontrolle zu gewährleisten, wäre die Entwicklung einer Steuerung wünschenswert, welche den Kanal in offenen oder geschlossenen Zustand überführen kann. Die Übergänge zwischen aktiven und nicht aktiven Konformationen könnten durch einen „Schaltermechanismus“ kontrolliert werden, der z.B. mit Laserlicht bestimmter Wellenlänge betätigt werden könnte. Derartige Mechanismen wurden bereits für Gramicidin entwickelt (Borisenko et al., 2000; Loughheed et al., 2004) und könnten in angepasster Form auch bei

THF-gram-Hybriden ihre Wirkung entfalten. Ein weiterer Vorteil eines solchen Schalters wäre die zielgerichtete Aktivierung der Kanäle im gewünschten Gewebe, ohne dass sich die Wirkung im umgebenden oder gar funktionell antagonistischen Gewebe entfalten würde. Zwar würden auch in diesem Geweben Kanäle eingebaut, aber durch fehlende Aktivierung wären diese funktionslos.

Aus den Überlegungen zur Kontrolle der Aktivität ergibt sich eine weitere praxisrelevante Frage, die auch unter dem Begriff des „targeting“ bekannt ist: wie erreicht ein Kanal das gewünschte Zielgewebe, in dem er seine Wirkung entfalten soll? Der Ansatz des Schaltermechanismus mit Aktivierung über Laserlicht ist nur dann anwendbar, wenn das Zielgewebe von außen erreicht werden kann. Bei anderen Geweben wäre dieser Ansatz nicht durchführbar. In der Onkologie werden aktuell Ansätze zur Kopplung therapeutischer Wirkstoffe an gegen das Zielgewebe gerichtete Antikörper geprüft (Henry et al., 2004; Safavy et al., 2004). Dieser Ansatz könnte auch bei der Anwendung von THF-gram-Hybriden von Bedeutung sein, er bedürfte jedoch weiterer Überprüfung.

Die Irreversibilität des Membraneinbaus sowie das schmale wirksame Konzentrationsspektrum bei THF-gram-Hybriden sind weitere Nachteile für die Kontrolle der Kanalaktivität. Der fehlenden Auswaschbarkeit von THF-gram-Hybriden steht zwar ihre moderate Wirkung gegenüber. Aus einer aktuellen Arbeit wird jedoch deutlich, dass Reversibilität des Einbaus ein wichtiges Werkzeug zur Steuerung der Effekte darstellen kann (Leevy et al., 2004).

Außer der Kontrolle ist die Erfüllung spezifischer Eigenschaften bezüglich Selektivität und Leitfähigkeit entscheidend für therapeutische Anwendung. Als anschauliches Beispiel sei beim Glaukom das Trabekelwerk aufgeführt, bei dem zur Verbesserung des Kammerwasserabflusses ein kaliumselektiver Kanal notwendig wäre (siehe auch 4.3.2). Im Gegenteil dazu würde bei zystischer Fibrose in den betroffenen Epithelien ein derartiger Kanal keinen therapeutischen Beitrag leisten, ein PKA gesteuerter, chloridselektiver Kanal wäre notwendig. Auch bei der Leitfähigkeit sollte der künstliche Kanal in der induzierten Stromstärke ähnliche Eigenschaften wie der fehlende oder funktionslose Kanal haben. Daher muss die Ausbildung selektiver Eigenschaften und die Untersuchung der Leitfähigkeiten einen wichtigen Fokus der Weiterentwicklung von THF-Hybriden darstellen.

Einen Vorteil gegenüber nativen Strukturen bieten THF-gram-Hybride durch ihren einfachen Aufbau. Mit der Möglichkeit zur Synthese struktureller Kanalvarianten kann Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften genommen werden. Die Arbeitsgruppe um Prof. Koert konnte die Umsetzbarkeit solcher Modifikationen zeigen; somit ist mit THF-gram-Hybriden das Potential zur raschen Entwicklung von geeigneten Kanälen zur praktischen Anwendung gegeben.

Eine besondere Möglichkeit zur therapeutischen Anwendung bietet sich für linked-gram-TBDPS. Für einen Einsatz als Antibiotikum ist die hohe Wirksamkeit der Substanz durchaus wünschenswert. Die Idee der antibiotischen und onkologischen Anwendung potenter synthetischer Ionenkanäle wird auch von anderen Arbeitsgruppen verfolgt (Panchal et al., 2002). Gramicidin wird im begrenzten Umfang in antimykotischen Kombinationspräparaten zur topischen Anwendung gegen lokale Pilzinfektionen verwendet (Hancock, 2001). Daher wäre es sinnvoll, auch linked-gram-TBDPS auf antibiotische oder antimykotische Wirksamkeit hin zu untersuchen.

Außer der Möglichkeit der klinischen Anwendung leisten künstliche Ionenkanäle einen Beitrag zum Verständnis der Kanalfunktion. Mit dem Ersatz von Aminosäuren durch synthetische Bausteine, wie z.B. bei THF-gram, lässt sich die Funktion und die Struktur der Basissubstanz sowie der eingesetzten Bausteine besser verstehen. Durch Kombination röntgenkristallographischer Untersuchungen mit Experimenten in biologischen Milieus könnten zusätzliche wichtige Informationen über die Struktur und ihre Interaktionen mit biologischen Membranen gewonnen werden.

Als letztes sei die Anwendung künstlicher Ionenkanäle für neue Biotechnologien genannt. Ein Beispiel ist die Anwendung von Gramicidin als Nanosensoren in elektronischen Schaltkreisen (Cornell et al., 1997; Cornell et al., 1999). Im Vergleich zu Gramicidin könnten Nanosensoren mit THF-gram-Hybriden eine viel höhere Sensibilität aufweisen, wenn sie nur auf bestimmte Reagenzien, z.B. Kaliumionen, reagieren würden.

4.3.2 Pathophysiologische Bedeutung von THF-Gramicidin-Hybriden für das Trabekelwerk

Wie lassen sich THF-gram-Hybride im Fall von Glaukom und Trabekelwerk zur therapeutischen Anwendung umsetzen und welche Eigenschaften von Kanälen wären dazu notwendig?

Ein wichtiges Therapieziel beim Glaukom ist die Senkung des Augeninnendruckes, da auf diese Weise das Risiko von Schäden am Nervus opticus gesenkt wird. Eine Senkung des Augeninnendruckes mittels Relaxation des Trabekelwerkes wäre durch Hyperpolarisation des Gewebes zu erreichen (siehe Kapitel 1.4.1). In solchem Fall würde die Aktivität spannungsabhängiger Calciumkanäle gesenkt werden, was zur abgeschwächten Kontraktilität des Gewebes führen würde. Physiologisch wird diese Aufgabe von Maxi-K-Kanälen übernommen, welche das Membranpotential unterhalb der Aktivierungsschwelle von Calciumkanälen aufrechterhalten. Mit dem Membraneinbau eines künstlichen Kanals mit ähnlichen Eigenschaften wie denen des Maxi-K-Kanals wäre eine negative Verschiebung des Ruhemembranpotentials und somit eine Senkung des Augeninnendruckes zu erwarten, womit das gewünschte Ziel erreicht wäre.

In Bilayerexperimenten zeigten sowohl THF-gram als auch THF-gram-TBDPS eine leichte Präferenz für Kalium- gegenüber Natriumionen. Leider erlaubte die geringe K^+ -Selektivität keine Hyperpolarisation der Zelle. Die gestiegene Natriumleitfähigkeit in BTM-Zellen durch Einbau des Kanals führte sogar zum entgegengesetzten Effekt. Daher sollte ein Ziel der Weiterentwicklung von THF-gram-Hybriden eine Erhöhung der K^+ -Selektivität sein. Im optimalen Fall sollte diese 2-4 Zehnerpotenzen höher als die Na^+ -Selektivität sein.

Die Auswirkung von THF-gram auf das Ruhemembranpotential ist von entscheidender Bedeutung für die Zellfunktion von BTM-Zellen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Calciumkanäle vom L-Typ eine entscheidende Rolle für die Kontraktilität von Trabekelwerkszellen spielen (Steinhausen et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass in glatten Muskelzellen der Subtyp $Ca_v1.2$ des L-Typ Calciumkanals für Kontraktionsvorgänge verantwortlich ist (Diebold et al., 1992; Takimoto et al., 1997; Welling et al., 1997). Es ist anzunehmen, dass $Ca_v1.2$ auch im Trabekelwerk funktionell exprimiert wird. Dieser Subtyp wird bei einer Depolarisation auf -30 mV aktiviert. Die THF-gram-bedingte

Potentialverlagerung brachte das Umkehrpotential genau in den Bereich der Aktivierungsschwelle von L-Typ Kanälen. Damit wäre eine verstärkte Kontraktilität von Trabekelwerkszellen zu erwarten, ohne dass die Grundfunktionen der Zelle durch zu starke Angleichung des Potentials an 0 mV beeinträchtigt wären. Die Untersuchung des Trabekelwerkes am Kontraktionsstand, die eine etablierte Methode zur funktionellen Betrachtung darstellt (Lepple-Wienhues et al., 1991), könnte in Zukunft Antworten auf diese Frage liefern.

Ein Problem bei der praktischen Anwendung ist das bereits besprochene „targeting“. Sowohl die Idee des Antikörperkonjugats als auch des Schaltermechanismus wären im Fall des Trabekelwerkes zu diskutieren. Das Gewebe ist von extern gut erreichbar, was therapeutisch in Form von Augentropfen genutzt wird (Pfeiffer, 2001). Die Anwendung des lichtgesteuerten Schalters wäre somit denkbar (siehe 4.3.1), die Aktivierung der Kanäle könnte z.B. durch eine Laserbehandlung erfolgen.

Bei möglichen Langzeiteffekten des Kanaleinbaus sollte berücksichtigt werden, dass veränderte elektrophysiologische Membraneigenschaften Kompensationsmechanismen aktivieren können. Solche Phänomene sind bei Membranproteinen bekannt, z.B. kommt es bei Therapie des Bluthochdrucks zur veränderten Expression der NO-Synthase (Li et al, 2002). Im Fall des Trabekelwerkes wäre z.B. eine verminderte Expression von Maxi-K-Kanälen denkbar.

Eine therapeutische Anwendung von linked-gram-TBDPS beim Glaukom erscheint wegen seiner toxischen Potenz unwahrscheinlich. Es bleibt die Frage, inwiefern die Substanz bei anderen ophthalmologischen Erkrankungen, insbesondere bei Infektionskrankheiten, von Nutzen wäre.

5 Zusammenfassung

Durch Ausübung physiologischer Grundfunktionen spielen Ionenkanäle eine entscheidende Rolle für die reguläre Funktion von Zellen. Zum besseren Verständnis ihrer Struktur und Funktion sind Untersuchungen natürlicher und künstlicher Ionenkanäle wichtige Werkzeuge. Großes analytisches und therapeutisches Potential ist in der Untersuchung künstlicher Kanäle in lebenden Zellen vorhanden, was bisher wenig Beachtung fand.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der künstlichen Ionenkanäle THF-gram, THF-gram-TBDPS sowie linked-gram-TBDPS auf elektrophysiologische Eigenschaften boviner Trabekelwerkzellen des Auges anhand von Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus analysiert. Die Untersuchung brachte folgende Erkenntnisse:

1. Die Inkorporation aller drei Verbindungen war erfolgreich, was sich durch Anstieg der Stromdichte und Verschiebung des Umkehrpotentials zeigte.
2. Einbau von THF-gram und THF-gram-TBDPS war mit dem Überleben der Zellen vereinbar, während linked-gram-TBDPS aufgrund einer sehr potenten Antwort bereits bei sehr geringen Konzentrationen zum raschen Zelltod führte.
3. Eine Asymmetrie der Stromantwort zugunsten stärkerer Auswärtsströme wurde bei THF-gram und in schwächerer Ausprägung bei THF-gram-TBDPS festgestellt. Linked-gram-TBDPS zeigte keine derartige Asymmetrie.
4. Unter Verwendung von Cs^+ als Ladungsträger war der beobachtete Anstieg der Stromdichte bei allen drei Verbindungen eindeutig stärker als unter physiologischen Bedingungen (Na^+/K^+). Somit zeigten die Verbindungen in lebenden Zellen analog zu Bilayern Selektivitätsverhalten der Eisenmanreihe I.
5. Die beobachteten funktionellen Unterschiede zwischen den untersuchten Substanzen können zum großen Teil auf ihre Struktur und die verwendeten Bausteine zurückgeführt werden. Für endgültige Aussagen sind weitere analytische und funktionelle Untersuchungen notwendig.
6. Die dargestellten Erkenntnisse sind ein erster Schritt zur therapeutischen Anwendung von künstlichen Ionenkanälen. Eine Weiterentwicklung in Richtung höherer Selektivität und besserer Kontrolle ist jedoch genauso erforderlich wie die Klärung der praktischen Umsetzbarkeit.

Literaturverzeichnis

Ackerman M.J. und Clapham D.E. Ion channels--basic science and clinical disease (1997), *New England Journal of Medicine*, 336, 1575-86

Arhem P. Voltage sensing in ion channels: a 50-year-old mystery resolved? (2004), *Lancet*, 363, 1221-1223

Armstrong K.M., Quigley E.P., Quigley P., Crumrine D.S. et al. Covalently linked gramicidin channels: effects of linker hydrophobicity and alkaline metals on different stereoisomers (2001), *Biophys J*, 80, 1810-1818

Arndt H.-D., Vescovi A., Schrey A., Pfeifer J.R. et al Solution phase synthesis and purification of the minigramicidin ion channels and a succinyl-linked gramicidin (2002), *Tetrahedron*, 58, 2789-2801

Arndt H.D., Knoll A., und Koert U. Cyclohexylether delta-Amino Acids: New Leads for Selectivity Filters in Ion Channels (2001), *Angewandte Chemie International Edition English*, 40, 2076-2078

Banghart M., Borges K., Isacoff E., Trauner D. et al Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing (2004), *Nat Neurosci*, 7, 1381-1386

Barrantes F.J. The acetylcholine receptor ligand-gated channel as a molecular target of disease and therapeutic agents (1997), *Neurochem Res*, 22, 391-400

Baumeister B., Sakai N., und Matile S. Giant artificial ion channels formed by self-assembled, cationic rigid-rod beta-barrels (2000), *Angewandte Chemie International Edition English*, 39, 1955-1958

Bean R.C., Shepherd W.C., Chan H., und Eichner J. Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein membranes (1969), *J Gen Physiol*, 53, 741-757

Beech D.J., Muraki K., und Flemming R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP (2004), *J Physiol*, 559, 685-706

Bellezza A.J., Rintalan C.J., Thompson H.W., Downs J.C. et al Deformation of the lamina cribrosa and anterior scleral canal wall in early experimental glaucoma (2003), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *44*, 623-637

Bernard C., Anderson A., Becker A., Poolos N.P. et al Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy (2004), *Science*, *305*, 532-535

Bernstein J. *Elektrobiologie*. (1912), Braunschweig: Vieweg und Sohn, *1852*, 199–216

Borisenko V., Burns D.C., Zhang Z., und Woolley G.A. Optical switching of ion-dipole interactions in a gramicidin channel analogue (2000), *Journal of the American Chemical Society*, *122*, 6364-6370

Bradding P. und Conley E.C. Human mast cell ion channels (2002), *Clin Exp Allergy*, *32*, 979-983

Chadwick D.J. und Cardew G. *Gramicidin and related ion channel-forming peptides* (1999), Chichester, Wiley Ed.

Corey D.P. und Stevens F.C. *Science and technology of patch recording electrodes* (2004), Plenum Verlag, New York, from *Single Channel Recording* B.Sakmann and E.Neher editors, 53-86

Cornell B.A., Braach-Maksvytis V.L., King L.G., Osman P.D. et al A biosensor that uses ion-channel switches (1997), *Nature*, *387*, 580-3

Cornell B.A., Braach-Maksvytis V.L., King L.G., Osman P.D. et al The gramicidin-based biosensor: a functioning nano-machine (1999), *Novartis Foundation Symposium*, *225*, 231-49

Davis P.B., Drumm M., und Konstan M.W. Cystic fibrosis (1996), *Am J Respir Crit Care Med*, *154*, 1229-1256

Diebold R.J., Koch W.J., Ellinor P.T., Wang J.J. et al Mutually exclusive exon splicing of the cardiac calcium channel alpha 1 subunit gene generates developmentally regulated isoforms in the rat heart (1992), *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*, 1497-1501

Doyle D.A., Morais C.J., Pfuetzner R.A., Kuo A. et al The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity (1998), *Science*, 280, 69-77

Eisenman G. Cation selective glass electrodes and their mode of operation (1962), *Biophys J*, 2, 259-323

Elkayam U., Mehra A., Cohen G., Tummala P.P., Karaalp I.S., Wani O.R., Canetti M. Renal circulatory effects of adenosine in patients with chronic heart failure (1998), *J Am Coll Cardiol*, 32, 211-215.

Fechtner R.D. und Weinreb R.N. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma (1994), *Surv Ophthalmol*, 39, 23-42

Flach C.F., Lange S., Jennische E., und Lonroth I. Cholera toxin induces expression of ion channels and carriers in rat small intestinal mucosa (2004), *FEBS Lett*, 561, 122-126

Ghadiri M.R., Granja J.R., und Buehler L.K. Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes (1994), *Nature*, 369, 301-304

Gokel G.W., Ferdani R., Liu J., Pajewski R. et al Hydraphile channels: models for transmembrane, cation-conducting transporters (2001), *Chemistry*, 7, 33-9

Gokel G.W. und Mukhopadhyay A. Synthetic models of cation-conducting channels (2001), *Chem Soc Rev*, 30, 274-286

Gokel G.W., Schlesinger P.H., Djedovic N.K., Ferdani R. et al Functional, synthetic organic chemical models of cellular ion channels (2004), *Bioorg Med Chem*, 12, 1291-1304

Goldensohn E.S. Animal electricity from Bologna to Boston (1998), *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 106, 94-100

Gong H., Tripathi R.C., und Tripathi B.J. Morphology of the aqueous outflow pathway (1996), *Microsc Res Tech*, 33, 336-367

Greger R., Windhorst U. *Comprehensive human physiology* (1996), Springer Verlag

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. et al Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches (1981), *Pflugers Arch*, *391*, 85-100

Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials (2001), *Lancet Infect Dis*, *1*, 156-164

Hartshorne R.P., Keller B.U., Talvenheimo J.A., Catterall W.A. et al Functional reconstitution of purified sodium channels from brain in planar lipid bilayers (1986), *Ann N Y Acad Sci*, *479*, 293-305

Henry M.D., Wen S., Silva M.D., Chandra S. et al A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer (2004), *Cancer Res*, *64*, 7995-8001

Heymann J.B., Agre P., und Engel A. Progress on the structure and function of aquaporin 1 (1998), *J Struct Biol*, *121*, 191-206

Hille B. Ionic channels of the excitable membranes (1992), Sunderland, Sinauer Associates

Hladky S.B. und Haydon D.A. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics (1970), *Nature*, *225*, 451-453

Hodgkin A.L. und Keynes R.D. The potassium permeability of a giant nerve fibre. (1955), *J Physiol*, *128*, 61-88

Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon *Loligo*. (1952), *J. Physiol. (Lond.)* *116*, 449–472

Hotchkiss R.D. und Dubos R.J. Fractionation of bactericidal agent from cultures of a soil bacillus. (1940), *J Biol Chem*, *132*, 791-792

Hudson A.J., Ebers G.C., und Bulman D.E. The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases (1995), *Brain*, *118*, 547-563

Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V. et al X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel (2003), *Nature*, 423, 33-41

Keating M.T. The long QT syndrome. A review of recent molecular genetic and physiologic discoveries (1996), *Medicine (Baltimore)*, 75, 1-5

Kumita J.R., Smart O.S., und Woolley G.A. Photo-control of helix content in a short peptide (2000), *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 3803-8

Kuo A., Gulbis J.M., Antcliff J.F., Rahman T. et al Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state (2003), *Science*, 300, 1922-1926

Laohachai K.N., Bahadi R., Hardo M.B., Hardo P.G. et al The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: implications for diarrhea (2003), *Toxicon*, 42, 687-707

Leevy W.M., Huettner J.E., Pajewski R., Schlesinger P.H. et al Synthetic ion channel activity documented by electrophysiological methods in living cells (2004), *J Am Chem Soc*, 126, 15747-15753

Lepple-Wienhues A., Stahl F., und Wiederholt M. Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle (1991), *Exp Eye Res*, 53, 33-38

Li H., Wallerath T., Munzel T., und Forstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs (2002), *Nitric Oxide*, 7, 149-164

Lohff B. Facts and philosophy in neurophysiology. The 200th anniversary of Johannes Muller (1801-1858) (2001), *J Hist Neurosci*, 10, 277-292

Lougheed T., Borisenko V., Hennig T., Ruck-Braun K. et al Photomodulation of ionic current through hemithioindigo-modified gramicidin channels (2004), *Org Biomol Chem*, 2, 2798-2801

Lutjen-Drecoll E. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes (1999), *Prog Retin Eye Res*, 18, 91-119

Mannhold R. KATP channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential (2004), *Med Res Rev*, 24, 213-266

Molleman A Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology (2003), John Wiley & Sons, Ltd

Narahashi T., Moore J.W., und Scott W.R. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons (1964), *J Gen Physiol*, 47, 965-974

Neher E. und Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. (1976), *Nature*, 260, 799-802.

Nelson M. und Quayle J. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. (1995), *Am J Physiol*, 268, 799-822

Nilius B. Pflugers Archiv and the advent of modern electrophysiology. From the first action potential to patch clamp (2003), *Pflugers Arch*, 447, 267-271

Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M. et al Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits (1983), *Nature*, 302, 528-532

Numberger M und Draguhn A Patch Clamp Technik (1996), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

Panchal R.G., Smart M.L., Bowser D.N., Williams D.A. et al Pore-forming proteins and their application in biotechnology (2002), *Curr Pharm Biotechnol*, 3, 99-115

Peskar B.M., Ehrlich K., und Peskar B.A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat (2002), *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 969-974

Pfeiffer N. Glaukom (2001), Georg Thieme Verlag Stuttgart

Piccolino M. Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani (1998), *Brain Res Bull*, 46, 381-407

Popp R., Englert H.C., Lang H.J., und Gogelein H. Inhibitors of nonselective cation channels in cells of the blood-brain barrier (1993), *EXS*, 66, 213-218

Quigley H.A. Number of people with glaucoma worldwide (1996), *Br J Ophthalmol*, 80, 389-393

Quigley H.A., McKinnon S.J., Zack D.J., Pease M.E. et al Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats (2000), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 3460-3466

Reeves D.C. und Lummis S.C. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review) (2002), *Mol Membr Biol*, 19, 11-26

Romero M., Sanchez I., und Pujol M.D. New advances in the field of calcium channel antagonists: cardiovascular effects and structure-activity relationships (2003), *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 1, 113-141

Rosenthal R. L-Typ Ca²⁺-Kanal, FGF-Rezeptor 2 und Pathomechanismen der retinalen Dystrophie (2000), Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin, naturwissenschaftliche Dissertation

Rota M. und Vassalle M. Patch-clamp analysis in canine cardiac Purkinje cells of a novel sodium component in the pacemaker range (2003), *J Physiol*, 548, 147-165

Rothberg B.S. Allosteric modulation of ion channels: the case of maxi-K (2004), *Sci STKE*, 227, 16

Rottenberg H. und Koeppe R.E. Stimulation of cation transport in mitochondria by gramicidin and truncated derivatives (1989), *Biochemistry*, 28, 4361-7

Russo E. The birth of biotechnology (2003), *Nature*, 421, 456-457

Safavy A., Georg G.I., Vander V.D., Raisch K.P. et al Site-specifically traced drug release and biodistribution of a paclitaxel-antibody conjugate toward improvement of the linker structure (2004), *Bioconjug Chem*, 15, 1264-1274

Sandblom J., Galvanovskis J., Jilderos B. Voltage-dependent formation of gramicidin channels in lipid bilayers. (2001), *Biophys J.*, *81*, 827-37

Schmidt K. Charakterisierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an glialen Vorläuferzellen der Maus. (1998), Dissertationsschrift am Institut für Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Schrey A., Osterkamp F., Straudi A., Rickert C. et al Synthesis of Enantiomerically Pure Amino Acids Containing 2,5-Disubstituted THF Rings in the Molecular Backbone (1999), *European Journal of Organic Chemistry* 2977-2990

Schrey A., Vescovi A., Knoll A., Rickert C. et al Synthesis and Functional Studies of a Membrane-Bound THF-Gramicidin Cation Channel (2000), *Angewandte Chemie International Edition English*, *39*, 900-902

Shimkets R.A., Warnock D.G., Bositis C.M., Nelson-Williams C. et al Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel (1994), *Cell*, *79*, 407-414

So I. und Kim K.W. Nonselective cation channels activated by the stimulation of muscarinic receptors in mammalian gastric smooth muscle (2003), *J Smooth Muscle Res*, *39*, 231-247

Stankovic C.J., Heinemann S.H., Delfino J.M., Sigworth F.J. et al Transmembrane channels based on tartaric acid-gramicidin A hybrids (1989), *Science*, *244*, 813-7

Stankovic C.J. und Schreiber S.L. Molecular design of transmembrane ion channels (1991), *Chemtracts: Organic Chemistry*, *4*, 1-19

Steinhausen K., Stumpff F., Strauss O., Thieme H. et al Influence of muscarinic agonists and tyrosine kinase inhibitors on L-type Ca(2+)Channels in human and bovine trabecular meshwork cells (2000), *Exp Eye Res*, *70*, 285-293

Stumpff F., Strauss O., Boxberger M., und Wiederholt M. Characterization of maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate (1997), *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*, *38*, 1883-92

Stumpff F. und Wiederholt M. Regulation of trabecular meshwork contractility (2000), *Ophthalmologica*, 214, 33-53

Sukharev S. und Anishkin A. Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? (2004), *Trends Neurosci*, 27, 345-351

Tabushi I., Kuroda Y., und Yokota K. A,B,D,F-Tetrasubstituted Beta-Cyclodextrin as artificial channel compound. (1982), *Tetrahedron Letters*, 23, 4601-4604

Takimoto K., Li D., Nerbonne J.M., und Levitan E.S. Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac alpha 1C and alpha 1D voltage-gated Ca²⁺ channel mRNAs (1997), *J Mol Cell Cardiol*, 29, 3035-3042

Tasaki I. und Hagiwara S. Demonstration of two stable potential states in squid axon under tetraethylammonium chloride. (1957), *J Gen Physiol*, 40, 859-885

Urry D.W., Goodall M.C., Glickson J.D., und Mayers D.F. The gramicidin A transmembrane channel: characteristics of head-to-head dimerized (L,D) helices (1971), *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 68, 1907-11

Vereb G., Szollosi J., Matko J., Nagy P. et al Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model (2003), *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8053-8058

Wallace B.A. Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A (1998), *Journal of Structural Biology*, 121, 123-41

Wallace B.A. Common structural features in gramicidin and other ion channels (2000), *Bioessays*, 22, 227-234

Weinreb R.N. und Khaw P.T. Primary open-angle glaucoma (2004), *Lancet*, 363, 1711-1720

Welling A., Ludwig A., Zimmer S., Klugbauer N. et al Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca²⁺ channels (1997), *Circ Res*, 81, 526-532

Wendt K.S., Schall I., Huber R., Buckel W. et al Crystal structure of the carboxyltransferase subunit of the bacterial sodium ion pump glutaconyl-coenzyme A decarboxylase (2003), EMBO J,22, 3493-3502

Wiederholt M., Thieme H., und Stumpff F. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility (2000), Progress in Retinal and Eye Research, 19, 271-95

Yoshino N., Satake A., und Kobuke Y. An artificial ion channel formed by a macrocyclic resorcin[4]arene with amphiphilic cholic acid ether groups (2001), Angewandte Chemie, 113: 471-473

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
BTM	Bovines Trabekelwerk
DH	Doppelhelix
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
Gly	Glycin
G Ω -Seal	Gigaohm-Seal
HD	Helixdimer
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography)
Leu	Leucin
M	mol/l
PKA	Proteinkinase A
QT	Abstand im EKG zwischen der Q-Zacke und dem Ende der T-Welle
TBDPS	t-Butyldiphenylsilyl
TEA	Tetraethylammonium
THF	Tetrahydrofuran
THF-gram	Tetrahydrofuran-Gramicidin-Hybrid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	Tryptophan
TTX	Tetrodotoxin
Val	Valin
Vol	Volumen

6.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Olaf Strauß für Überlassung des Themas, methodische Einarbeitung sowie für exzellente Betreuung während der gesamten Zeit bedanken. Insbesondere werden mir die „Kanalsymposien“ in Erinnerung bleiben, die optimal für Motivation, Optimismus sowie neue Ideen und Anregungen sorgten. Der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wiederholt möchte ich für kollegiale Atmosphäre, kompetente Unterstützung und die nicht zu vergessenden Doktorandenseminare danken.

Für die Bereitstellung der künstlichen Kanäle sowie für hervorragende Kooperation gebührt der Dank Herrn Prof. Ulrich Koert und seinen Mitarbeitern vom Institut für Chemie der Humboldt Universität zu Berlin.

Besonderer Dank gilt Dr. Rita Rosenthal, Lars Choritz, Thomas Löber und Dr. Hagen Thieme, deren inhaltliche und formale Hinweise nicht nur beim Korrekturlesen eine Menge zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern bedanken, die mich über die gesamte Studienzeit unterstützten.

6.3 Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden bereits mit Genehmigung veröffentlicht:

Fidzinski P., Knoll A., Rosenthal R., Schrey A., Vescovi A., Koert U., Wiederholt M. und Strauss O.

Electrophysiological response of cultured trabecular meshwork cells to synthetic ion channels.

Chemistry & Biology 2003 Jan, 10, 35-43.

6.4 Lebenslauf

Geburtsdatum und -ort: 4. Juni 1975 in Wroclaw, Polen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Erfahrung

Oktober 2005 – heute	wiss. Mitarbeiter, Institut für Physiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin
Juni 2004 – September 2005	wiss. Mitarbeiter, Klinische Pharmakologie, Schering AG, Berlin
April 2002 - März 2003	Forschungsaufenthalt an der Yale University, USA
Oktober 1998- März 2000	Tutor für Anatomie und Physiologie, Freie Universität Berlin

Ausbildung

April 1997 - Mai 2003	Studium der Medizin an der Charité-Universitätsmedizin, Berlin
Oktober 1995 - März 1997	Studium des Technisches Umweltschutzes an der Technischen Universität Berlin, abgebrochen
Juli 1995	Hochschulreife (Abitur)

6.5 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Pawel Fidzinski, geboren am 4. Juni 1975 in Breslau, dass die hier vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfaßt wurde. Die Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar, die benutzten Hilfsmittel sowie Literatur sind vollständig angegeben.

Inhaltsverzeichnis

Abstract (deutsch)	III
Abstract (english)	IV
1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle	1
1.1.1 Historische Grundlagen	2
1.1.2 Aktueller Wissensstand über Ionenkanäle	4
1.2 Gramicidin A	7
1.3 Synthetische Ionenkanäle	10
1.3.1 THF-Gramicidin-Hybride und „kovalentes“ Gramicidin	11
1.4 Glaukom	16
1.4.1 Physiologie des Kammerwassertransportes und des Trabekelwerks	17
1.5 Fragestellung und Ziel	20
2 Methoden	21
2.1 Patch-Clamp-Technik	21
2.1.1 Experimentaufbau	26
2.1.2 Praktische Durchführung	27
2.1.3 Elektrische Stimulation und Pulsprotokolle	29
2.1.4 Statistische Auswertung und Analyse	31
2.2 Zellpräparation	32
2.3 Substanzen und Lösungen	33
2.3.1 Zellkultur	33
2.3.2 Lösungen für Patch-Clamp-Experimente	33
2.3.3 Synthetische Ionenkanäle	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Kontrollexperimente	36
3.2 THF-gram	39
3.2.1 Experimente mit Na ⁺ /K ⁺ als Ladungsträger	39
3.2.2 Experimente mit Cs ⁺ als Ladungsträger	46
3.2.3 Vergleich von Effekten zwischen verwendeten Ladungsträgern	46

3.3	THF-gram-TBDPS	47
3.3.1	Akute Experimente mit Na ⁺ /K ⁺ als Ladungsträger	48
3.3.2	Inkubationsexperimente.....	49
3.3.3	Experimente mit Cs ⁺ als Ladungsträger.....	51
3.4	Linked-gram-TBDPS und Gramicidin A.....	54
3.4.1	Gramicidin A.....	54
3.4.2	Linked-gram-TBDPS.....	57
4	Diskussion.....	60
4.1	Charakterisierung der natürlichen Stromantwort von BTM-Zellen	60
4.2	Effekte von künstlichen Ionenkanälen auf die Stromantwort von BTM-Zellen.....	61
4.2.1	THF-gram.....	61
4.2.2	THF-gram-TBDPS	64
4.2.3	Linked-gram-TBDPS.....	67
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	70
4.3.1	Mögliche Anwendung und Weiterentwicklung untersuchter Substanzen	71
4.3.2	Pathophysiologische Bedeutung von THF-Gramicidin-Hybriden für das Trabekelwerk	74
5	Zusammenfassung.....	76
	Literaturverzeichnis.....	77
6	Anhang.....	87
6.1	Abkürzungsverzeichnis	87
6.2	Danksagung.....	88
6.3	Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit.....	89
6.4	Lebenslauf.....	90
6.5	Eidesstaatliche Erklärung.....	91