

Zell-Transistor-Kopplung mit liganden-gesteuerten Ionenkanälen für hybride Biosensoren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biochem. Ingmar Peitz

geboren am 26. Oktober 1976, in Gifhorn

2007

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Koreferent: Prof. Dr. Peter Fromherz

Tag der Promotion: 17.11.2006

Zusammenfassung

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle üben eine zentrale Funktion während der synaptischen Transmission aus und werden mit einigen neurologischen Störungen in Verbindung gebracht. Neue *Screening*-Methoden für Liganden dieser Proteine, können die Entwicklung von Wirkstoffen gegen derartige Krankheiten vereinfachen und beschleunigen. Zur Entwicklung solcher Methoden können hybride Biosensoren aus Zellen und Mikrochips verwendet werden. Die Zell-Chip-Kopplung wurde bereits mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen in *Patch Clamp*-Experimenten untersucht. Für *Screening*-Methoden an liganden-gesteuerten Ionenkanälen muss das *Interfacing* von Zellen, die diese Kanäle exprimieren, an die Transistoren von Siliziumchips charakterisiert und ohne *Patch Clamp* durchgeführt werden.

Dazu wurde zunächst ein Expressionsplasmid mit der cDNA des liganden-gesteuerten Ionenkanals 5HT3A hergestellt, der durch die Bindung des Neurotransmitters Serotonin geöffnet wird. HEK293-Zellen wurden mit dieser cDNA transfiziert und elektrophysiologische Parameter des 5HT3A-Rezeptors wurden in *Patch Clamp*-Experimenten gemessen.

Die Zellen wurden dann auf Feldeffekt-Transistoren kultiviert, und das Zell-Chip-*Interfacing* wurde unter *Patch Clamp*-Bedingungen untersucht. Die Membranströme der Zellen führten zu messbaren Transistorsignalen. Bei der simultanen Messung des Membranstroms und des Transistorsignals ergaben sich Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Um diese Unterschiede zu erklären, wurde ein Modell entwickelt, welches die Diffusion von Serotonin im Spalt zwischen Zelle und Chip berücksichtigt, sowie eine Veränderung der Elektrolytzusammensetzung im Adhäsionsbereich im Vergleich zur Badlösung.

Für die Amplituden der Transistorsignale wurde dieselbe Konzentrationsabhängigkeit festgestellt wie für den Membranstrom aus elektrophysiologischen Messungen. Ebenso korrelierte die Abhängigkeit beider Signale vom angelegten Membranpotential. Elektrische Parameter der Zell-Chip-Kopplung und die homogene Verteilung der Kanäle in der Membran wurden mit Wechselspannungsmodulationen des Membranpotentials ermittelt.

In Experimenten ohne *Patch Clamp* konnte kein Transistorsignal bei HEK-5HT3A-Zellen gemessen werden. Daher wurden HEK-5HT3A-Zellen verwendet, die zusätzlich mit dem Kaliumkanal Kv1.3 transfiziert waren. In abschließenden Experimenten wurde gezeigt, dass diese Kombination von Ionenkanälen zu messbaren Transistorsignalen ohne *Patch Clamp* führt und damit für die weitere Entwicklung von zellbasierten Biosensoren geeignet ist.

Schlagwörter: Zell-Chip-Kopplung, zell-basierte Biosensoren, liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Abstract

Ligand-gated ion channels perform crucial tasks during synaptic transmission and are related to some neurological disorders. New screening methods for molecules, acting on these proteins, can simplify and accelerate the development of agents against these diseases. Hybrid sensors consisting of cells and microchips can be used to design such applications. The cell-chip interfacing has already been investigated with voltage-gated ion channels under Patch Clamp conditions. In order to develop an application with ligand-gated ion channels, the interfacing of cells, expressing these channels, with transistors of a silicon chip has to be characterised and advanced to conditions without Patch Clamp.

For this purpose an expression vector with the cDNA of the ligand-gated ion channel 5HT3A was designed which opens after the binding of the neurotransmitter serotonin. HEK293 cells were transfected with this cDNA and electrophysiological parameters of the 5HT3A receptor were probed in Patch Clamp experiments.

The cells were then cultivated on field effect transistors and the cell-chip interfacing was investigated under Patch Clamp conditions. The membrane currents lead to detectable transistor signals. In simultaneous recordings of membrane current and transistor signal a difference in the time course of the transistor signal was detected. To account for this difference a model was developed which considers the diffusion of serotonin into the cell-chip junction as well as changes in the electrolyte composition in the adhesion area with respect to the bathing solution.

The amplitudes of the transistor signals and the membrane currents from electrophysiological measurements showed the same concentration relationship. The dependency on the applied membrane potential was also the same for both signal amplitudes. Electrical parameters of the cell-chip junction and a homogeneous distribution of channels in the membrane were determined by applying alternating voltages to the membrane potential.

In experiments without Patch Clamp no transistor signal could be detected from HEK-5HT3A cells. Therefore HEK-5HT3A cells were used which were additionally transfected with the potassium channel Kv1.3. In final experiments it was demonstrated that this combination of ion channels led to detectable transistor signals without Patch Clamp and is therefore convenient for the further development of cell-based biosensors.

Keywords: Cell-Chip Interfacing, cell-based Biosensors, ligand-gated Ion Channels

INHALT

1. Einleitung	1
2. Theorie	3
2.1. Das Zell-Chip-Interfacing unter <i>Patch Clamp</i>	3
2.1.1. Transistoren als extrazelluläre Sensoren	3
2.1.2. Das Ein-Kompartiment-Modell mit konstanter Ionenkonzentration	4
2.1.3. Bestimmung der Kanalverteilung in der Zellmembran	10
2.1.4. Elektrodifffusion im Ein-Kompartiment-Modell	10
2.2. 5HT3A-Rezeptoren	12
2.2.1. Die Familie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle	12
2.2.2. Kinetisches Modell für den 5HT3A-Rezeptor	13
3. Material und Methoden	16
3.1. Zellkultur, Transfektion und stabile Zelllinien	16
3.1.1. HEK293-Kultur	16
3.1.2. Transfektion und Herstellung stabiler Zelllinien	16
3.1.3. HEK-Kv1.3-Zellen	16
3.2. Elektrophysiologie	16
3.2.1. <i>voltage clamp</i> und Stimulation der Zellen	16
3.2.2. Datenaufnahme	17
3.2.3. Lösungen für HEK-Zellen mit 5HT3A-Kanälen	17
3.2.4. Lösungen für Kv1.3- und doppelt transfizierte HEK-Zellen	18
3.2.5. Ligandenapplikation und Lösungswechsel	18
3.3. Transistormessungen	19
3.3.1. Chips	19
3.3.2. Sockel, Messkammer, Verstärker	20
3.3.3. Arbeitspunkt für Chipmessungen	20
3.3.4. Zellkultur auf Siliziumchips	20
3.3.5. Messung von Zell-Chip-Kopplungen	21
3.4. Datenverarbeitung und Software	22
4. Ergebnisse und Diskussion	23
4.1. Elektrophysiologie	23
4.1.1. Funktionelle Expression, Desensitivierung und Liganden	23
4.1.2. Strom-Konzentrationsabhängigkeit - Die Hill-Kurve	27
4.1.3. Strom-Spannungsabhängigkeit - Das Umkehrpotential	28
4.1.4. Zeitkonstanten	30
4.1.5. Vergleich mit Literaturwerten	31
4.2. Zell-Chip-Kopplung unter <i>Patch Clamp</i>-Bedingungen	35
4.2.1. Der zeitliche Verlauf der Kopplung	35
4.2.2. Modell des zeitlichen Verlaufs	37
4.2.3. Elektrophysiologische Parameter aus der zeitunabhängigen Kopplung	45
4.2.4. Wechselspannungsmessungen	49
4.2.5. Diskussion der Wechselspannungsmessungen	53
4.3. Kopplungen ohne <i>Patch Clamp</i>	57
4.3.1. Abschätzung des Signals ohne <i>voltage clamp</i>	57
4.3.2. Doppelt transfizierte Zellen	61
4.3.3. Messungen mit HEK-5HT3A-Kv1.3-Zellen	64
4.3.4. <i>Screening</i> nach 5HT3A- und Kv1.3-Liganden	69
5. Ausblick	70

6. Abkürzungsverzeichnis	72
<u>Anhang</u>	<u>74</u>
A Biochemischer Hintergrund	74
B Herstellung der Vektoren	82
C Experimente zur Expression	94
D Methode zur Simulation von Membranströmen	97
E Abschätzung der Spaltspannung ohne <i>voltage clamp</i>	101
F Verbrauchsmaterial und Chemikalien	105
Literaturverzeichnis	107

1. Einleitung

Die synaptische Transmission, d.h. die Übertragung eines Nervenimpulses von einem Neuron über eine Synapse zu einem weiteren Neuron, ist von elementarer Bedeutung für die Informationsübermittlung in neuronalem Gewebe. Diese Signalübertragung beruht auf der Ausschüttung eines biochemischen Neurotransmitters von der präsynaptischen Zelle in den synaptischen Spalt. Rezeptoren in der postsynaptischen Membran setzen das biochemische Signal in intrazelluläre Prozesse um oder erzeugen als liganden-gesteuerte Ionenkanäle ein elektrisches Signal.

Viele Wirkstoffe binden an diese Rezeptoren und können deren elektrische Aktivität beeinflussen. Barbiturate und Benzodiazepine sind bekannte Beispiele für eine Verstärkung des Cl^- -Stroms durch GABA_A -Kanäle. Auch die Blockierung von Ionenströmen mittels Liganden wird zur Behandlung neurologischer Störungen genutzt. Verbesserte Methoden zum *Screening* nach pharmakologischen Substanzen können die Suche nach neuen Wirkstoffen für diese Rezeptoren beschleunigen.

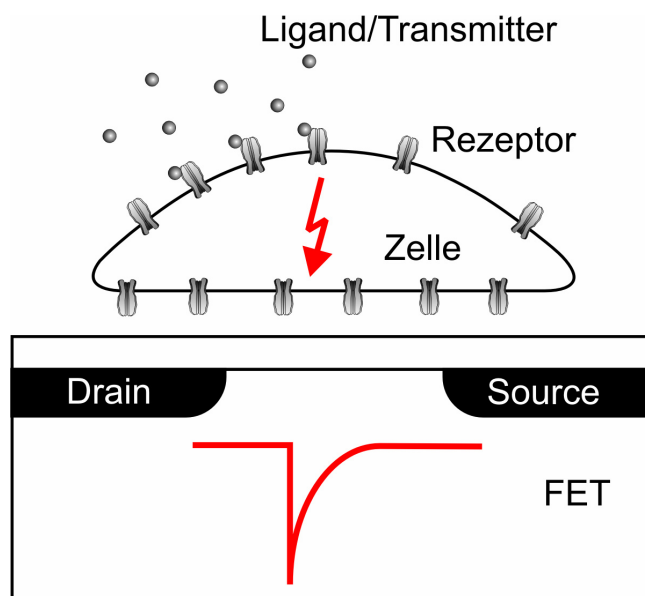


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Sensorkonzepts. Liganden eines Rezeptors lösen ein elektrisches Signal in der Zelle aus, welches ein Signal im Transistor (FET) erzeugt.

Die Kombination von Chiptechnologie und transfizierten Zelllinien kann zur Entwicklung von hybriden Zell-Chip-Sensoren für das *Pharmascreeing* genutzt werden. Abbildung 1 zeigt schematisch ein Konzept für einen zell-basierten Biosensor: Zellen exprimieren einen bestimmten Rezeptor und werden auf Transistorchips kultiviert. Die Bindung von Liganden

an die Rezeptoren erzeugt einen Membranstrom über die Zellmembran. Dieses Signal wird vom darunter liegenden Transistor aufgezeichnet. Durch eine große Anzahl an Zellen und Transistoren pro Chip stünde dann eine statistisch relevante Zahl an Signalen durch eine Messung zur Verfügung.

Zelllinien, wie z.B. HEK293 sind leicht herzustellen und in Kultur zu halten. Transistoren von Mikrochips können als Sensoren für Signale dieser Zellen genutzt werden. Die Zellen können mit den gewünschten, spezifischen Rezeptoren transfiziert werden und exprimieren im Gegensatz zu Neuronen aus Primärkulturen andere Kanäle nur in geringem Ausmaß.¹

Zur Beschreibung des *Zell-Chip-Interfacing* wurden bereits Zellen mit spannungsabhängigen Ionenkanälen für Kalium und Natrium an Transistoren gekoppelt.^{2,3} Der Ionenstrom durch die Kanäle erzeugte dabei messbare Signale in den Transistoren des Chips, und die Kopplung von Zellen an Chips ist für Natrium- und Kaliumkanäle gut verstanden. Für diese Experimente wurde das Zellinnere zur Kontrolle des Membranpotentials mit einer *Patch Clamp*-Elektrode kontaktiert, was die Charakterisierung des Zell-Chip-Kontaktes erleichterte. Für einen funktionellen Biosensor entsprechend Abbildung 1 muss allerdings auf die Elektrode verzichtet werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte als nächster Schritt für eine Sensoranwendung der liganden-gesteuerte Ionenkanal 5HT3A in HEK-Zellen exprimiert werden. Die Kopplung dieser Zellen an Transistorchips sollte dann unter *Patch Clamp*-Bedingungen untersucht werden. Anschließend sollte als Voraussetzung für einen funktionellen Biosensor ein *Zell-Chip-Interfacing* mit diesen Kanälen ohne *Patch*-Elektrode hergestellt werden.

Im Theorieteil dieser Arbeit werden die Grundlagen der Zell-Chip-Kopplung angesprochen, bevor kurz auf die verwendeten Kanäle eingegangen wird. Ergebnisse und Diskussion gliedern sich in einen elektrophysiologischen Teil als Referenz und die Zell-Chip-Kopplung mit und ohne *Patch Clamp*.

2. Theorie

2.1. Das Zell-Chip-Interfacing unter *Patch Clamp*

2.1.1. Transistoren als extrazelluläre Sensoren

Transistoren können als Sensoren für extrazelluläre Spannungen eingesetzt werden: Die Funktionsweise von Feldeffekttransistoren beruht auf dem spannungsinduzierten Ladungsträgerfluss zwischen *Source* und *Drain* an einer isolierenden Oxidschicht: Zwischen *Source* und *Drain* wird eine konstante Spannung angelegt, so dass ein *Drain*-Strom I_D fließt. In Abbildung 2A ist ein Feldeffekttransistor unter einer adhärenierten Zelle schematisch dargestellt.

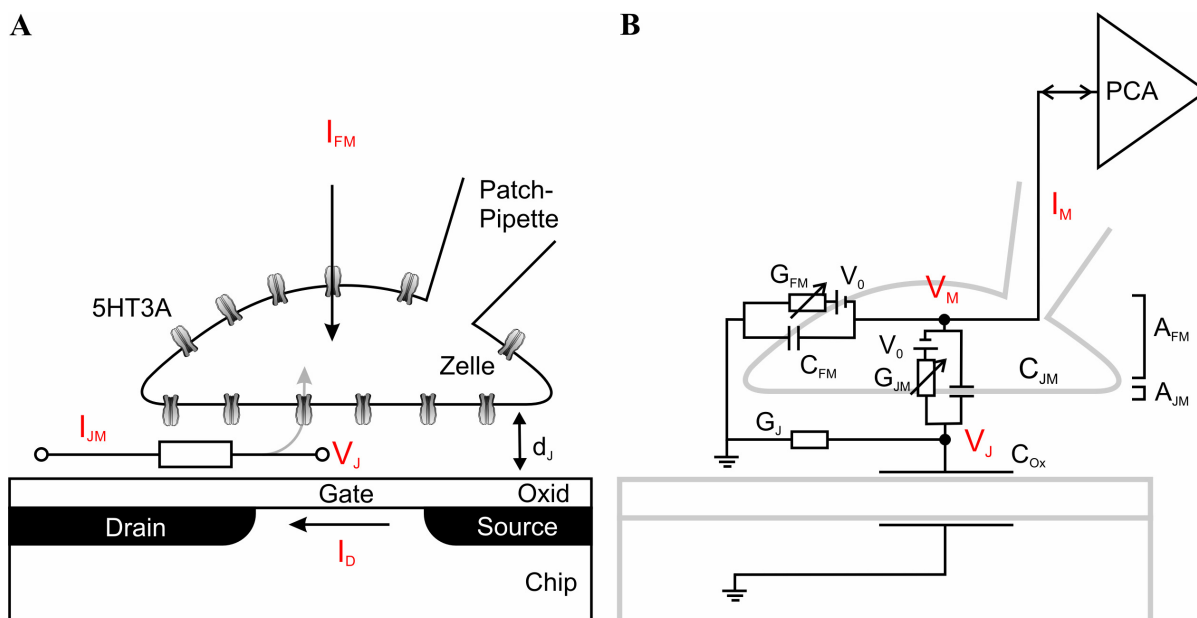


Abbildung 2: (A) Schema des Kontaktes von Zellen mit Serotonin-Rezeptoren (5-HT3A-Rezeptor) und Transistoren von Mikrochips. Die Zelle ist mit einer *Patch*-Pipette kontaktiert. Die Entstehung der Spaltspannung V_J ist skizziert. (B) *Interface* von Zelle und Chip als Ersatzschaltbild dargestellt (PCA = *Patch Clamp*-Verstärker, Index: FM = freie Membran, JM = adhärenierte Membran, J = Spalt, Ox = Oxid).

Wird eine weitere Spannung an die Oxidschicht zwischen *Source* und *Drain* angelegt (*Gate*-Spannung), entsteht ein elektrisches Feld im Oxid, welches zu einer Änderung der Ladungsträgerdichte an der Oxidschicht zwischen *Source* und *Drain* führt. Bei konstanter Spannung zwischen *Source* und *Drain* ändert sich dadurch der Drainstrom I_D . Änderungen der Spannung über dem *Gate* können somit durch die Modulation des Stromes I_D detektiert werden.

Adhärierte Zellen mit Ionenkanälen können die *Gate*-Spannung ändern und so I_D modulieren: Die Zellen adhären mit der Membran nicht direkt auf der Chipoberfläche, zwischen Zelle und Chip bleibt ein Spalt der Höhe d_j bestehen. Die Spalthöhe d_j liegt meist zwischen 30-100 Nanometern.^{4,5} Dieser Mindestabstand wird durch zahlreiche Wechselwirkungen von Adhäsionsrezeptoren mit Molekülen der extrazellulären Matrix hervorgerufen. Nachdem sich die Kanäle in der Plasmamembran geöffnet haben, fließt der Membranstrom I_M , der sich aus dem Strom durch die freie Membran I_{FM} und dem Strom durch die adhäre Membran I_{JM} zusammen setzt. Die Zellen können mit einer *Patch*-Pipette kontaktiert werden, um das Potential in der Zelle zu kontrollieren und den Gesamtstrom I_M zu messen. Während der Strom I_{FM} ungehindert durch die Ionenkanäle fließt, muss der Strom I_{JM} den Spalt zwischen Zelle und Chip passieren. Der Spalt wirkt als Widerstand, über den I_{JM} fließen muss. Aus dem Ohmschen Gesetz $V_j = 1/G_j \cdot I_{JM}$ resultiert daraus die Spaltspannung V_j über dem *Gate* des Transistors. V_j wirkt sich über das elektrische Feld im Oxid auf die Ladungsträgerdichte im *Source-Drain*-Kanal aus, und führt zu einer Modulation des Drainstroms I_D . Aus der Modulation von I_D kann V_j berechnet werden.

Eine Beschreibung von Modellen zur Charakterisierung von Zell-Chip-Kontakten findet sich bei Weis et al. (1996).⁶ Im folgenden Abschnitt wird kurz auf das Ein-Kompartiment-Modell eingegangen, welches zur Auswertung der Messungen in dieser Arbeit benutzt wurde.

2.1.2. Das Ein-Kompartiment-Modell mit konstanter Ionenkonzentration

Die elektrischen Eigenschaften von Zellen können durch Ersatzschaltbilder dargestellt werden. Der elektrische Kontakt zwischen Zelle und Chip wird durch ein Ersatzschaltbild wie in Abbildung 2B beschrieben. Dabei wird die Plasmamembran durch die Parallelschaltung der Leitfähigkeit der Ionenkanäle und der Membrankapazität ausgedrückt. In Abbildung 2B wird davon ausgegangen, dass die Zelle auf dem Substrat adhäre ist und mit einer Glaselektrode im *whole-cell* Modus der *Patch Clamp*-Technik kontaktiert ist. Die gesamte Membran der Zelle wird in die freie Membranfläche A_{FM} und die adhäre Membranfläche A_{JM} eingeteilt. Die freie Membran weist die Leitfähigkeit G_{FM} und die Kapazität C_{FM} auf. Das Ein-Kompartiment-Modell wird für die Membran im Adhäsionsbereich der Zelle verwendet. Die Spaltspannung V_j im Kontaktbereich wird nicht zweidimensional betrachtet, sondern auf einen Punkt reduziert. Analog zur freien Membran wird die adhäre Membran elektrisch durch die Parallelschaltung von Ionenkanalleitfähigkeit G_{JM} und Membrankapazität C_{JM} repräsentiert.

Die Oxidschicht des Chips wird als Kondensator mit der Kapazität C_{ox} angesehen. Die Leitfähigkeit der Oxidschicht G_{ox} wird vernachlässigt, da sie ein Isolator ist.

Membranstrom und Spaltspannung

Mittels *Patch Clamp*-Verstärker kann über die Elektrode die gewünschte Spannung V_M an die Zelle angelegt werden. Dazu wird ein Strom in die Zelle injiziert. Öffnen sich Ionenkanäle, fließen Ionen durch freie und adhärenierte Membranbereiche. Der Strom I_M , der dann vom *Patch Clamp*-Verstärker in die Zelle injiziert werden muss, um das Membranpotential konstant zu halten, entspricht diesem Ionenstrom und wird als Messwert für I_M ausgegeben. Nach Abbildung 2B setzt sich I_M aus den folgenden Ohmschen und kapazitiven Strömen zusammen:

$$I_M = G_{FM}(V_M - V_0) + G_{JM}(V_M - V_J - V_0) + C_{FM} \frac{dV_M}{dt} + C_{JM} \frac{d}{dt}(V_M - V_J)$$

Gleichung 1

V_0 ist das Umkehrpotential für den 5HT3A-Rezeptor, V_J die extrazelluläre Spannung im Spalt zwischen Zelle und Chip. Die elektrischen Eigenschaften der Ionenkanäle werden durch die Leitfähigkeiten G_{JM} und G_{FM} beschrieben. Für V_J im Ersatzschaltbild in Abbildung 2B folgt aus der Strombilanz:

$$(C_{JM} + C_{ox}) \frac{dV_J}{dt} = -G_J V_J + G_{JM}(V_M - V_J - V_0) + C_{JM} \frac{dV_M}{dt}.$$

Gleichung 2

G_J bezeichnet dabei die Leitfähigkeit des Zell-Chip-Kontaktes. Die Leitfähigkeit ist in Abbildung 2A und B als Widerstand eingezeichnet, über den der Strom im Spalt fließt, wodurch die Spannung V_J erzeugt wird.

Spaltleitfähigkeit G_J

Die Leitfähigkeit im Spalt G_J kann wie folgt ausgedrückt werden: Im Spalt liegt der Widerstand R_J gegenüber dem umgebenden Elektrolyten vor mit $R_J = r_J/\eta$. Für den zweidimensionalen Flächenwiderstand r_J gilt: $r_J = \rho_J/d_J$ (ρ_J : spezifischer Widerstand im Spalt in drei Dimensionen, d_J : Höhe des Spalts). η ist ein Geometriefaktor, der bei der Konstruktion des Ein-Kompartiment-Modells aus der Flächenkontakttheorie durch Mittelung erhalten wird. Dieser Geometriefaktor berücksichtigt verschiedene Kontaktsituationen zwischen Zelle und Transistor. Eine ausführlichere Beschreibung des Geometriefaktors η und der Leitfähigkeit G_J findet sich bei Schmidtner und Fromherz (2006).³ Ersetzen von r_J und Einsetzen des Geometriefaktors liefert für G_J :

$$G_J = \frac{\eta \cdot d_J}{\rho_J}.$$

Gleichung 3

Die Spaltleitfähigkeit hängt somit neben η auch von der Höhe d_J des Spalts und dem spezifischen Elektrolytwiderstand ρ_J ab.

Gleichspannungsfall

Der Widerstand $1/G_J$ verursacht den Spannungsabfall V_J über dem *Gate* des Transistors, wenn ein Strom durch den Spalt in die Zelle fließt. Dieser Spannungsabfall wird als Messsignal durch die Modulation des *Source-Drain*-Stroms erfasst. Die Leitfähigkeit G_J , die Kapazitäten und die Membranleitfähigkeiten können als flächenspezifische Größen ausgedrückt werden: $c_{JM} = C_{JM}/A_{JM}$, $c_{Ox} = C_{Ox}/A_{JM}$, $g_{JM} = G_{JM}/A_{JM}$, $g_{FM} = G_{FM}/A_{FM}$, $g_J = G_J/A_{JM}$. Mit dem Übergang zu flächenspezifischen Größen wird später die Berechnung der Kanalverteilung in den Membrandomänen ermöglicht. Wird Gleichung 2 durch A_{JM} geteilt, erhält man entsprechend:

$$(c_{JM} + c_{Ox}) \frac{dV_J}{dt} = -g_J V_J + g_{JM} (V_M - V_J - V_0) + c_{JM} \frac{dV_M}{dt}.$$

Gleichung 4

Im Gleichspannungsfall (*voltage clamp*-Modus) bleibt das Membranpotential durch die Strominjektion des *Patch Clamp*-Verstärkers auf einem konstanten Wert, es gilt $dV_M/dt = 0$. Aus Gleichung 4 folgt damit:

$$(c_{JM} + c_{Ox}) \frac{dV_J}{dt} = -g_J V_J + g_{JM} (V_M - V_J - V_0).$$

Gleichung 5

V_J geht bei Anlegen der Gleichspannung mit dem *Patch Clamp*-Verstärker nach einer kurzen Anstiegszeit, die durch eine Zeitkonstante $\tau = c_{Ox} + c_{JM}/(g_J + g_{JM})$ bestimmt wird, in den stationären Fall $dV_J/dt = 0$ über. g_{JM} kann dann durch Messen der Spannung V_J über dem Transistor berechnet werden, da mit $dV_J/dt = 0$ aus Gleichung 5

$$g_{JM} = \frac{V_J g_J}{(V_M - V_0)}$$

Gleichung 6

folgt, und gleichzeitig $V_J \ll V_M - V_0$ angenommen werden kann. Die kapazitiven Anteile spielen somit im Gleichspannungsfall keine Rolle mehr. Die Bestimmung von g_J ist mit Wechselspannungsmessungen möglich. Damit gilt ein vereinfachtes Ersatzschaltbild wie in Abbildung 3.

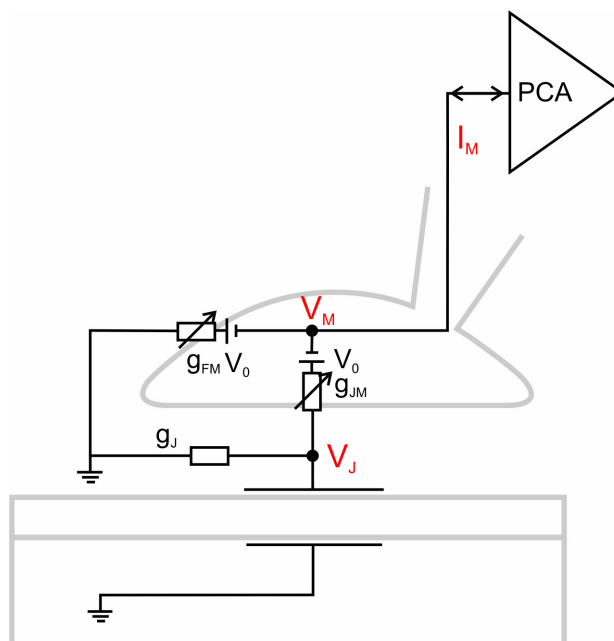


Abbildung 3: Ersatzschaltbild des Zell-Transistor-Kontaktes im Gleichspannungsfall nach dem Übergang zu flächenspezifischen Größen.

Die Beziehung zwischen V_J , I_M und den Membranleitfähigkeiten

Eine direkte Bestimmung von g_{FM} ist nicht möglich. g_{FM} lässt sich jedoch durch die Leitfähigkeit der gesamten Membran g_M und die Leitfähigkeit der adhären Membran g_{JM} bestimmen:

$$g_{FM} = \frac{g_M A_M - g_{JM} A_{JM}}{A_{FM}}.$$

Gleichung 7

Bei bekanntem Flächenverhältnis A_{JM}/A_M kann g_{FM} aus g_M und g_{JM} berechnet werden. g_M kann aus dem Membranstrom I_M und der Fläche der gesamten Membran A_M bestimmt werden:

$$g_M = \frac{G_M}{A_M} = \frac{I_M}{(V_M - V_0) A_M}.$$

Gleichung 8

Dabei wird $g_J \gg g_{JM}$ angenommen, so dass $(g_J g_{JM}) / (g_J + g_{JM}) \approx g_{JM}$ für eine Reihenschaltung der Leitfähigkeiten gesetzt werden kann. Über die Messung der Gesamtkapazität C_M kann die Fläche der Membran bestimmt werden: $A_M = C_M / c_M$. Die spezifische Membrankapazität c_M wurde für viele Zelltypen bestimmt und kann mit $c_M = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ als biologische Konstante angesehen werden.⁷ Daher kann auch angenommen werden, dass sich die kapazitiven

Eigenschaften der freien und adhärirten Membrandomänen nicht unterscheiden. Durch Zusammenfassen von Gleichung 6 und Gleichung 8 erhält man die Beziehung

$$\frac{V_J}{I_M} = \frac{1}{g_J A_M} \cdot \frac{g_{JM}}{g_M}$$

Gleichung 9

die den Skalierungsfaktor $1/(g_J A_M)$ und das Verhältnis der spezifischen Leitfähigkeiten enthält. Aus dem Quotient von Transistorsignal V_J und Membranstrom I_M kann somit direkt das Verhältnis der spezifischen Membranleitfähigkeiten berechnet werden, wenn der Skalierungsfaktor bekannt ist. Dieser Wert kann aus Wechselspannungsmessungen bestimmt werden. Das Verhältnis g_{JM}/g_M gibt dann eine mögliche Anreicherung oder Verarmung von Kanälen in der adhärirten Membran an.

Wechselspannungsmessung

Wechselspannungsmessungen werden zur Bestimmung von g_J und des Skalierungsfaktors $1/(g_J A_M)$ durchgeführt. Wechselspannungen bestimmter Amplitude und Frequenz werden um das Haltepotential angelegt, und die Spannung V_J im Spalt zwischen Zelle und Chip wird mit dem Transistor gemessen. Abbildung 4 zeigt das Ersatzschaltbild des Zell-Chip-Kontaktes im Wechselspannungsfall zur Bestimmung von g_J .

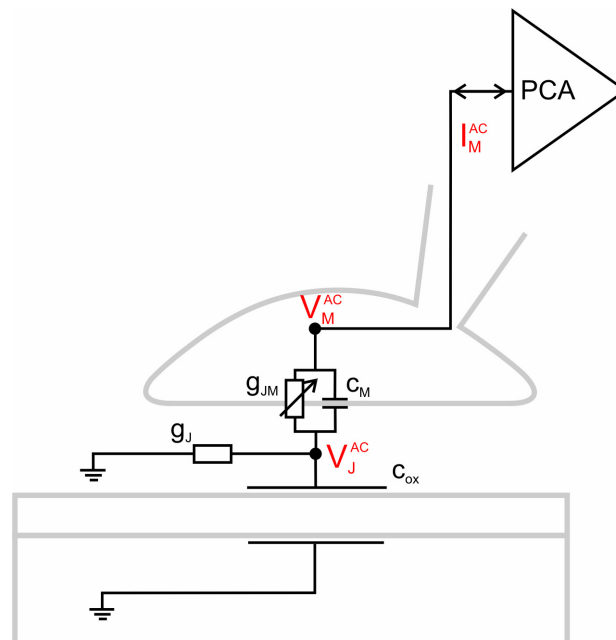


Abbildung 4: Ersatzschaltbild eines Zell-Transistor-Kontaktes mit *Patch*-Elektrode für das Ein-Kompartiment-Modell unter Wechselspannung.

Für das Ein-Kompartiment-Modell in Abbildung 4 wird die Transferfunktion h als Quotient aus Spaltspannung und Haltepotential definiert:

$$h := \frac{V_J^{AC}}{V_M^{AC}}.$$

Gleichung 10

Für den Betrag von h gilt dann:⁸

$$|h|^2 = h_0^2 \frac{1}{1 + (\omega\tau_J)^2} + h_\infty^2 \frac{(\omega\tau_J)^2}{1 + (\omega\tau_J)^2},$$

Gleichung 11

Im Experiment wird das Signal-Rausch-Verhältnis der Transistormessung bei kleineren Frequenzen der Haltepotentialmodulation schlechter. Der Frequenzbereich zur Bestimmung der Übertragungsfunktion ist daher im Experiment für niedrige Frequenzen durch das Rauschen des Transistors beschränkt. Bei hohen Frequenzen wird das Frequenzintervall für die Messung durch die Übertragungsfunktion des Messaufbaus begrenzt. Zur Bestimmung der Übertragungsfunktion können Frequenzen von $\omega = 3000\text{-}15000$ Hz verwendet werden. Für dieses Intervall gilt $\omega\tau_J \ll 1$ und Gleichung 11 kann vereinfacht werden zu:⁸

$$|h|^2 = h_0^2 + (h_\infty\tau_J)^2 \omega^2.$$

Gleichung 12

Für h_0 und h_∞ als Amplituden für $\omega \rightarrow 0$ und $\omega \rightarrow \infty$ und der Zeitkonstanten τ_J für den Spalt gelten folgende Beziehungen:

$$h_0 = \frac{g_{JM}}{g_{JM} + g_J},$$

Gleichung 13

$$h_\infty = \frac{c_M}{c_M + c_{Ox}},$$

Gleichung 14

$$\tau_J = \frac{c_M + c_{Ox}}{g_{JM} + g_J}.$$

Gleichung 15

Wird der Ligand bei Wechselfspannungsmessungen nicht appliziert, so dass alle Kanäle geschlossen sind, gilt für die Leitfähigkeit $g_{JM} = 0$. Gleichung 13 wird damit zu $h_0 = 0$ und einsetzen von h_0 , h_∞ und τ_J in Gleichung 12 ergibt:

$$|h| = \frac{c_M}{g_J} \omega,$$

Gleichung 16

Aus Wechsellspannungsmessungen bei verschiedenen Frequenzen müssen also die Beträge bzw. Amplituden von V_J^{AC} und V_M^{AC} bestimmt werden. Eine Auftragung des Quotienten der Amplituden gegen ω ergibt nach Gleichung 16 eine Gerade. Aus der Steigung kann die Leitfähigkeit g_J im Spalt bestimmt werden, da die spezifische Membrankapazität c_M bekannt ist.

2.1.3. Bestimmung der Kanalverteilung in der Zellmembran

Sowohl bei Gleichspannungsmessungen als auch bei Wechsellspannungsmessungen kann die Membrankapazität C_M mit dem *Patch Clamp*-Verstärker ermittelt werden. Mit der bekannten spezifischen Membrankapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, lässt sich daraus die Fläche A_M der gesamten Membran berechnen. Da g_J mit Wechsellspannungsmessungen ermittelt werden kann, kann der Skalierungsfaktor $1/(g_J A_M)$ berechnet werden. Aus Gleichspannungsmessungen ist der Quotient V_J/I_M bekannt. Wird dieser Quotient nach Gleichung 9 gegen den Skalierungsfaktor aufgetragen, so erhält man eine Gerade mit der Steigung g_{JM}/g_M . Dieses Verhältnis der Leitfähigkeiten von adhärirter Membran zu freier Membran spiegelt die Verteilung der Kanäle in beiden Membrandomänen wider. Bei einer Anreicherung der Kanäle in der adhärirten Membran, wie sie z.B. für einige GABA-Rezeptoren in MDCK-Zellen nachgewiesen wurde,⁹ muss $g_{JM}/g_M > 1$ gelten. Bei einer Verarmung von Kanälen in der Adhäsionszone gilt $g_{JM}/g_M < 1$.

2.1.4. Elektrodifffusion im Ein-Kompartiment-Modell

Bei konstanter Ionenkonzentration konnte der Spalt zwischen Zelle und Bad als Leitfähigkeit oder als Widerstand beschrieben werden, über den die Spaltspannung abfällt. Bei geöffneten Kanälen können sich durch den Ein- oder Ausfluss aus dem Spalt, die Konzentrationen der am Strom beteiligten Ionen im *Zell-Chip-Interface* ändern. Dies führt zu Konzentrationsunterschieden zwischen Spalt und Badelektrolyt, was wiederum zusammen mit der Spaltspannung das Auftreten von diffusiven Ausgleichströmen verursachen kann. In diesem Fall muss das Ein-Kompartiment-Modell um die Elektrodifffusion der beteiligten Ionen erweitert werden. Eine ausführliche Beschreibung der Elektrodifffusion im Ein-Kompartiment-Modell findet sich bei Brittinger und Fromherz. (2005).¹⁰ Hier werden kurz die wichtigsten Beziehungen dargestellt.

G_J für die beteiligten Ionen

G_J hängt nach Gleichung 3 vom spezifischen Elektrolytwiderstand ρ_J ab, der wie folgt berechnet wird:

$$\frac{1}{\rho_J} = \sum z_i e_0 c_i \mu_i .$$

Gleichung 17

Dabei ist μ die Beweglichkeit, z die Ladung und c Konzentration der Ionensorte i im Spaltelektrolyten. Für μ_i gilt nach der Einstein-Gleichung

$$\mu_i = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot D_i}{k_B T} ,$$

Gleichung 18

mit D als Diffusionskoeffizient. Die Spaltleitfähigkeit wird in eine Summe zerlegt, in deren Summanden jeweils nur eine Ionensorte i zur Leitfähigkeit beiträgt:

$$G_J = \sum_i G_J^i ,$$

Gleichung 19

Zusammenfassen von Gleichung 17, Gleichung 18 und Gleichung 3 liefert für die Anteile der Ionenspezies i an der gesamten Spaltleitfähigkeit:

$$G_J^i = \eta \cdot d_J \cdot \frac{z_i^2 e_0^2 c_J^i D_i}{k_B T} ,$$

Gleichung 20

Strombilanz

Auch für diffusive Ionenströme muss eine ausgeglichene Strombilanz gelten. Allerdings werden jetzt die zu- und abfließenden Ströme als Änderung der Ionenkonzentrationen dc_J/dt im Spaltvolumen d_JA_J ausgedrückt, und Gleichung 2 wird bei konstantem Membranpotential zu:¹⁰

$$(C_{JM} + C_{Ox}) \frac{dV_J}{dt} = A_J d_J \sum z_i e_0 \frac{dc_J^i}{dt} .$$

Gleichung 21

Die Änderung der Konzentration jeder Ionenspezies aus Gleichung 21 wird nun einzeln betrachtet und kann ausgedrückt werden als:

$$A_J d_J z_i e_0 \frac{dc_J^i}{dt} = -G_J^i (V_J - V_{J0}^i) + G_{JM}^i [(V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J0}^i)].$$

Gleichung 22

Dabei beschreibt V_{J0}^i das Umkehrpotential einer Ionensorte welches durch die Konzentrationsunterschiede zwischen Spalt und Badelektrolyt entsteht:

$$V_{J0}^i = -\frac{k_B T}{z_i e_0} \ln \frac{c_J^i}{c_E^i}.$$

Gleichung 23

Die Konzentrationen c_J und c_E sind die Ionenkonzentrationen im Spalt bzw. in der extrazellulären Badlösung. V_0^i in Gleichung 22 bezeichnet das Nernstpotential des Ions zwischen Zelle und Badelektrolyt. G_J^i wird aus Gleichung 20 berechnet. Somit beschreibt Gleichung 22 die Änderung der gesamten Konzentration einer Ionenspezies als Summe der zwischen Bad und Spalt (erster Term) und zwischen Spalt und Zelle fließenden Ionen (zweiter Term). G_{JM}^i ist die Leitfähigkeit der adhärenierten Membran für die einzelnen Ionen, d.h. der Strom der beteiligten Ionen durch die Kanäle in Abhängigkeit des Membranpotentials.

2.2. 5HT3A-Rezeptoren

In diesem Abschnitt wird kurz auf den in dieser Arbeit verwendeten 5HT3A-Rezeptor eingegangen, sowie auf ein bekanntes kinetisches Modell, das für die Auswertung einiger Messungen verwendet wurde. Eine ausführlichere Beschreibung der Rezeptoren und der ebenfalls verwendeten Kv1.3-Kanäle befindet sich im Anhang (Abschnitt A).

2.2.1. Die Familie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle

Der 5HT3A-Rezeptor gehört zur Familie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle, einer Untergruppe von Neurotransmitterrezeptoren. Zu dieser Familie gehören aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologien ebenfalls der nikotinische Acetylcholinrezeptor, der GABA_A-Rezeptor und der Glycin-Rezeptor. Die Kanäle bestehen aus fünf Untereinheiten.

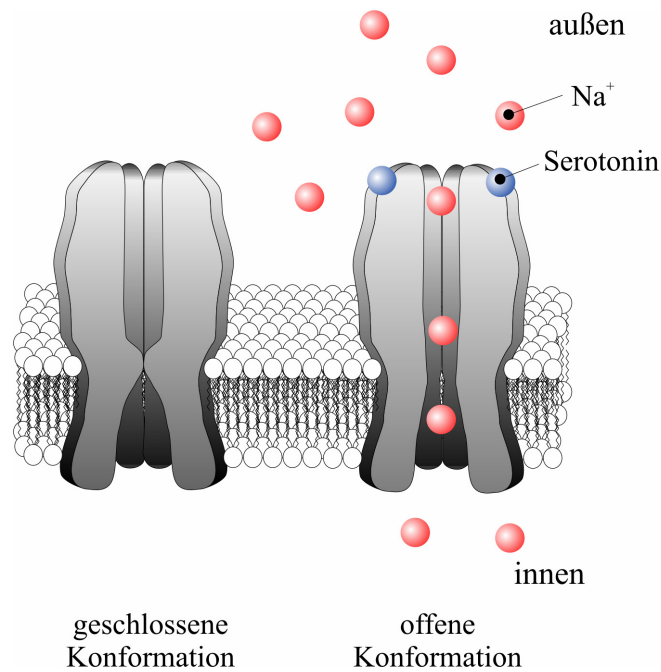


Abbildung 5: Schema des Serotonin-Rezeptors 5HT3A.

Der Kanal geht nach der Bindung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5HT) in den offenen Zustand über. Kationen können unspezifisch den offenen Kanal passieren, was unter physiologischen Bedingungen zu einem überwiegenden Einstrom von Na⁺-Ionen führt. Abbildung 5 zeigt ein Schema des Mechanismus der Ionenleitung durch den 5HT3A-Rezeptor.

2.2.2. Kinetisches Modell für den 5HT3A-Rezeptor

In diesem Abschnitt wird kurz das kinetische Modell des 5HT3A-Rezeptors von Mott et al. vorgestellt, welches für die Auswertung verwendet wurde.¹¹ Es ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

$$\frac{dp_1}{dt} = -\alpha p_1(t) + \beta_3 p_4(t)$$

$$\frac{dp_2}{dt} = -\alpha p_2(t) + \beta_4 p_5(t)$$

$$\frac{dp_3}{dt} = -\alpha p_3(t) + \beta_5 p_6(t)$$

$$\frac{dp_4}{dt} = -3k^- p_4(t) - \beta_3 p_4(t) - c(t) \cdot 2k^+ p_4(t) - kd_3 p_4(t) + c(t) \cdot 3k^+ p_{10}(t) + \alpha p_1(t) + 4k^- p_5(t) + kr p_7(t)$$

$$\frac{dp_5}{dt} = -4k^- p_5(t) - \beta_4 p_5(t) - c(t) \cdot k^+ p_5(t) - kd_4 p_5(t) + c(t) \cdot 2k^+ p_4(t) + \alpha p_2(t) + 5k^- p_6(t) + kr p_8(t)$$

$$\frac{dp_6}{dt} = -5k^- p_6(t) - \beta_5 p_6(t) - kd_5 p_6(t) + c(t) \cdot k^+ p_5(t) + \alpha p_3(t) + kr p_9(t)$$

$$\frac{dp_7}{dt} = -kr p_7(t) - c(t) \cdot 2k^+ p_7(t) + kd_3 p_4(t) + 4k^- p_8(t)$$

$$\frac{dp_8}{dt} = -kr p_8(t) - 4k^- p_8(t) - c(t) \cdot k^+ p_8(t) + kd_4 p_5(t) + c(t) \cdot 2k^+ p_7(t) + 5k^- p_9(t)$$

$$\frac{dp_9}{dt} = -kr p_9(t) - 5k^- p_9(t) + kd_5 p_6(t) + c(t) \cdot k^+ p_8(t)$$

$$\frac{dp_{10}}{dt} = -2k^- p_{10}(t) - c(t) \cdot 3k^+ p_{10}(t) + c(t) \cdot 4k^+ p_{11}(t) + 3k^- p_4(t)$$

$$\frac{dp_{11}}{dt} = -k^- p_{11}(t) - c(t) \cdot 4k^+ p_{11}(t) + c(t) \cdot 5k^+ p_{12}(t) + 2k^- p_{10}(t)$$

$$\frac{dp_{12}}{dt} = -c(t) \cdot 5k^+ p_{10}(t) + k^- p_{11}(t)$$

Gleichung 24

In Tabelle 1 sind die Ratenkonstanten für die Übergänge aufgelistet, wie sie von Mott et al. publiziert wurden und auch für ein Modell der Kopplung in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Ratenkonstanten für das Modell für den 5HT3A-Rezeptor nach Abbildung 6.

Konstante	Wert
k^+	$2,56 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k^-	$41,5 \text{ s}^{-1}$
β_3	2287 s^{-1}
β_4	1841 s^{-1}
β_5	1786 s^{-1}
kd_3	$33,2 \text{ s}^{-1}$
kd_4	311 s^{-1}
kd_5	$39,1 \text{ s}^{-1}$
α	40 s^{-1}
kr	$0,062 \text{ s}^{-1}$

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur, Transfektion und stabile Zelllinien

3.1.1. HEK293-Kultur

HEK293-Zellen (*human embryonic kidney*) sind ursprünglich fibroblastische, embryonale Nierenzellen, die nicht einschichtig wachsen, sondern bei zunehmender Konfluenz haufenförmig übereinander wachsen können. Sie werden oft als heterologes Expressionssystem benutzt. HEK-Zellen wurden erstmalig 1977 durch Transfektion mit einem Adenovirus hergestellt.¹

Die Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbeccos DMEM mit 10 % FCS (v/v) und 1 % L-Glutamin (v/v) verwendet. FCS und L-Glutamin wurden als Lösungen entsprechend den Herstellervorgaben angesetzt. Auf Antibiotika gegen Bakterien in den Medien wurde verzichtet. Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz 1:4 aufgeteilt und in neue Kulturschalen passagiert. Dabei konnten die Zellen durch Spülen mit Medium in Suspension gebracht werden.

3.1.2. Transfektion und Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Expression von Proteinen wurden die Zellen mit geeigneter Plasmid-DNA transfiziert. Dafür wurde das Kitsystem *Effectene Transfection Reagent* von Qiagen verwendet. Die eingesetzten Mengen der Reagenzien und der DNA entsprachen den Herstellervorgaben (500 ng DNA pro Transfektionsansatz für etwa 1-2·10⁶ Zellen, 70-80 % Konfluenz). Zur Erzeugung stabil exprimierender Zelllinien wurden HEK-Zellen mit Plasmid-DNA, welche eine Neomycin-Resistenz enthält, transfiziert. Neomycin-resistente Zellen sind auch in der Lage Geneticin abzubauen. 24 std nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium passagiert. Die Geneticin-Endkonzentration im Medium betrug 500 µg/ml. Nach zwei bis vier Wochen konnten stabil exprimierende Klone isoliert werden, die im Selektionsmedium weiter kultiviert wurden.

3.1.3. HEK-Kv1.3-Zellen

HEK-Zellen, die stabil mit dem Kaliumkanal Kv1.3 transfiziert waren, wurden bereits beschrieben.¹² Die Zellkultur dieser Zellen wurde wie in 3.1.1 durchgeführt. Im Nährmedium wurde eine Konzentration von 200 µg/ml Geneticin eingestellt.

3.2. Elektrophysiologie

3.2.1. *voltage clamp* und Stimulation der Zellen

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung des 5-HT_{3A}-Rezeptors in stabil transfizierten HEK293-Zellen sowie bei Chipmessungen und Kontrollexperimenten bei HEK-Kv1.3-Zellen wurde die *Patch Clamp*-Technik angewendet. Dabei wurde in der Ganzzell-Konfiguration (*whole cell*) unter *voltage clamp* gearbeitet: Pipetten mit 1-3 MΩ Pipettenwiderstand wurden mit einem Puller (DMZ- Universal Puller, Zeitz Instruments) aus Glasrohlingen gezogen. Die Pipette mit der Elektrode wurde auf die Zellen aufgesetzt. Bei Erreichen eines

hochohmigen Widerstandes (idealerweise im Bereich von einigen Gigaohm, *Gigaseal*) zwischen Pipette und Bad, wurde die Pipettenkapazität kompensiert, bevor an die Pipette Unterdruck angelegt wurde, um einen Durchbruch durch die Plasmamembran ins Innere der Zelle zu erreichen. Zugangswiderstand und Membrankapazität der Zelle wurden dann gemessen und kompensiert. Mit der Pipettenelektrode wurde ein (negatives) Haltepotential gegenüber der Badlösung an die Zelle angelegt. Die Badlösung wurde mit einer Ag/AgCl-Elektrode kontaktiert.

HEK-Zellen mit 5HT3A-Kanälen wurden mit verschiedenen Serotoninlösungen oder CPBG stimuliert (s. Abschnitt 3.2.5 für die Applikation). In einigen Experimenten wurden Messungen in Gegenwart von Tropicam durchgeföhrt. Die Liganden wurden in der entsprechenden Badlösung gelöst. Für die Strom-Spannungs-Charakterisierung von 5HT3A-Kanälen wurden Spannungsrampen bei offenen Kanälen mit dem *Patch Clamp*-Verstärker angelegt.

In einigen Kontrollexperimenten mit HEK-Kv1.3-Zellen wurden die Zellen im *voltage clamp*-Modus kontaktiert, und die Kv1.3-Kanäle wurden mit depolarisierenden Spannungssprüngen von 30 ms geöffnet.

3.2.2. Datenaufnahme

Während der Stimulation von Zellen im *voltage clamp* wurde der Membranstrom als Messsignal mit dem *Patch Clamp*-Verstärker aufgezeichnet.

Als Verstärker wurde ein Axopatch 200B von Axon Instruments verwendet, der Arbeitsplatz war außerdem mit einem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss) ausgerüstet. Je nach Zeitkonstante der erwarteten Signale wurden die Daten mit Tiefpassfiltern mit 1-5 kHz gefiltert und mit einer PC-Messkarte (M 6259, National Instruments) mit 20 kHz digitalisiert. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeföhrt. Das Programm zur Ansteuerung des *Patch Clamp*-Verstärkers und zur Datenaufnahme ist mit der grafischen Programmiersprache LabView (National Instruments) programmiert worden.

3.2.3. Lösungen für HEK-Zellen mit 5HT3A-Kanälen

Die Pipettenlösung für die *Patch Clamp*-Experimente und das *Transistorrecording* mit 5HT3A-Kanälen wurde wie folgt angesetzt:

CsCl	145 mM
Glucose	10 mM
EGTA	1 mM
HEPES	10 mM
pH-Wert 7,2 (mit CsOH)	

Die Badlösung für 5HT3A-Kanäle hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	135 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
pH-Wert 7,2 (mit KOH)	

3.2.4. Lösungen für Kv1.3- und doppelt transfizierte HEK-Zellen

Für Kontrollexperimente an HEK-Kv1.3-Zellen im *voltage clamp* wurde die folgende Pipettenlösung verwendet:

KCl	140 mM
EGTA	5 mM
HEPES	10 mM
pH-Wert	7,3 (mit KOH)

Die extrazelluläre Badlösung wurde für HEK-Kv1.3-Zellen wie folgt angesetzt:

KCl	5,4 mM
NaCl	135 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucose	10 mM
HEPES	5 mM
pH-Wert	7,3 (mit NaOH)

Diese Lösung wurde auch als Badlösung für Experimente mit doppelt transfizierten Zellen im *Transistorrecording* ohne *Patch-Pipette* verwendet.

3.2.5. Ligandenapplikation und Lösungswechsel

Während der Messungen wurde die Badlösung in der Messkammer mit einer Spritzenpumpe ständig ausgetauscht, um verwendete Liganden zu entfernen. Die Flussrate dafür betrug 1-2 ml/min.

Serotonin oder CPBG in der gewünschten Konzentration wurde innerhalb weniger Millisekunden appliziert, um den schnellen Signalanstieg messen zu können. Dazu wurde ein Piezoelement mit Mikromanipulator verwendet (LSS-300, Burleigh). An das Piezoelement wurde eine zweikanalige Pipette (sog. *Theta-Tube*) angebracht. In Abbildung 7A ist ein Foto der Vorrichtung dargestellt.

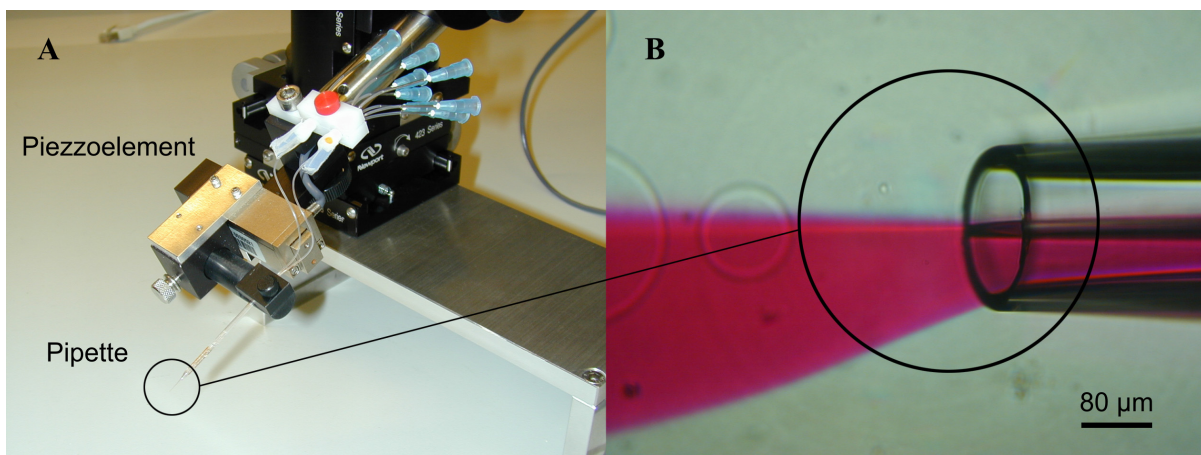


Abbildung 7: (A) Apparatur zum Lösungswechsel im Millisekundenbereich. Eine zweikanalige Pipette ist an einem Piezoelement befestigt. Verschiedene Lösungen können mit einer Ventilschaltung über ein Verteilerstück in die Kanäle der Pipette geleitet werden. (B) Mit gefärbter Badlösung in einem Kanal wurde der laminare Strom aus der Pipette dargestellt.

Ähnliche Apparaturen wurden bereits in anderen Publikationen zu ionotropen Rezeptoren beschrieben.^{11,13,14} Die Pipette wurde aus Glasrohlingen mit Trennwand (Hilgenberg, Außendurchmesser 2 mm, Innendurchmesser 1,4 mm, Trennwand 0,117 mm) hergestellt und zu einer Spitze mit 160-180 μm Durchmesser ausgezogen. Abbildung 7B zeigt eine vergrößerte Aufnahme der Pipettenspitze. Das Foto zeigt ebenfalls die laminare Strömung von gefärbter Badlösung im unteren Kanal, während im oberen Kanal ungefärbte Badlösung ausströmt. Durch den laminaren Strom sind beide Lösungen voneinander getrennt. Das Totvolumen zwischen Pipettenspitze und Verteilerstück betrug weniger als 10 μl pro Kanal. Mit einer Ventilsteuerung konnten verschiedene Lösungen aus Reservoirs über ein Verteilerstück in die Kanäle der Pipette geleitet werden. An die Reservoirs wurde mit einem Druckregler ein Überdruck angelegt, so dass die Flussrate für die Pipette etwa 5-6 ml/h je Kanal betrug.

Im Experiment wurde die Pipette so über der Zelle platziert, dass die Zelle mit normaler Badlösung aus dem ersten Kanal gespült wurde, während Serotoninlösung durch den zweiten Kanal parallel dazu neben die Zelle geleitet wurde. Zur Stimulation der Zelle wurde eine Spannung von 140 V an das Piezoelement angelegt. Die Ausdehnung des Piezokristalls von etwa 80-100 μm verursachte eine Bewegung des zweiten Kanals über die Zelle, so dass die Lösung um die Zelle innerhalb weniger Millisekunden gewechselt wurde.

Beim Wechsel zwischen verschiedenen Lösungen aus den Reservoirs, wurde eine Totzeit von etwa 20 s berücksichtigt, um einen vollständigen Austausch der Lösung in Pipette und Schläuchen zu gewährleisten.

3.3. Transistormessungen

3.3.1. Chips

In Abbildung 8 ist beispielhaft einer der in dieser Arbeit verwendeten Chips dargestellt.

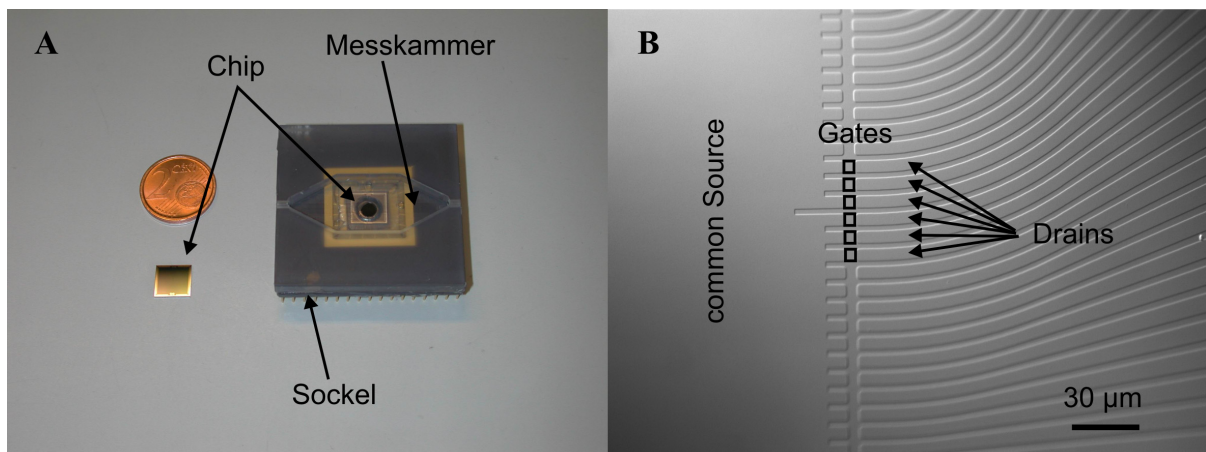


Abbildung 8: Fotos von Transistorchips wie sie für diese Arbeit verwendet wurden.¹⁵ (A) Chip nach der Prozessierung (links unten, Aluminiumkontakte sind am Rand sichtbar) und nach dem Zusammenbau von Sockel, Chip und Messkammer (rechts). (B) Vergrößerte Aufnahme eines Teils der beiden Transistorarrays, der gemeinsame *Source*-Bereich, einige *Gates* und *Drain*-Leitungen sind markiert.

Herstellung und erstmalige Anwendung der Chips sind bekannt und werden hier nicht weiter ausgeführt.¹⁵ Die Chips hatten die Abmessungen 9 x 9 mm. 128 Transistoren waren in zwei parallelen Reihen angeordnet, und die Abmessungen der Gates

betragen $6 \times 7 \mu\text{m}$. Abbildung 8B zeigt vergrößert einen Teil einer Transistorenreihe. Der gemeinsame *Source*-Bereich erstreckte sich über die ganze Länge des Arrays, einige *Gates* und *Drain*-Leitungen wurden markiert.

3.3.2. Sockel, Messkammer, Verstärker

Die Chips wurden mit einem geeigneten Wachs (Aquabond S-55) in Keramiksockeln fixiert, und die Kontakte auf dem Chip wurden mit Aluminiumdraht (Durchmesser $30 \mu\text{m}$) mit den entsprechenden Kontakten auf dem Sockel verbunden. Zur Aufnahme von Lösungen und Zellen wurden über den Chips Kulturkammern aus Plexiglas mit Silikonkleber (Elastosil E43, Wacker-Chemie GmbH) angebracht. Die Kammern verfügten über eine runde Öffnung (Durchmesser 5 mm) am Boden und wurden so über dem Chip positioniert, dass diese Öffnung die Transistoren des Chips unbedeckt ließ. In Abbildung 8A sind Chips nach der Herstellung (links unten) und nach dem Zusammenfügen von Sockel, Chip und Messkammer (rechts) dargestellt. Am Rand der Messkammer waren Öffnungen vorhanden, um den Lösungswechsel zu erleichtern. Die Form der Messkammer war für einen laminaren Durchfluss der Badlösung optimiert.

Bei Messungen wurden die Chipssignale mit einem Verstärker amplifiziert, mit dem auch die Potentiale für *Source*, *Drain* und *Gate* festgelegt wurden. Dieser Verstärker war ebenfalls ein Eigenbau, der schon beschrieben wurde, und weist ein sehr kleines Geräte-Rauschen auf.¹⁵ Auf den Verstärker soll hier nicht weiter eingegangen werden. Das Programm zur Ansteuerung des FET-Verstärkers und zur Datenaufnahme ist mit der grafischen Programmiersprache LabView (National Instruments) programmiert worden.

3.3.3. Arbeitspunkt für Chipmessungen

Vor jeder Gleich- oder Wechselspannungsmessung wurde der Arbeitspunkt, d.h. die Spannungen zwischen *Source* und *Drain* und zwischen *Gate* und *Source*, für die Transistoren unter den Zellen festgelegt. Dazu wurde für die jeweiligen Transistoren ein kleiner Bereich der Strom-Spannungskurve gemessen. Das *Gate*-Potential entsprach dabei dem Potential der Badlösung und wurde als Referenz auf null gesetzt. Die anderen Potentiale wurden anschließend entsprechend der Strom-Spannungskurve so eingestellt, dass ohne Spaltspannungen von Zellen über dem *Gate*-Bereich ein Strom von $10\text{-}20 \mu\text{A}$ durch den Transistor floss. Üblicherweise lagen die *Source-Drain*-Spannungen dabei zwischen 500 mV und $1,2 \text{ V}$, woraus sich Leitfähigkeiten der Transistoren von etwa $20 \mu\text{S}$ ergaben.

3.3.4. Zellkultur auf Siliziumchips

Für Transistormessungen wurden HEK293-Zellen auf den beschriebenen Siliziumchips kultiviert. Die Chips wurden zur Zellkultur wie folgt behandelt: Zuerst wurde mit Millipore-Wasser vorgespült, dann wurden die Chips vorsichtig mit konzentriertem Glasreiniger (Ultrax) gereinigt. Nach gründlichem Abspülen des Glasreinigers mit Millipore-Wasser wurden die Chips im Stickstoffstrom getrocknet. Anschliessend wurden die Chips für 30 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS) im Stickstoffstrom begast. Dabei wurden Methylgruppen an die Chipoberfläche adsorbiert, was zur Hydrophobisierung der Oberfläche führte. Die Chips wurden für 30 min unter UV-Licht sterilisiert und für 2 std. mit Fibronectinlösung der Konzentration $20\text{-}40 \mu\text{g/ml}$ bei 4°C inkubiert, um das Fibronectin auf der hydrophobisierten Oberfläche abzuscheiden.

HEK-Zellen wurden bei $80\text{-}90\%$ Konfluenz durch Spülen mit Nährmedium von der Kulturschale abgelöst und $1:40$ auf die Chips verteilt.

3.3.5. Messung von Zell-Chip-Kopplungen

Gleichspannungsmessungen

Wie bei den elektrophysiologischen Messungen wurden Zellen auf Transistoren im *whole cell*-Modus mit einer *Patch Clamp*-Pipette kontaktiert. Bildung eines *Gigaseals* und Kompensation von Kapazitäten und Zugangswiderstand wurde wie in Abschnitt 3.2.1 durchgeführt. Ein konstantes Haltepotential wurde eingestellt. Das Haltepotential der Zelle und die *Source-Drain*-Spannung im Transistor wurden gegen das Badpotential referenziert. Die Badlösung wurde mit einer Ag/AgCl-Elektrode kontaktiert. Die gleichen Pipetten und Lösungen wie bei den elektrophysiologischen Messungen wurden verwendet, ebenso die Methoden zur Applikation von Serotonin und zum Wechseln der Badlösung (Abschnitt 3.2.5). Serotonin-Lösungen zwischen 2,5 μM und 100 μM Konzentration (gelöst in Badlösung) wurden bei den gewünschten Membranpotentialen appliziert und die Spannungen über dem *Gate* wurden durch die Modulation des *Source-Drain*-Stromes im Transistor gemessen. Simultan zu den Transistorsignalen wurden die Membranströme mit dem *Patch Clamp*-Verstärker (Axopatch 200B, Axon Instruments) aufgezeichnet. Die Membranströme wurden wie in Abschnitt 3.2.1 gefiltert und digitalisiert. Die Transistorsignale wurden mit dem FET-Verstärker amplifiziert und mit einem 10 kHz-Tiefpassfilter gefiltert, bevor sie mit einer PC-Messkarte (M 6259, National Instruments) mit 20 kHz digitalisiert wurden. Ggf. wurden die Signale mit einem Software-Tiefpassfilter nachgefiltert. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Wechselspannungsmessungen

Wechselspannungsmessungen wurden vor oder nach Gleichspannungsmessungen an denselben Zellen durchgeführt. Die Kontaktierung mit der *Patch*-Pipette und die Kompensation von Kapazitäten und Zugangswiderstand entsprachen den Gleichspannungsmessungen bzw. der Elektrophysiologie (Abschnitt 0 bzw. 3.2.1). Ebenso wurde die im Transistor anliegende *Source-Drain*-Spannung und die Referenzierung gegen die Badlösung beim Übergang zwischen Gleich- und Wechselspannungsmessungen beibehalten. Serotonin wurde nicht appliziert, so dass bei geschlossenen Kanälen gemessen wurde. Die Zellen wurden mit dem *Patch Clamp*-Verstärker auf ein Haltepotential von -70 mV eingestellt. Dieses Haltepotential wurde mit sinusförmigen Wechselspannungen von Frequenzen zwischen $\omega = 3000\text{-}15000\text{ s}^{-1}$ und einer Amplitude von 10 mV moduliert. Dafür wurden entsprechende Signale mit dem Messprogramm generiert und über die Messkarte (M 6259, National Instruments) an den *Patch Clamp*-Verstärker geleitet, der über die ausreichende Bandbreite von 100 kHz verfügte.

Die Spaltspannung unter Wechselspannungsanregung von Zellen über Transistoren wurde gemessen und mit dem FET-Verstärker amplifiziert. Die Signale wurden mit einem Tiefpassfilter mit 10 kHz gefiltert und mit 20 kHz digitalisiert.

Kopplungen ohne *voltage clamp*

Messungen ohne *voltage clamp* wurden wie in Abschnitt 0 aber ohne die simultane Messung des Membranstroms durchgeführt.

3.4. Datenverarbeitung und Software

Mess- und Auswertesoftware wurden mit der grafischen Programmiersprache LabView (National Instruments) selbst programmiert. Des Weiteren wurden verwendet: Photoshop (Adobe; Bildbearbeitung), Origin (OriginLab; Auswertung, Darstellung), Excel (Microsoft; Tabellen, Auswertung), CorelDraw (Corel; Darstellung), Word (Microsoft; Text), Acrobat (Adobe, Text), Mathematica (Wolfram Research; Simulationen), Omega (Oxford Molecular; Molekularbiologie).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Elektrophysiologie

Der Serotonin-Rezeptor 5HT3A wurde in HEK293-Zellen durch elektrophysiologische Messungen in der Plasmamembran nachgewiesen und charakterisiert. Die Zellen wurden dabei mit einer Elektrode im *whole cell*-Modus der *Patch Clamp*-Technik kontaktiert, und das gewünschte Membranpotential in der Zelle wurde eingestellt. Serotonin-Lösungen wurden appliziert, und der resultierende Membranstrom wurde mit dem *Patch Clamp*-Verstärker aufgezeichnet. Messungen aus diesem Abschnitt dienen dann als Referenz für die Zell-Chip-Kopplung.

4.1.1. Funktionelle Expression, Desensitivierung und Liganden

Zum Nachweis, dass mit dem Vektor pcDNA3.1/h5HT3A transfizierte HEK-Zellen den gewünschten 5HT3A-Rezeptor auch funktionell in der Plasmamembran exprimieren, wurden einige typische Kanaleigenschaften mittels *Patch Clamp*-Technik gemessen (s. Anhang B zur Herstellung des Vektors). Sowohl die Desensitivierung der Kanäle als allgemeine Eigenschaft von liganden-gesteuerten Kanälen als auch die Wirkung von zwei für 5HT3A spezifischen Liganden wurden getestet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK-Zellen verwendet.

Desensitivierung

Bei konstantem Membranpotential (-70 mV) wurden Serotoninlösungen von 100 μ M Konzentration appliziert. Untransfizierte HEK-Zellen zeigten keine Reaktion auf die Stimulation (nicht gezeigt). Abbildung 9A zeigt eine Beispielmessung des resultierenden Membranstroms bei transfizierten Zellen. Der Balken über der Messung zeigt die Dauer der Applikation an. In dem Beispiel wurde ein schnell aktivierender negativer Strom mit einer Amplitude von etwa -2,75 nA gemessen. Nach Erreichen des maximalen Stroms zerfiel das Signal während anhaltender Serotoninapplikation, ging aber im beobachteten Zeitraum nicht ganz auf null zurück. Die Eigenschaft der Kanäle, während fortgesetzter Ligandenapplikation zu schließen wird als Desensitivierung bezeichnet und ist eine typische Eigenschaft von liganden-gesteuerten Ionenkanälen. Die Kanäle gehen dabei in eine geschlossene Konformation mit gebundenen Liganden über (s. kinetisches Modell, Abschnitt 2.2.2). Die

Dauer des Experiments von fünf Sekunden war allerdings zu kurz, um den vollständigen Zerfall des Signals beobachten zu können.

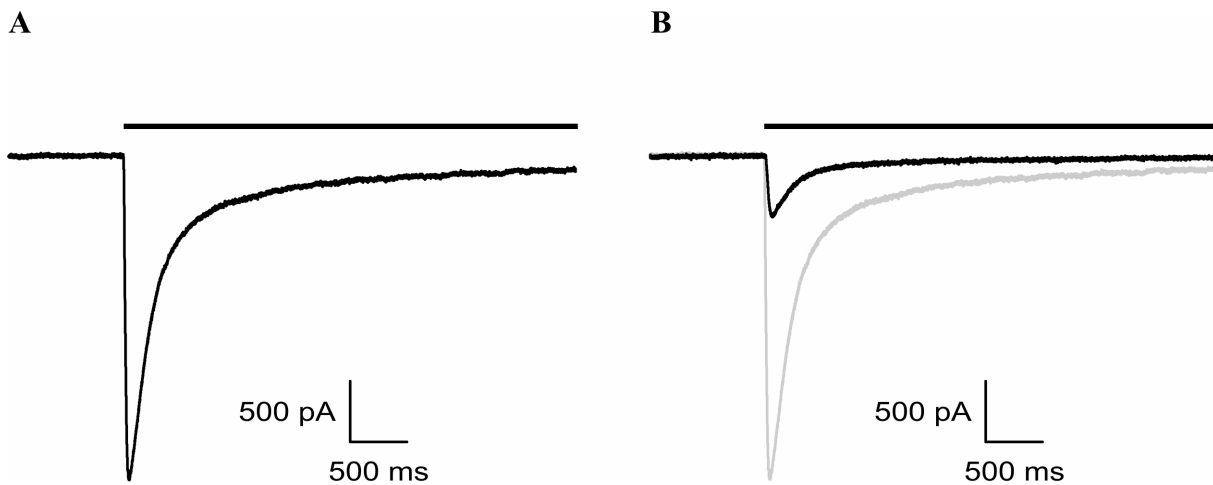


Abbildung 9: (A) Stromantwort einer Zelle nach Applikation von 100 µM Serotonin (schwarzer Balken) bei einem Membranpotential von -70 mV. (B) Stromantwort derselben Zelle, aufgenommen fünf Sekunden nach der Messung in (A).

In Abbildung 9B ist eine zweite Messung an derselben Zelle dargestellt, die fünf Sekunden nach der ersten Messung aus Abbildung 9A durchgeführt wurde. Die Amplitude erreichte dabei mit etwa 500 pA etwas weniger als 20 % der Amplitude aus der ersten Messung. Abbildung 10A und Abbildung 10B zeigen Messungen an einer weiteren Zelle, hier wurde ein Intervall von 20 Sekunden eingehalten. Die Amplitude nach 20 Sekunden erreichte ca. 40 % der Amplitude der ersten Messung (-1,5 nA in Abbildung 10A gegenüber 600 pA in Abbildung 10B).

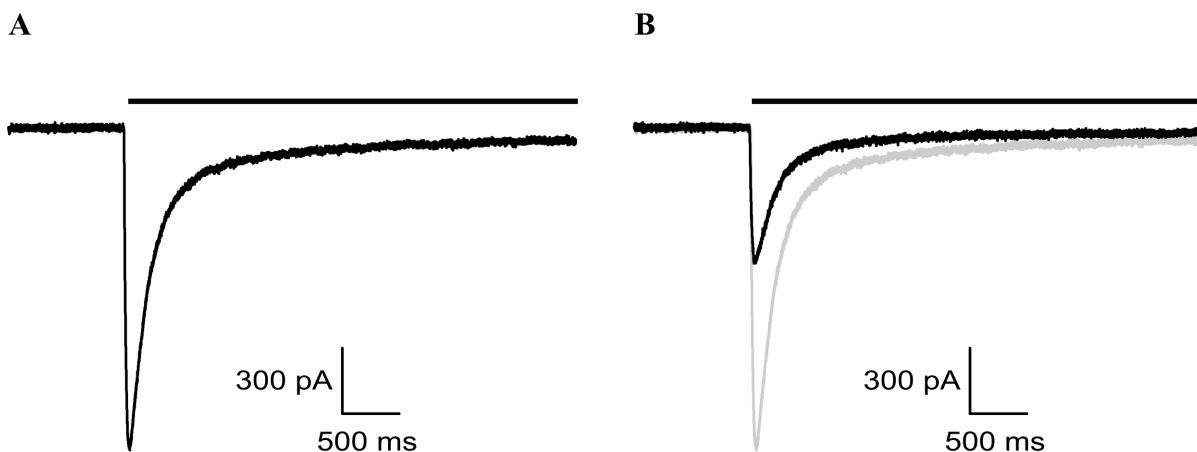


Abbildung 10: (A) Stromantwort einer weiteren Zelle. (B) Stromantwort 20 Sekunden nach der Messung aus (A).

Die Messungen zeigten, dass 20 Sekunden nach der ersten Applikation eine höhere Anzahl Kanäle bereits wieder aktivierbar war als fünf Sekunden nach der ersten Messung. Auch das Auftreten einer solchen Periode, in der die Kanäle durch Applikation von Liganden nicht wieder voll aktiviert werden konnten, ist typisch für liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Die Zeitkonstante der Kanäle bis zur vollen Aktivierbarkeit nach einer vorangegangenen Stimulation ist für den 5HT3A-Rezeptor bekannt und liegt bei 45 Sekunden.^{11,16} In allen weiteren Experimenten, in denen mehrere Messungen an derselben Zelle durchgeführt wurden, wurde daher zur Gewährleistung der vollen Regeneration der Kanäle eine Zeitspanne von zwei Minuten zwischen den Stimulationen eingehalten.

Antagonist: Tropisetron

Für den 5HT3A-Rezeptor sind mehrere spezifische Antagonisten bekannt, die den Strom durch diesen Rezeptor bereits in geringen Konzentrationen blockieren.¹⁷⁻²⁰ An transfizierten HEK-Zellen wurde die Wirkung des Antagonisten Tropisetron getestet, der mit einer Konzentration von 1 μM z.B. bei Lankiewicz et al. (1998) Membranströme durch den 5HT3A-Rezeptor blockiert hat.²⁰ Abbildung 11A zeigt eine Beispielmessung des Membranstromes während der Applikation von 100 μM Serotonin mit der bekannten Signalform.

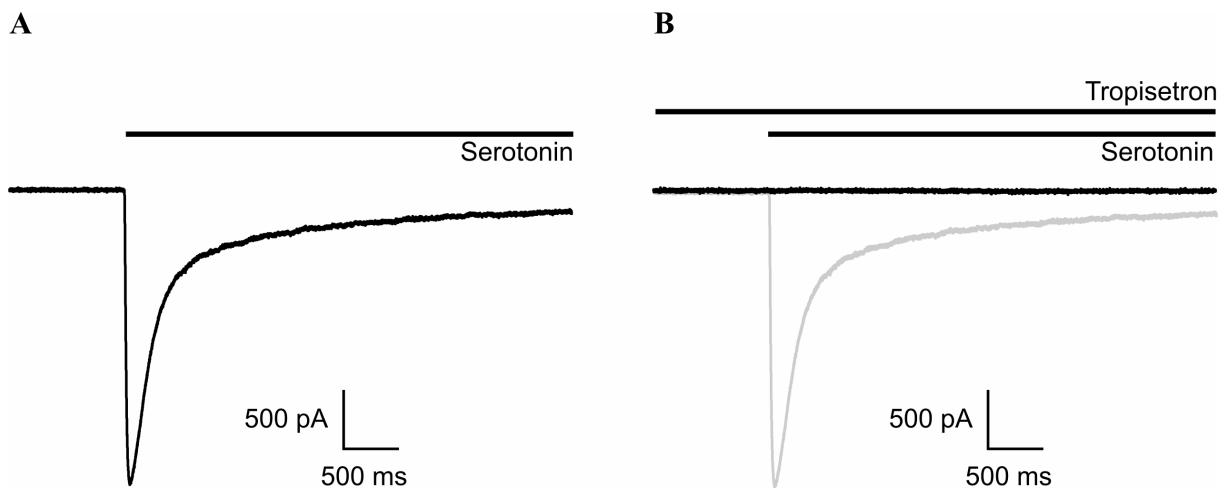


Abbildung 11: (A) Beispielmessung einer Zelle bei Applikation von 100 μM Serotonin (schwarzer Balken). (B) Messung an derselben Zelle in Gegenwart von 1 μM Tropisetron, das Stromsignal aus (A) wurde blockiert (oberer Balken: Tropisetron-Applikation, unterer Balken: Serotonin-Applikation).

In Abbildung 11B ist eine Messung an derselben Zelle in Gegenwart von 1 μM Tropisetron dargestellt (oberer Balken). Serotonin wurde analog zu Abbildung 11A appliziert (unterer Balken). Ein Membranstrom konnte nicht mehr gemessen werden.

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass der Membranstrom in Gegenwart des 5HT3A-spezifischen Antagonisten Tropicsetron ($1 \mu\text{M}$) blockiert werden konnte.

Agonist: CPBG

Neben Serotonin sind für den 5HT3A-Rezeptor weitere Agonisten bekannt. CPBG (Chlorophenylbiguanid) wurde bereits in anderen Arbeiten verwendet, um den Membranstrom durch den 5HT3A-Rezeptor zu aktivieren.^{20,21} Abbildung 12 zeigt zwei Messungen, die an derselben Zelle durchgeführt wurden. Abbildung 12A zeigt den Membranstrom nach Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ Serotonin, in der Messung aus Abbildung 12B wurde mit $100 \mu\text{M}$ CPBG stimuliert. Die Abbildung zeigt, dass Membranströme mit CPBG aktiviert werden konnten. Während der Applikation von CPBG konnten Ströme gemessen werden, die annähernd dieselben Amplituden wie bei Serotonin-Applikation erreichten.

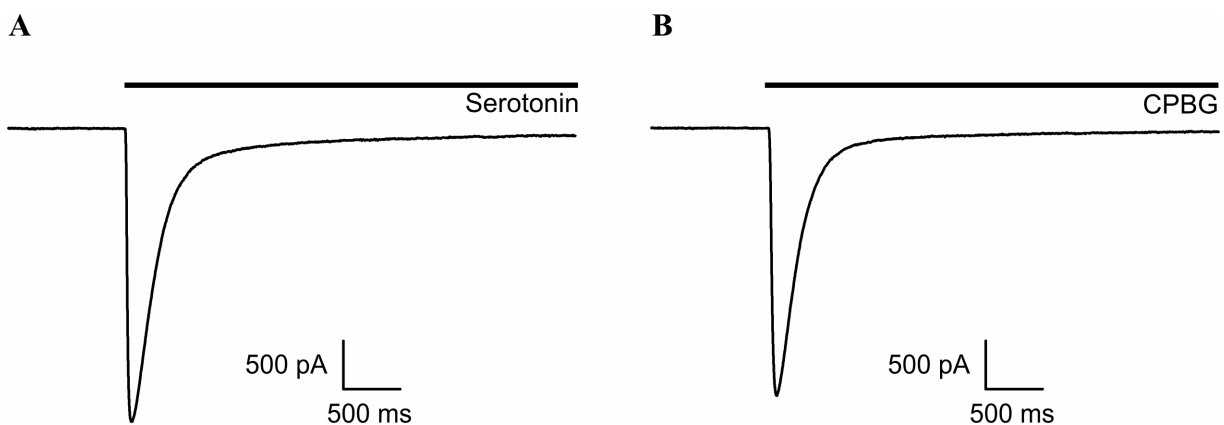


Abbildung 12: (A) Membranstrom während der Stimulation einer HEK-Zelle mit $100 \mu\text{M}$ Serotonin. (B) Membranstrom derselben Zelle nach Stimulation mit dem 5HT3A-Agonist CPBG.

Zusammenfassung

Die in diesem Abschnitt gezeigten Experimente dienten dem Nachweis von funktionellen 5HT3A-Kanälen in der Plasmamembran von HEK-Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3.1/h5HT3A transfiziert waren:

Membranströme wurden bei transfizierten Zellen durch die Agonisten Serotonin und CPBG aktiviert und durch den 5HT3A-spezifischen Antagonisten Tropicsetron blockiert. Zellen, die nicht transfiziert waren reagierten nicht auf die Applikation von Serotonin. Außerdem wurde in diesem Abschnitt die Desensitivierung der Kanäle demonstriert

4.1.2. Strom-Konzentrationsabhängigkeit - Die Hill-Kurve

Um die Abhängigkeit der Membranströme von der eingesetzten Serotonin-Konzentration zu messen, wurden verschiedene Serotonin-Lösungen bei einem konstanten Membranpotential von -70 mV appliziert. Eingesetzt wurden Lösungen mit den Konzentrationen 100 , 10 , 5 , $2,5$ und 1 μM . In Abbildung 13A ist eine Beispielmessung der Membranströme I_M über 5 Sekunden mit den Konzentrationen 1 μM und $2,5$ μM an einer Zelle dargestellt. Außerdem ist der Membranstrom bei 100 μM Serotonin aufgetragen. Abbildung 13B zeigt eine Messung an einer weiteren Zelle mit den Konzentrationen 5 , 10 und 100 μM Serotonin.

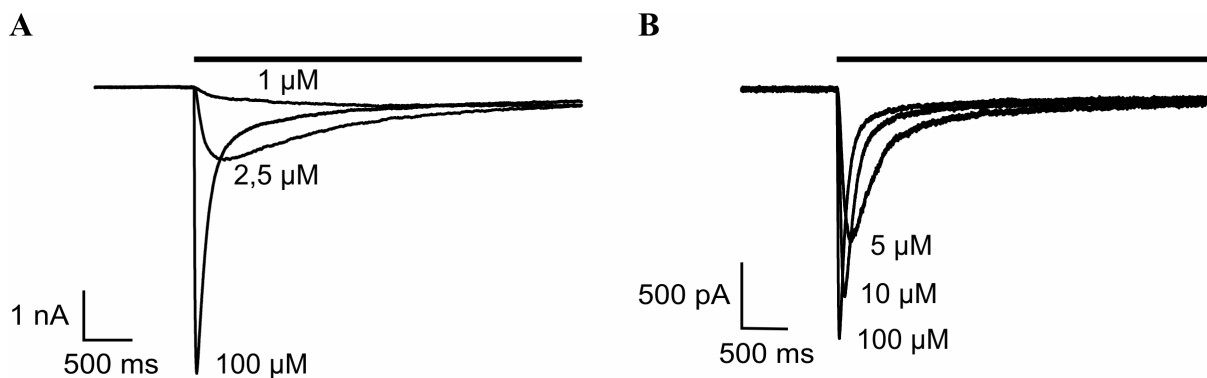


Abbildung 13: Konzentrationsabhängigkeit der Membranströme von zwei verschiedenen Zellen. (A) Messungen für die Konzentrationen 1 μM und $2,5$ μM und die Referenzmessung bei 100 μM . (B) Messungen für den Konzentrationsbereich von 5 - 100 μM .

Aus Abbildung 13 geht hervor, dass Aktivierung und Desensitivierung bei geringeren Konzentrationen verlangsamt wurden, ebenso wurden die Stromamplituden kleiner. Bei kleinen Konzentrationen setzte die Desensitivierung so langsam ein, dass der Strom nahezu konstant blieb und über einen großen Zeitraum von über 10 Sekunden gemessen werden konnte. Höhere Konzentrationen (5 - 100 μM) verursachten eine schnellere Desensitivierung, so dass hier die Ströme innerhalb von 10 Sekunden fast auf null zurückgingen.

Die Membranströme von verschiedenen Zellen hatten bei gleichen Konzentrationen unterschiedliche Amplituden im Bereich von einigen Nanoampere. Um Messungen an verschiedenen Zellen trotzdem zusammen auswerten zu können, wurde bei jeder Zelle neben anderen Konzentrationen eine Referenzmessung bei 100 μM Serotonin durchgeführt. Aus den gemessenen Strömen einer Zelle bei verschiedenen Konzentrationen wurden die Amplituden bestimmt und auf die Amplitude bei 100 μM normiert. Die normierten Ströme wurden gegen die logarithmisch skalierte Konzentration aufgetragen (s. Abbildung 14). Für jede Konzentration wurden zehn bis zwanzig Messungen an unterschiedlichen Zellen ausgewertet,

die Punkte in Abbildung 14 entsprechen den Mittelwerten, die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken eingezeichnet.

An die Messpunkte wurde nach der Hill-Gleichung

$$\frac{I_M}{I_{M,\max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n}$$

Gleichung 25

eine Kurve gefittet, die in Abbildung 14 rot eingezeichnet ist. Aus der Kurve wurden die Parameter $n = 1,8$ und $EC_{50} = 4,2 \mu\text{M}$ bestimmt. Der EC_{50} -Wert ist die Konzentration bei halbmaximaler Kurvenhöhe. Der Hill-Koeffizient n bestimmt die Steilheit der Kurve und ist ein Maß für die Kooperativität der Bindung. Er gibt an, wie viele Bindungsstellen mindestens besetzt sein müssen, um eine Öffnung des Kanals zu bewirken. Ein Wert von 1,8 bedeutet, dass mindestens zwei Moleküle Serotonin binden müssen, damit der Kanal in den offenen Zustand übergeht.

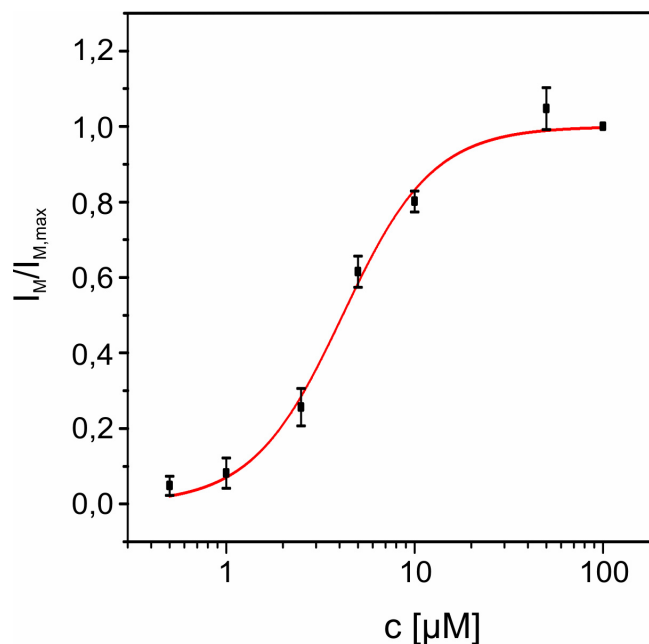


Abbildung 14: Hill-Plot für die Beziehung zwischen Strom und Konzentration. Aufgetragen sind die auf $100 \mu\text{M}$ Serotonin normierten Stromamplituden gegen die Konzentration. Rot eingezeichnet ist die gefittete Hill-Kurve mit den Parametern $n = 1,8$ und $EC_{50} = 4,2 \mu\text{M}$. Mindestens 10 Strommessungen wurden für jede Konzentration ausgewertet, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

4.1.3. Strom-Spannungsabhängigkeit - Das Umkehrpotential

Zur Charakterisierung der Abhängigkeit des Membranstromes vom angelegten intrazellulären Haltepotential wurde bei verschiedenen Zellen zunächst ein Haltepotential von -120 mV mit

der *Patch*-Elektrode eingestellt. Anschließend wurde eine Serotonin-Lösung der Konzentration $2,5 \mu\text{M}$ appliziert. Wie in Abschnitt 4.1.2 erwähnt, stellte sich bei dieser Konzentration nach einigen Sekunden ein Strom über die Zellmembran ein, der über längere Zeit nahezu konstant blieb, bzw. nur geringfügig abfiel. In dieser Phase wurde eine rampenförmige Spannung (200 mV Amplitude) der Steigung 1 mV/ms angelegt und der resultierende Strom gemessen. Abbildung 15A zeigt den zeitlichen Verlauf des angelegten Haltepotentials einer Messung, in Abbildung 15B ist der resultierende Membranstrom bei $2,5 \mu\text{M}$ Serotonin dargestellt.

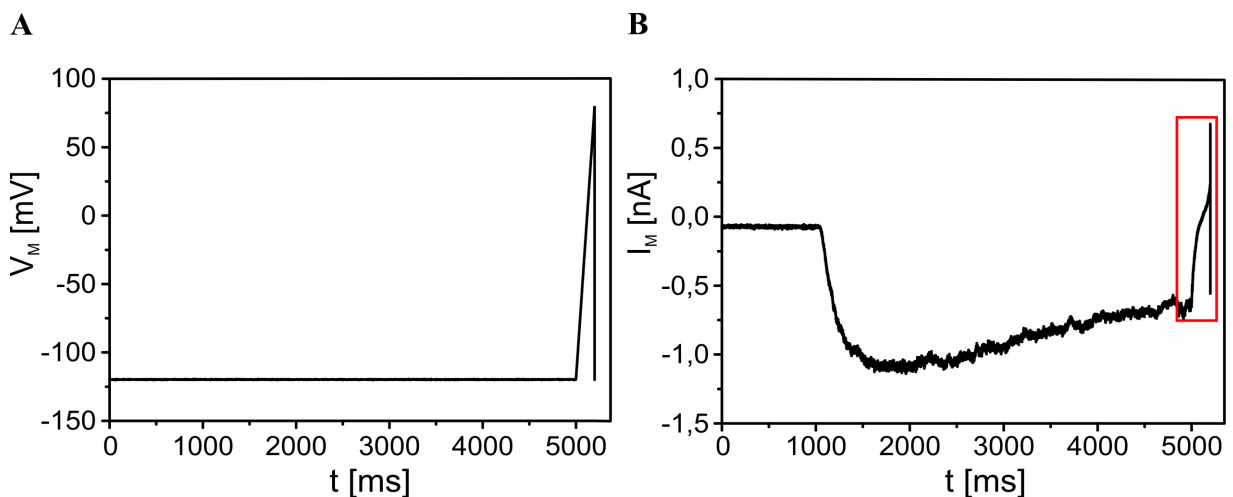


Abbildung 15: (A) Zeitlicher Verlauf des angelegten Haltepotentials. Die Zelle wurde auf -120 mV gehalten, nach 5 Sekunden wurde ein rampenförmiger Spannungspuls von 200 mV und 1 mV/ms Steigung an die Zelle angelegt. (B) Messung des Membranstromes, nachdem die Kanäle bei $t = 1000 \text{ ms}$ mit $2,5 \mu\text{M}$ Serotonin geöffnet wurden und die Spannungsrampe bei $t = 5000 \text{ ms}$ angelegt wurde.

In Abbildung 15B ist zu erkennen wie der Membranstrom während der 200 ms der Spannungsrampe steigt und nach kurzer Zeit den positiven Bereich erreicht. Abbildung 16A zeigt den Verlauf des Membranstromes während der 200 ms , in denen die Spannungsrampe angelegt wurde. Die Kurve verläuft zu Beginn und am Ende nicht linear, da die Einzelkanalleitfähigkeit von $5\text{HT}_3\text{A}$ -Kanälen vom Membranpotential abhängt. Im Bereich des Nulldurchgangs ist allerdings ein linearer Abschnitt zu erkennen.

Das Umkehrpotential V_0 ist das Membranpotential, bei dem trotz offener Kanäle kein Strom fließt, d.h. das Potential am Nulldurchgang des Membranstromes. Hier liegt keine Triebkraft für einen Ein- oder Ausstrom mehr vor. Um V_0 zu bestimmen wurde für die Beispielmessung in Abbildung 16B der Membranstrom gegen das Haltepotential zwischen -120 mV und 20 mV aufgetragen (Strom-Spannungskurve). V_0 wurde im linearen Bereich der Stromkurve

um den Nulldurchgang herum durch lineare Regression bestimmt und betrug $-3,8 \text{ mV} \pm 1,6$ (Mittelwert aus zehn Messungen mit Standardabweichung).

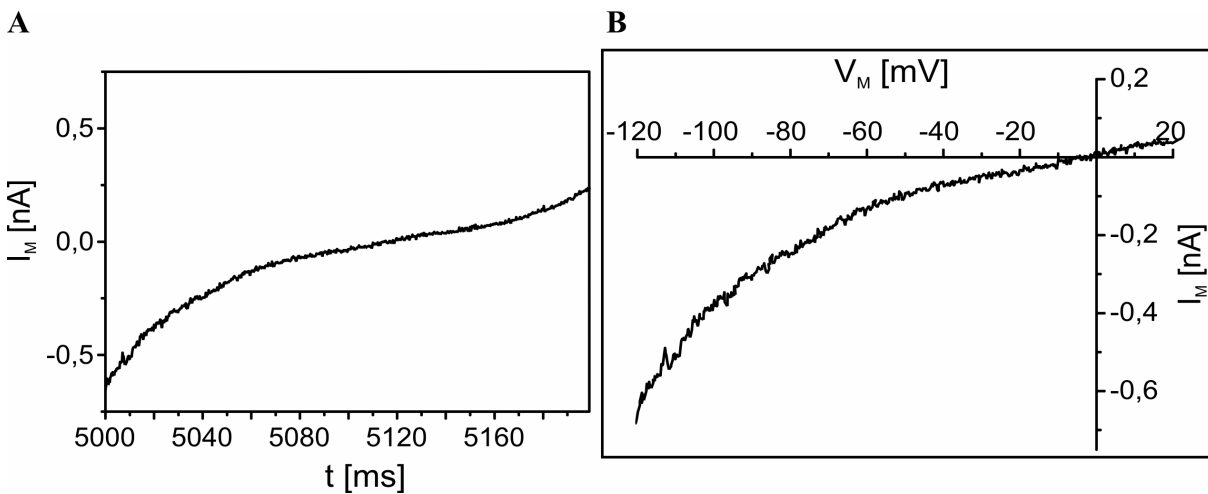


Abbildung 16: (A) Membranstrom bei einer angelegten Spannungsrampe von 200 mV mit 1 mV/ms ab $t = 5000$ ms. (B) Strom-Spannungskurve aus der Messung in (A) zwischen -120 und 20 mV . Das Umkehrpotential wurde durch lineare Regression im Bereich des Nulldurchgangs bestimmt und betrug als Mittelwert $-3,8 \text{ mV} \pm 1,6 \text{ mV}$.

4.1.4. Zeitkonstanten

Zur Bestimmung von Aktivierung und Desensitivierung der Kanäle wurden Zellen auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt. Serotonin-Lösungen wurden appliziert und die resultierenden Membranströme wurden gemessen. Die schnellste Aktivierung sowie die schnellste Desensitivierung der Kanäle wurden bei Serotonin-Lösungen von wenigstens $100 \mu\text{M}$ beobachtet. Höhere Konzentrationen beschleunigten Aktivierung und Desensitivierung nicht mehr, Serotonin-Lösungen unter $100 \mu\text{M}$ Konzentration resultierten in Stromantworten mit längeren Zeiten für Anstieg und Abfall des Signals (s. auch Abschnitt 4.1.2). Der zeitliche Verlauf der Desensitivierung bei $100 \mu\text{M}$ Serotonin wurde mit einer doppelten Exponentialfunktion der Form

$$I_M(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

Gleichung 26

gefittet, mit A als Amplituden der Exponentialterme und τ als Zeitkonstanten. In Abbildung 17 ist eine Beispielmessung mit dem Fit der Desensitivierung dargestellt. Die meisten Messungen konnten mit einer relativ schnellen ersten und einer langsameren zweiten Zeitkonstante gefittet werden. Insgesamt wurden Zeitkonstanten von zwölf dieser Messungen

ermittelt, die Mittelwerte mit Standardabweichung betragen für $\tau_1 = 182 \text{ ms} \pm 25 \text{ ms}$ und für $\tau_2 = 3194 \text{ ms} \pm 1018 \text{ ms}$.

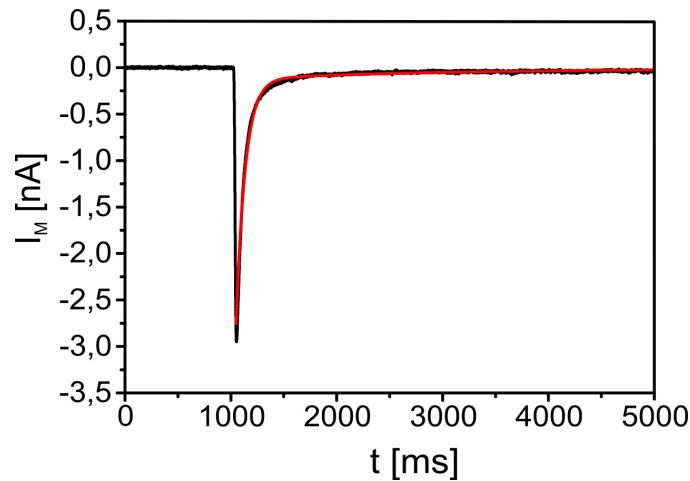


Abbildung 17: Messung des Membranstromes bei Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ Serotonin. Die Desensitivierung wurde mit einer doppelten Exponentialfunktion gefittet, die Zeitkonstanten betragen 182 ms und 3194 ms .

Für die Aktivierung des Signals wurden keine Zeitkonstanten ermittelt, sondern die Zeit zwischen Signalbeginn und maximaler Signalthöhe wurde bestimmt. Diese Anstiegszeit betrug als Mittelwert $32 \text{ ms} \pm 6 \text{ ms}$. Für die Zeit zwischen 10% und 90% der maximalen Signalthöhe wurden $18 \text{ ms} \pm 3 \text{ ms}$ ermittelt. Aus diesem Wert konnte die Zeitkonstante τ_{on} für den Signalanstieg berechnet werden. Mit $t_{10-90\%} \approx 2,2\tau$ folgte eine Zeitkonstante von $\tau_{\text{on}} = 8,2 \text{ ms} \pm 1,4 \text{ ms}$.

4.1.5. Vergleich mit Literaturwerten

In diesem Abschnitt werden die gemessenen elektrophysiologischen Parameter aus Abschnitt 4.1 mit bekannten Werten aus der Literatur verglichen. Dies dient der Abschätzung der Genauigkeit und Zuverlässigkeit der angewandten Methoden zur Charakterisierung der 5HT3A-Rezeptors.

Für den Serotonin-Rezeptor 5HT3A sind viele Messungen elektrophysiologischer Parameter publiziert worden, die oft unter uneinheitlichen Bedingungen durchgeführt wurden. In den publizierten Werten existiert daher eine Schwankungsbreite für die einzelnen Parameter. Zunächst werden der Hill-Koeffizient, der EC50-Wert und das Umkehrpotential mit Werten aus früheren Publikationen verglichen, bevor auf die Zeitkonstanten der Aktivierung und Desensitivierung eingegangen wird. Im letzten Abschnitt folgt eine Zusammenfassung mit einer tabellarischen Auflistung der Literaturwerte.

Hill-Koeffizient, EC50, Umkehrpotential

Für den Hill-Koeffizient wurden Literaturwerte zwischen 1,5 (Barann et al.)¹⁶ und 3 (Mott et al.)¹¹ für den humanen Rezeptor gefunden. Auch bei anderen Spezies wurden unabhängig voneinander variierende Werte gemessen. So liegt der Hill-Koeffizient von Maus-Rezeptoren zwischen 1,6 (Barann et al.)¹⁶ und 2,7 (Hussy et al.)²². Der in dieser Arbeit gemessene Wert von 1,8 für den humanen Rezeptor ist daher realistisch und entspricht außerdem der Messung von Brown et al. 1998.¹⁷

Die Literaturwerte für den EC50-Wert unterliegen bei humanen Rezeptoren ebenfalls einer starken Schwankung und reichen von 2 μM (Mott et al.)¹¹ bis 8,6 μM (Barann et al.)¹⁶. Der in dieser Arbeit gemessene Wert beträgt 4,2 μM und liegt damit zwischen den Messungen von Brown et al. (3,4 μM)¹⁷ und Bruss et al. (5,4 μM)²³ für den humanen Rezeptor. Bei Maus-Rezeptoren wurde eine derartige Schwankung in der Literatur nicht gefunden.

Das hier bestimmte Umkehrpotential von -3,8 mV liegt ebenfalls im Bereich der bekannten Werte (-2,2 mV bis -5,5 mV).^{16,17} Lankiewicz et al. publizierten 1998 einen Wert von -4,9 mV,²⁰ der am Dichtesten am Umkehrpotential in dieser Arbeit liegt.

Aktivierung

Zeitkonstanten für den Signalverlauf wurden in mehreren Publikationen gefunden. Die Zeitkonstante für die Aktivierung wurde in dieser Arbeit mit $\tau_{\text{on}} = 8$ ms bestimmt. Mott et al. veröffentlichten 2001 Werte von 7 bzw. 9 ms (*excised outside-out*- bzw. *whole cell*-Modus)¹¹, mit denen die hier gemessene Zeitkonstante gut übereinstimmt. Der Vergleich mit anderen Literaturwerten wird durch die Konzentrationsabhängigkeit von Aktivierung und Desensitivierung erschwert. In anderen Arbeiten wurden bei den Messungen geringere Serotonin-Konzentrationen als 100 μM verwendet, womit sich für die Zeitkonstanten langsamere Werte ergaben. So liegt die Zeitkonstante für die Aktivierung bei 30 μM Serotonin z.B. bei 16-17 ms (Barann et al., Bruss et al.)^{16,23} Auffällig ist demgegenüber der Wert von Eisensamer et al. von 12 ms bei 10 μM Serotonin.²⁴ Die Öffnung der Kanäle scheint hier bei 10 μM Serotonin schneller zu sein als bei Barann et al. und Bruss et al. bei höherer Serotonin-Konzentration.

Desensitivierung

Die Desensitivierung der Kanäle wurde in einigen Publikationen mit einem monoexponentiellen Zerfall des Signals ausgewertet.^{16,23,24} In anderen Publikationen (Lankiewicz et al., Mott et al.)^{11,20} und auch in dieser Arbeit waren zur Beschreibung der

Desensitivierung mindestens zwei Zeitkonstanten nötig. Lankiewicz et al. haben die Zeitkonstanten bei einer Konzentration von 10 μM Serotonin gemessen, so dass die ermittelten Werte ($\tau_1 = 280 \text{ ms}$, $\tau_2 = 2313$) nicht mit dieser Arbeit verglichen werden können. Die Zeitkonstante τ_1 aus dieser Arbeit ist mit 180 ms kleiner als der publizierte Wert von Mott et al. (527 ms), der mit 100 μM Serotonin bestimmt wurde. Mott et al. weisen allerdings darauf hin, dass die Desensitivierung bei kleineren Ca^{2+} -Konzentrationen im extrazellulären Medium verlangsamt wird. Die bei Mott et al. verwendete Ca^{2+} -Konzentration betrug 0,25 mM, in dieser Arbeit wurden 1,8 mM Ca^{2+} eingesetzt. Eine Untersuchung der Abhängigkeit der Zeitkonstante von der Ca^{2+} -Konzentration im Medium wurde von Lambert et al. bereits 1988 durchgeführt und ist seitdem bekannt.²⁵ Gerade in dem Konzentrationsbereich von 0,3 mM bis 3 mM wirkt sich Ca^{2+} erheblich auf die Desensitivierung aus. Die langsamere Zeitkonstante τ_1 bei Mott et al. lässt sich daher mit einem Unterschied in der Ca^{2+} -Konzentration erklären. τ_2 aus dieser Arbeit entspricht mit 3194 ms und der Standardabweichung hingegen dem Wert bei Mott et al. (2747 ms). Außerdem ist bei Mott et al. darauf zu achten, dass derselbe Kanal sowohl im *whole cell*- als auch im *excised outside-out*-Modus gemessen wurde. In letzterem Experiment sind die Zeitkonstanten mit $\tau_1 = 176 \text{ ms}$ und $\tau_2 = 1006 \text{ ms}$ wesentlich kleiner als im *whole cell*-Modus (527 ms bzw. 2747ms).

Bei Publikationen, in denen die Desensitivierung monoexponentiell ausgewertet werden konnte, wurden Zeitkonstanten von 150 ms und 160 ms gemessen.^{16,23} Hierbei handelte es sich wieder um Messungen in der *excised outside-out*-Konfiguration, und eine Serotonin-Konzentration von 30 μM wurde verwendet.

Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit gemessenen elektrophysiologischen Parameter zur Charakterisierung des humanen 5HT3A-Rezeptors stimmen mit den Literaturwerten überein, sofern sie sich in Anbetracht der Schwankungsbreite einiger Werte und unterschiedlicher Bedingungen vergleichen lassen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Charakterisierung des 5HT3A-Rezeptors mit dem verwendeten Setup korrekt und reproduzierbar durchgeführt wurde.

In Tabelle 2 sind Messungen zur Elektrophysiologie des 5HT3A-Rezeptors aus bisherigen Publikationen zusammengefasst. Soweit möglich wurden die Bedingungen, unter denen die Messungen durchgeführt wurden, ebenfalls erfasst. Dazu gehören die Spezies des Rezeptors, das Expressionssystem, die Serotonin-Konzentration bei der Messung von Zeitkonstanten und

der Modus der *Patch Clamp*-Technik. Außerdem wurden die entsprechenden Referenzen aufgeführt, sowie in der letzten Zeile die in dieser Arbeit in Abschnitt 4.1 gemessenen Werte.

Tabelle 2: Literaturwerte für elektrophysiologische Parameter des 5HT_{3A}-Rezeptors (ms = Meerschweinchen, h = human, m = Maus, r = Ratte, *whole cell* = *whole cell voltage clamp*, *excised* = *excised outside out*). Die Zeitkonstanten τ_{on} entsprechen der Aktivierung der Kanäle, τ_1 und τ_2 der Desensitivierung. Bei einigen Messungen konnte die Desensitivierung mit nur einer Zeitkonstante ausgewertet werden. In der letzten Zeile befinden sich die Werte aus dieser Arbeit.

Spezies	n_H	EC50 [μ M]	E_{rev} [mV]	τ_{on} [ms]	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	c [μ M]	Zellen	Modus	Referenz
ms		2,9	-1,9		linear		10	HEK	whole cell	Lankiewicz (1998) ²⁰
h	2,85	5,4		17	150		30	HEK	excised	Bruss et al. (2000) ²³
h	1,5	8,6	-5,5	16	160		30	HEK	excised	Barann et al. (2000) ¹⁶
h		2,3	-4,9		280	2313	10	HEK	whole cell	Lankiewicz (1998) ²⁰
h				12	619		10	HEK	whole cell	Eisensamer et al. (2003) ²⁴
h	2,3	2,3						HEK	whole cell	Lobitz et al. (2001) ²⁶
h	1,8	3,4	-2,2					HEK	whole cell	Brown et al. (1998) ¹⁷
h	3	2		7	176	1006	100	HEK	excised	Mott et al. (2001) ¹¹
				9	527	2747	100	HEK	whole cell	
m	1,6	4	0	21	260		30	N1E-115	excised	Barann et al. (2000) ¹⁶
m	1,65	3,4	-2,5					Oocyten	whole cell	Maricq et al. (1991) ²⁷
m		2,9	2,3		155	1226	10	HEK	whole cell	Lankiewicz (1998) ²⁰
m	2,3	3,7		19	3400		30	HEK	whole cell	Gunthorpe, Lummis (1999) ²⁸
m	2,7	3,5	2,3					N1E-115	whole cell	Hussy et al. (1994) ²²
r	2	1,2						HEK	whole cell	Steward et al. (2000) ²⁹
h	1,8	4,2	-3,8	8	182	3194	100	HEK	whole cell	eigene

4.2. Zell-Chip-Kopplung unter *Patch Clamp*-Bedingungen

Zur Charakterisierung des Kontaktes zwischen 5HT3A-exprimierenden Zellen und Siliziumchips wurde die Zell-Chip-Kopplung unter *voltage clamp* untersucht. Abbildung 18 zeigt eine Phasenkontrastaufnahme von HEK-Zellen mit 5HT3A-Rezeptoren, die auf einem Siliziumchip mit linearem Transistorarray kultiviert wurden. Das *Gate* eines Transistors unter einer Zelle ist rot markiert. Von dieser Zelle konnten Spaltspannungen gemessen werden

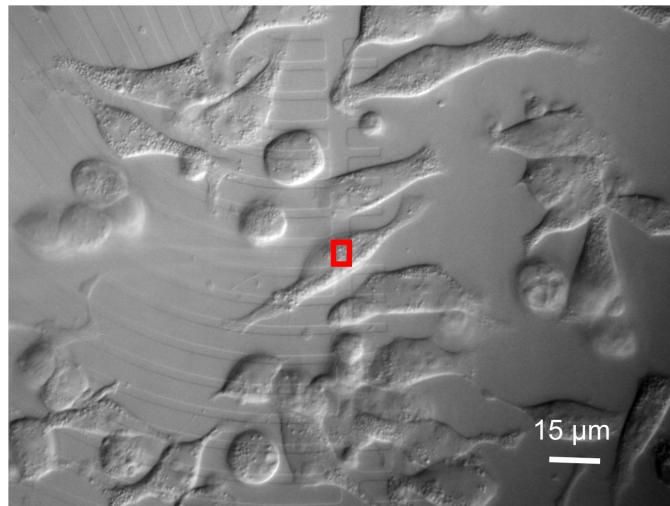


Abbildung 18: 5HT3A exprimierende HEK-Zellen, kultiviert auf einem Siliziumchip mit linearem Transistorarray. In rot ist das *Gate* eines Transistors markiert, mit dem Spaltspannungen gemessen wurden.

Die mit der *Patch*-Pipette ermöglichte Kontrolle des Membranpotentials als Triebkraft des Membranstromes (und somit des Transistorsignals) erleichterte die Untersuchung der Zell-Chip-Schnittstelle. Bei konstantem Membranpotential (Gleichspannungsfall) wurde der zeitliche Verlauf der Kopplung untersucht. Ebenso wurde die Messung von elektrophysiologischen Parametern mit Transistoren unter Gleichspannung durchgeführt und mit den Messungen aus dem vorherigen Abschnitt verglichen. Die elektrischen Eigenschaften der Kopplung und die Kanalverteilung in der Plasmamembran wurden mit Wechsellspannungsmessungen bestimmt.

4.2.1. Der zeitliche Verlauf der Kopplung

In diesem Abschnitt wurde der zeitliche Verlauf der Spaltspannung V_J aus Transistormessungen mit dem simultan gemessenen Membranstrom I_M verglichen. Ein Modell, welches beide Signale simuliert, wird anschließend diskutiert.

Verzögerung und schneller Signalzerfall im Chip

HEK-5HT3A-Zellen wurden bei einem Haltepotential von -120 mV mit $100 \mu\text{M}$ Serotonin stimuliert. Nach Abschnitt 4.1.4 erfolgte bei dieser Konzentration die schnellste Stromantwort. Beide Messsignale wurden simultan aufgezeichnet und zusammen in Abbildung 19A zwischen 500 und 2000 ms dargestellt.

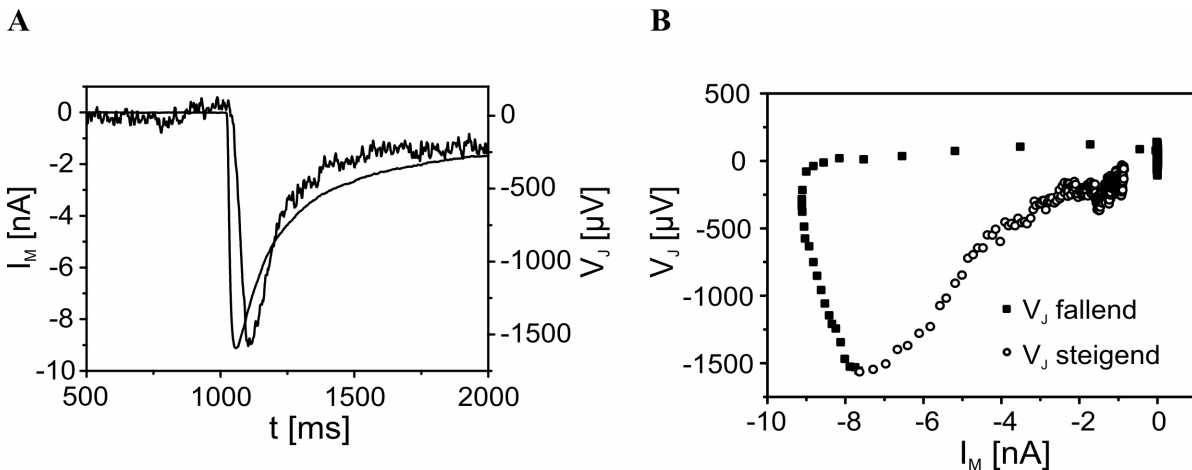


Abbildung 19: Vergleich von I_M und V_J . (A) Gemeinsame Darstellung des zeitlichen Verlaufs beider Signale. Eine Verzögerung der Transistorspannung von etwa 40 ms ist zu erkennen. (B) Auftragung beider Signale gegeneinander. V_J fällt ab, kurz bevor I_M die maximale Signalhöhe erreicht. Nach der steigenden Phase des Transistorsignals (\blacksquare) zerfallen beide Signale mit unterschiedlichen Zeitkonstanten, der Graph weist einen steigenden Ast (\circ) mit zwei unterschiedlichen Abschnitten auf.

Es ist eine Verzögerung der Amplitude des Transistorsignals gegenüber dem Membranstrom zu erkennen, die in dieser Beispielmessung etwa 40 ms betrug. Die Verzögerung des Transistorsignals wurde für 16 Messungen ausgewertet. Der Mittelwert betrug 39 ms mit einer Standardabweichung von 23 ms. Unterschiedliche Kopplungsgeometrien des Zell-Chip-Interfaces können diese hohe Standardabweichung verursachen: Im Gegensatz zur Elektrophysiologie würde die Bedeckung des Transistors oder unterschiedliche Abstände zur Chipoberfläche bei Transistormessungen einen Einfluss haben. Auf die Geometrie und Variabilität des Zell-Chip-Kontaktes wird später eingegangen.

Auftragung von Spaltspannung gegen Membranstrom

V_J und I_M wurden in Abbildung 19B gegeneinander aufgetragen, um Abweichungen im Verlauf beider Signale zu verdeutlichen. Punkte, die zeitlich der fallenden Transistorspannung entsprechen, sind als Quadrate im Graphen dargestellt. Kreise entsprechen Punkten aus dem Zeitverlauf, die eine steigende Transistorspannung bedeuten. Bei gleichem zeitlichem Verlauf

beider Signale ergäbe sich eine Gerade. In der Abbildung ist zu erkennen, dass der Membranstrom I_M schneller reagiert als V_J , (oberer waagerechter Ast im Graph). Kurz bevor das Minimum von I_M (etwa -9 nA) erreicht wird, fällt auch V_J ab. Das Minimum der Spaltspannung (etwa $1800 \text{ } \mu\text{V}$) wird erreicht, wenn I_M wieder auf etwa $-7,5 \text{ nA}$ gestiegen ist (fallender Ast im linken Bereich des Graphen). Der Membranstrom I_M ist ein Messsignal für alle Kanäle der Zelle, in V_J gehen hingegen nur die Kanäle in der adhären Membran ein. Ein Kurvenverlauf wie in Abbildung 19B bedeutet, dass die Kanäle in der freien Membran früher öffnen als die Kanäle in der adhären Membran und schon geöffnet vorliegen, wenn die Kanäle der adhären Membran gerade damit beginnen. Wenn die Spaltspannung dagegen ihr Minimum durchläuft, schließen die Kanäle der freien Membran bereits wieder.

Nachdem die Minima für I_M und V_J durchlaufen sind, befinden sich beide Signale in der steigenden Phase (steigender Ast, rechts). Das Transistorsignal zerfällt allerdings schneller als der Membranstrom. Die Zeitkonstante τ_1 von V_J betrug zwischen 70 % und 80 % der entsprechenden Zeitkonstante von I_M . In Abbildung 19B ist dadurch eine steigende Phase mit zwei unterscheidbaren Abschnitten zu erkennen: Der erste, steilere Abschnitt würde durch den schnelleren Zerfall von V_J nicht durch 0 führen. Dieser steigende Ast bekommt dann im zweiten Abschnitt allerdings eine flachere Steigung und weist auf den Ursprung. Hier ist der Signalzerfall für V_J und I_M gleich schnell. Der Nullpunkt wurde nicht erreicht, da im beobachteten Zeitraum die Kanäle nicht vollständig schlossen. Der Verlauf beider Signale wurde im nächsten Abschnitt simuliert und anhand des Modells erklärt.

4.2.2. Modell des zeitlichen Verlaufs

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass das Transistorsignal vom Membranstrom abweicht: V_J reagiert scheinbar langsamer auf eine Stimulation, zerfällt aber schneller. Aus der Zell-Chip-Kopplung mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen ist bekannt, dass die Kanäle in freier und adhären Membran die gleiche Kanalkinetik aufweisen.^{2,3} Daher wurde hier zunächst davon ausgegangen, dass die Diffusion von Serotonin in die Adhäsionsregion für die Verzögerung der Spaltspannung verantwortlich ist. Für ein Modell zur Simulation von I_M und V_J wurde die Zellmembran in den adhären und den freien Bereich unterteilt. Für jede Membrandomäne wurde ein Konzentrationsverlauf während der Serotoninapplikation berechnet. Damit wurden die Leitfähigkeiten für jeden der beiden Membranbereiche anhand des kinetischen Kanalmodells aus Abschnitt 2.2.2 ermittelt. Der Membranstrom I_M wurde daraus als Summe der Ströme durch adhären und freie Membran berechnet, die

Spaltspannung V_J wurde mit der Leitfähigkeit der adhärten Membran aus dem Ein-Kompartiment-Modell unter Berücksichtigung der Elektrodifusion ermittelt. I_M und V_J aus der Simulation wurden miteinander verglichen, mögliche Gründe für den schnelleren Zerfall von V_J in den Messungen werden am Ende dieses Abschnitts diskutiert.

Stimulation der Kanäle in freier und adhärter Membran

Durch die schnelle Applikation von Serotonin ist der Konzentrationsverlauf für die freie Membran $c_{FM}(t)$ stufenförmig. Dieser Verlauf ist für eine Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ Serotonin in Abbildung 20 gezeigt.

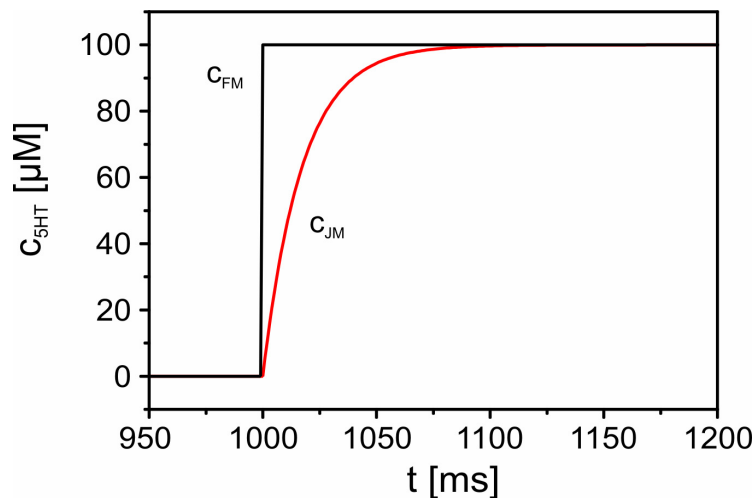


Abbildung 20: Konzentrationsverlauf für Serotonin an der freien Membran (c_{FM}) und an der adhärten Membran (c_{JM}).

Der Konzentrationsverlauf $c_{JM}(t)$ unter der Zelle ist ebenfalls in Abbildung 20 dargestellt. Er erscheint durch die Diffusion von Serotonin in den Spalt zwischen Zelle und Chip nicht mehr stufenförmig sondern abgerundet.

Um diesen Konzentrationsverlauf aus der Diffusion zu berechnen wurde ein runder Kontaktbereich zwischen Zelle und Chip angenommen, in den Serotonin vom Rand eindiffundiert. Durch den Übergang vom Flächenkontaktmodell zum Ein-Kompartiment-Modell folgt für die Zeitkonstante der Diffusion aus der Einstein-Smoluchowski-Gleichung:

$$\tau = \frac{x_J^2}{5,783 \cdot D},$$

Gleichung 27

mit D als Diffusionskoeffizient für Serotonin und x_J als Radius des Kontaktbereiches. Die Konzentration $c_{JM}(t)$ ergibt sich dann als exponentieller Zerfall der Konzentration am Rand der Zelle mit der Zeitkonstante τ :

$$c_{JM}(t) = c_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right).$$

Gleichung 28

Dabei wurde ein Radius von $x_J = 10 \mu\text{m}$ angenommen, was für die hier verwendeten HEK-Zellen realistisch ist. Für den Diffusionskoeffizient von Serotonin unter der Zelle wurde der Diffusionskoeffizient von Molekülen mit vergleichbarer Größe in Wasser verwendet ($1 \mu\text{m}^2/\text{ms}$).³⁰

Besetzungswahrscheinlichkeiten und Membranleitfähigkeit

Das Gleichungssystem des kinetischen Modells des Rezeptors (Gleichung 24, Abschnitt 2.2.2) wurde für die Konzentrationsverläufe aus dem vorangegangenen Abschnitt numerisch gelöst, um die Kanaldynamik für die freie Membran und die adhärenzte Membran zu berechnen. Dafür wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Ratenkonstanten verwendet. Im Anhang (Anhang D) ist eine analytische Lösung eines derartigen Gleichungssystems mittels einer Matrix beschrieben.

Die mit den Ratenkonstanten und dem entsprechenden Konzentrationsverlauf berechneten Besetzungswahrscheinlichkeiten für die drei offenen (p_{1-3}) und die drei desensitvierten Zustände (p_{7-9}) aus dem Kanalmodell sind in Abbildung 21A beispielhaft für die freie Membran dargestellt.

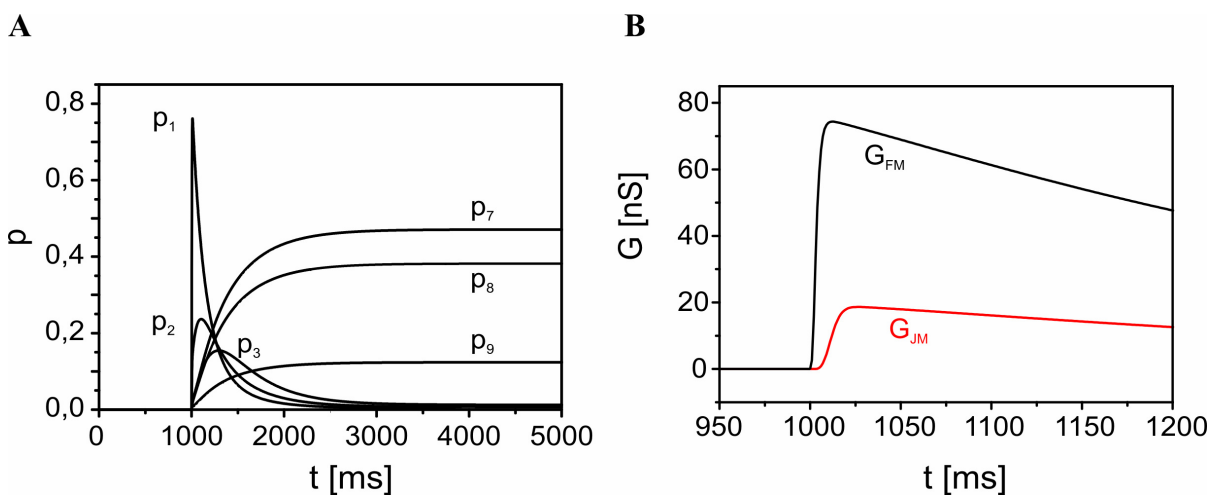


Abbildung 21: (A) Besetzungswahrscheinlichkeiten für die drei offenen und die drei desensitvierten Zustände für den Konzentrationsverlauf der freien Membran. (B) Aus den Besetzungen berechnete Leitfähigkeiten für die adhärenzte Membran (G_{JM} , rot) und die freie Membran (G_{FM}).

Aus den Besetzungswahrscheinlichkeiten der drei offenen Zustände für den jeweiligen Konzentrationsverlauf wurden die Leitfähigkeiten für die freie Membran $G_{FM}(t)$ und die

adhärierte Membran $G_{JM}(t)$ berechnet. Dabei wurde eine Einzelkanalleitfähigkeit von 1 pS und eine Gesamtzahl an Kanälen von 100000 angenommen, die sich gemäß eines Flächenverhältnisses der Membrandomänen von $\beta = A_{JM}/A_{FM} = 0,25$ aufteilen. Die Einzelkanalleitfähigkeit wurde anhand bekannter Werte für verschiedene Spannungen abgeschätzt (Brown et al., 1998).¹⁷ Ein Flächenverhältnis von 0,25 ist für HEK-Zellen schon beschrieben worden.³¹ Zur Berechnung von I_M wurde die Leitfähigkeit der gesamten Membran G_M als Summe aus G_{JM} und G_{FM} gebildet und in den Strom umgerechnet. Die Leitfähigkeit G_{JM} wurde außerdem im Ein-Kompartiment-Modell zu Berechnung von V_J verwendet.

In Abbildung 21B wurden die Leitfähigkeiten $G_{FM}(t)$ und $G_{JM}(t)$ dargestellt. Die Leitfähigkeit der adhären Membran $G_{JM}(t)$ (rot) ist durch den verzögerten Konzentrationsverlauf von Serotonin gegenüber den Leitfähigkeiten der freien Membran verlangsamt.

Parameter für das Ein-Kompartiment-Modell

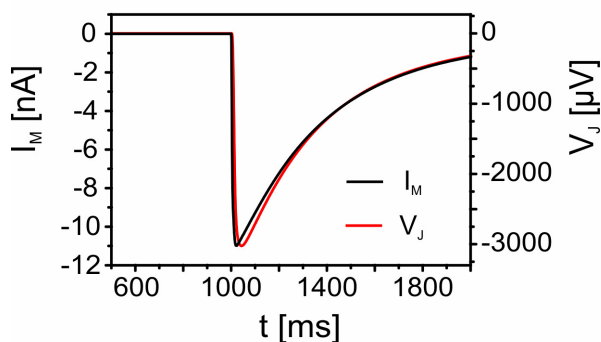
Mit dem Ein-Kompartiment-Modell, der Elektrodifffusion und der Leitfähigkeit G_{JM} wurde gemäß Gleichung 20, Gleichung 21 und Gleichung 22 die Spaltspannung V_J unter der adhären Membran berechnet. Dabei wurden die Ionensorten CS^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Cl^- berücksichtigt, für die G_J nach Gleichung 20 ermittelt wurde. Als Diffusionskoeffizienten wurden folgende Werte eingesetzt: $D_{Cs} = 2,1 \mu m^2/ms$, $D_{Na} = 1,33 \mu m^2/ms$, $D_{Ca} = 0,79 \mu m^2/ms$, $D_{Mg} = 0,79 \mu m^2/ms$ und $D_{Cl} = 2,03 \mu m^2/ms$.³² A_J als Kreisfläche des Spalts zwischen effektiver Membran und Chip wurde aus dem Radius $a_j = 10 \mu m$ berechnet, und d_j ist aus früheren Arbeiten bekannt.^{5,33} Hier wurde ein Wert von 70 nm verwendet. Die Membranleitfähigkeiten G_{JM}^i für die Ionensorten, die für Gleichung 22 benötigt wurden, wurden aus G_{JM} berechnet. Dabei wurde angenommen, dass bei gleicher relativer Permeabilität von Na^+ und Ca^{2+} , der Anteil von Ca^{2+} am Gesamtstrom entsprechend der Ionenkonzentrationen ca. 1 % beträgt. Dies stimmte auch überein mit publizierten Messungen des Anteils des Calciumstroms durch Acetylcholinrezeptoren mit ähnlicher relativer Permeabilität.^{34,35} Für Mg^{2+} wurde wegen der geringeren relativen Permeabilität eine Leitfähigkeit von 0,6 % von G_{JM} eingesetzt.¹⁷ Der übrige und somit größte Anteil des Stromes wurde in der Simulation durch Na^+ getragen.

Für die Ionenkonzentrationen am Anfang der Simulation wurden die Konzentrationen der verwendeten extra- und intrazellulären Lösungen eingesetzt.

Simulation von V_J und I_M

Mit den Parametern und Annahmen aus dem vorherigen Abschnitt wurde das Einkompartiment-Modell mit Elektrodifusion durch numerische Integration gelöst. Der Verlauf der Spaltspannung ist in Abbildung 22A dargestellt (rote Kurve). Außerdem wurde aus der Gesamtleitfähigkeit G_M mit einem Membranpotential von -120 mV der Membranstrom I_M berechnet und zum Vergleich ebenfalls in Abbildung 22A aufgetragen. Aus der Abbildung wird deutlich, dass V_J wie in den Messungen gegenüber I_M verzögert ist. Aus dem hier verwendeten Modell ergibt sich eine Verzögerung von etwa $20 - 25$ ms. Dies ist kürzer als der gemessene Wert von 39 ms. Mit der Standardabweichung von 23 ms entspricht die Simulation aber dem Messwert.

A



B

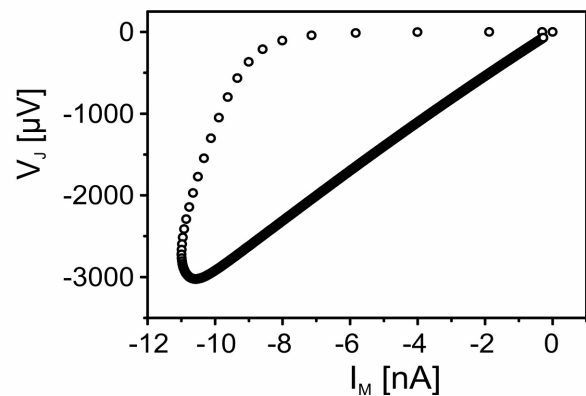


Abbildung 22: Vergleich von I_M und V_J aus der Simulation. (A) Verzögerung von V_J gegenüber I_M . (B) Auftragung von V_J gegen I_M .

Abbildung 22B zeigt die Auftragung von V_J gegen I_M . Die Form der Kurve ähnelt der Auftragung in der Beispielmessung in Abbildung 19. In der Simulation beginnt allerdings V_J schon abzufallen, bevor I_M den Minimalwert erreicht hat. Dies ist in der Messung nicht der Fall, in der der Abfall von V_J erst nach dem Erreichen des Minimums von I_M einsetzt. In dieser Simulation erscheint daher der Durchlauf des Minimums von V_J nach links verschoben. Nach dem Erreichen des Minimums von V_J zerfallen beide Signale in der Simulation mit denselben Zeitkonstanten. In Abbildung 22B folgt daraus ein linear steigender Abschnitt, der zum Ursprung führt. In der Messung zerfiel V_J jedoch schneller als I_M . In den nächsten Abschnitten werden das frühere Einsetzen und der schnellere Zerfall von V_J diskutiert.

Verzögerung von V_J – Ein-Kompartimentmodell gegenüber Flächenkontaktmodell

Im Vergleich zur Messung setzte V_J in der Simulation zu früh ein, was in Abbildung 22B zu einer veränderten Kurvenform führt. Der Grund dafür ist das verwendete Ein-Kompartiment-Modell. V_J entsteht nach diesem Modell durch die Leitfähigkeit der gesamten adhärten Membran. Abbildung 23A zeigt schematisch diese Annahme für das Ein-Kompartiment-Modell. Die Vorstellung einer Spaltspannung aus einer einheitlichen adhärten Membran entspricht nicht der tatsächlichen Situation.

Abbildung 23B zeigt ein Schema des Flächenkontaktmodells mit einer zutreffenderen Annahme für die Spaltspannung V_J . Die Kanäle am Rand der adhärten Membran öffnen durch die Diffusion von Serotonin früher als die Kanäle im inneren Bereich der Adhäsionsfläche. Der Strom durch diese Kanäle am Rand kann einfacher vom Bad einfließen als der Strom durch die inneren Kanäle, die später öffnen. Die Entfernung zum Bad und der Widerstand, über den der Strom fließen muss, sind am Rand der adhärten Membran geringer als am Mittelpunkt der Adhäsionsfläche. Die äußeren Kanäle tragen daher kaum oder zumindest viel weniger zu V_J bei als die inneren Kanäle.

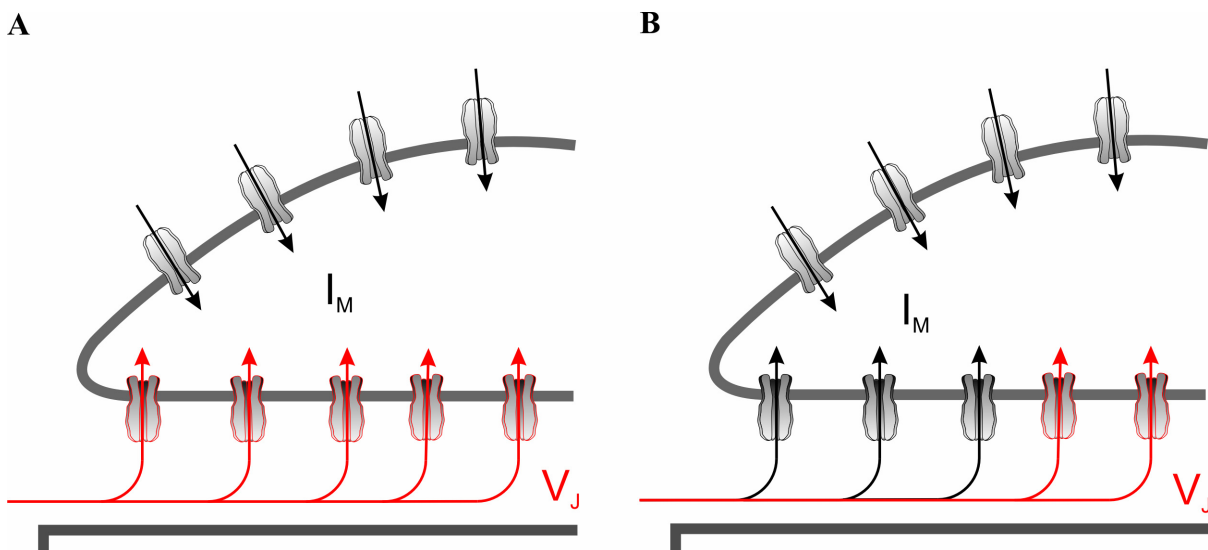


Abbildung 23: Vergleich von zwei Modellen der Zell-Chip-Kopplung. (A) Das hier verwendete Ein-Kompartiment-Modell. Die gesamte Adhäsionsfläche trägt zu V_J bei. (B) Flächenkontaktmodell mit einer eingegrenzten Membranfläche, die die Spaltspannung verursacht. Der Strom durch die anderen Kanäle der adhärten Membran fließt ohne Wirkung auf V_J vom Bad in die Zelle.

Eine Simulation anhand des Flächenkontaktmodells würde die Einführung eines für V_J relevanten adhärten Membranbereich ermöglichen. Dies würde eine Simulation mit einer größeren Verzögerung des Einsetzens von V_J ergeben. Die Kanäle außerhalb dieses

Membranbereiches würden nicht in V_J eingehen, aber zu I_M beitragen. Der für V_J relevante Membranbereich würde dann als Parameter des Modells so gewählt werden, dass I_M wie in der Messung bereits wieder zerfällt, bevor V_J einsetzt. Damit würde eine Kurvenform wie in Abbildung 19 besser simuliert werden können. Das hier verwendete Ein-Kompartiment-Modell ist allerdings einfacher und reicht für die Erklärung der Messungen aus.

Ionenkonzentrationen – Anreicherung von Ca^{2+} und Mg^{2+}

Mit dem verwendeten Modell konnte zwar die Verzögerung zwischen I_M und V_J beschrieben werden. Die Ursache für den Unterschied zwischen V_J in der Simulation und in der Messung wurde im vorangegangenen Abschnitt für den Beginn des Signals erklärt. Der schnellere Zerfall des Transistorsignals konnte noch nicht erklärt werden. Neben V_J wurden aus der Elektrodifusion im Ein-Kompartiment-Modell auch die Konzentrationsverläufe der beteiligten Ionen berechnet. In Abbildung 24 sind die Konzentrationen von Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} dargestellt.

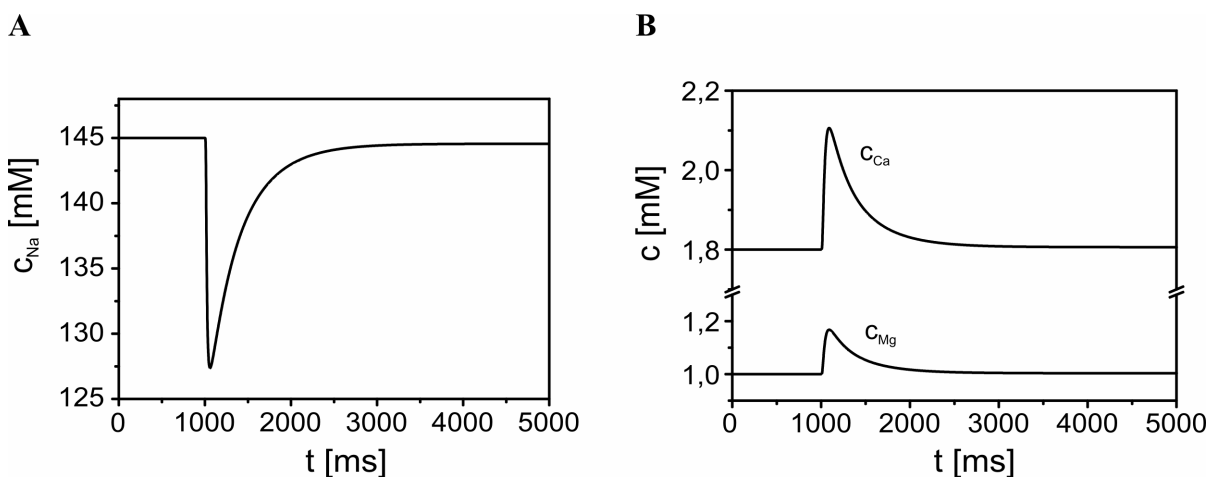


Abbildung 24: Konzentrationsverläufe einiger Kationen. (A) Der Spalt verarmt während der Kanalöffnung um etwa 17,5 mM Na^+ . (B) Divalente Kationen, die die Desensitivierung beeinflussen werden dafür im Spalt angereichert. Ca^{2+} z.B. um etwa 0,3 mM oder 17 %.

Aus Abbildung 24A wird deutlich, dass der Spalt während der Kanalöffnung etwa an 17,5 mM Na^+ verarmt, da der Strom durch die adhärenzte Membran hauptsächlich von Na^+ getragen wird. Na^+ kann - im Vergleich zum Einstrom in die Zelle – nicht schnell genug aus dem Badelektrolyten nachfließen, um die Konzentration im Spalt wieder auszugleichen. Eine Na^+ -Konzentration entsprechend des Badelektrolyten wird erst wieder bei geschlossenen Kanälen erreicht.

Die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} werden hingegen im Spalt um etwa 17-20 % (Ca^{2+} bzw. Mg^{2+}) angereichert. Nach Gleichung 20 ist die Spaltleitfähigkeit für die Ionensorten G_j^i abhängig vom Quadrat der Valenz. Obwohl die divalenten Kationen einen geringeren Diffusionskoeffizienten aufweisen, ist daher der Fluss von divalenten Ionen im Spalt gegenüber monovalenten Ionen erleichtert. Da der Membranstrom überwiegend von Na^+ getragen wird, werden die im Spalt abgeflossenen Na^+ -Ionen somit z.T. durch divalente Kationen aus dem Badelektrolyten ersetzt, die sich im Spalt anreichern.

Einfluss von Ca^{2+} auf den Zerfall der Spaltspannung

Die Desensitivierung der Kanäle hängt von der Konzentration an divalenten Kationen ab, wie schon in Abschnitt 4.1.4 erwähnt wurde. Lambert et al. haben z.B. monoexponentiell desensitivierende Membranströme von endogenen 5HT3-Rezeptoren in Neuroblastoma-Zellen in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration gemessen: Zwischen 0,1 mM und 10 mM extrazellulärem Ca^{2+} verringerte sich die Zeitkonstante von 6230 ms auf 890 ms. Einen ähnlichen Einfluss hatte Mg^{2+} .²⁵ Hierbei handelte es sich um eine Mauszelllinie mit endogenen Rezeptoren unbekannter Zusammensetzung. Die Zeitkonstanten der Desensitivierung und die Ca^{2+} -Abhängigkeit können nicht direkt auf den hier verwendeten homomeren humanen Rezeptor übertragen werden. Jedoch kann daraus geschlossen werden, dass die Anreicherung von Ca^{2+} und Mg^{2+} im Spalt zu schnelleren Desensitivierungs-Zeitkonstanten der Kanäle in der adhären Membran und damit zu einem schnelleren Zerfall des Chipsignals führt. In der Auftragung von V_j gegen I_M (Abbildung 19B) resultiert daraus dann für das Schließen der Kanäle ein steilerer Anstieg als in der Simulation, der nicht durch null laufen würde. Der Übergang in eine flachere Phase, die durch den Ursprung führt, wird durch das Schließen der Kanäle in der in der freien Membran verursacht. Ab hier sind nur noch die verzögert aktivierten Kanäle der adhären Membran geöffnet, obwohl der Strom durch diese Kanäle zunächst schneller zerfiel. Der Transistor, aber auch die *Patch*-Pipette, messen dann beide diese Kanäle, so dass die Zeitkonstanten beider Signale identisch sind und sich in der Auftragung eine Gerade durch den Ursprung ergibt.

Das Modell mit veränderten Ratenkonstanten für die Desensitivierung

Die mikroskopischen Übergangskonstanten für die drei desensitivierten Zustände aus dem 5HT3A-Modell in Abbildung 6 wurden aufgrund der höheren Ca^{2+} -Konzentration im Spalt geändert. Der Zusammenhang zwischen den mikroskopischen Ratenkonstanten und der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist nicht bekannt, da kein Modell existiert, das die Ca^{2+} -

Abhängigkeit der Signale mit Ratenkonstanten beschreibt. Die Konstanten kd_3 , kd_4 , kd_5 und kr (Tabelle 1) wurden daher unter Berücksichtigung der mikroskopischen Reversibilität des Kanalmodells willkürlich um 40 % geändert. Dies ist zwar eine spekulative Annahme, könnte aber eine Richtung für die weitere Aufklärung des Mechanismus vorgeben.

Mit dieser Annahme wurde das Modell für den zeitlichen Verlauf der Kopplung noch einmal berechnet. Abbildung 25A zeigt den Vergleich beider Signale. Die Verzögerung des Transistorsignals von etwa 25 ms bleibt bestehen, der Zerfall von V_J ist nun schneller als das Abklingen von I_M .

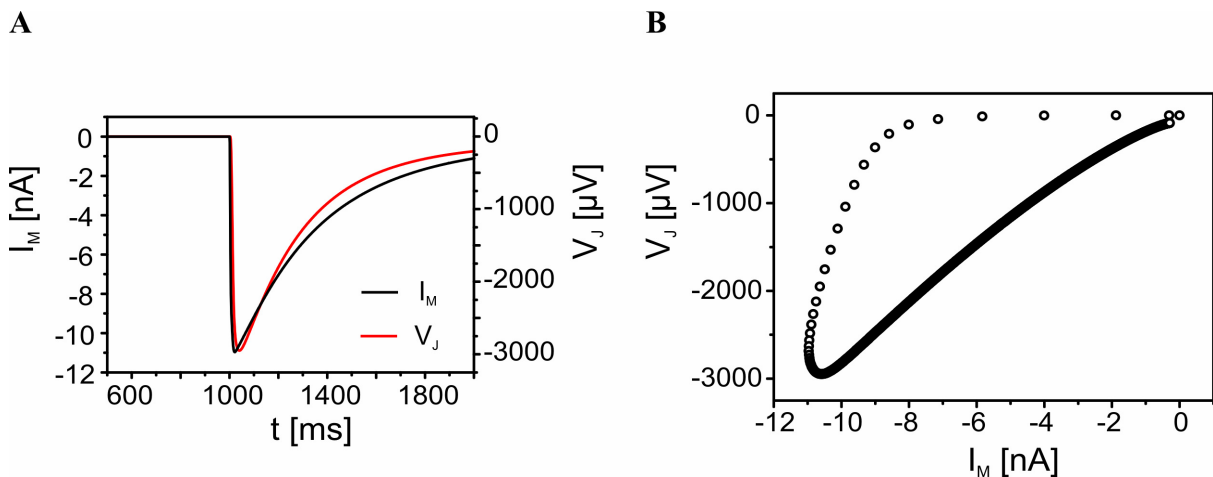


Abbildung 25: V_J und I_M mit veränderten Ratenkonstanten aufgrund der erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Spalt. (A) Vergleich beider Signale. (B) Auftragung von V_J gegen I_M .

In der Auftragung von V_J gegen I_M in Abbildung 25B weist dementsprechend die zerfallende Phase beider Signale (ansteigender Ast) wie in der Messung zunächst nicht zum Nullpunkt. Im weiteren Verlauf geht der Graph dann aber in einen Bereich mit flacherer Steigung über, der zum Ursprung führt. Obwohl der Signalzerfall in Abbildung 25B der Messung ähnelt, ist der schnellere Zerfall von V_J in der Messung stärker ausgeprägt, was zu einer deutlicheren Biegung im ansteigenden Ast der Auftragung führt. Dieser deutliche Effekt in der Messung kann hier aufgrund der unbekanntenen Ca^{2+} -Abhängigkeit der Ratenkonstanten nur qualitativ erklärt werden.

4.2.3. Elektrophysiologische Parameter aus der zeitunabhängigen Kopplung

Zur Korrelation von I_M und V_J in Abhängigkeit der Serotonin-Konzentration und des intrazellulären Potentials wurden Experimente analog zu den elektrophysiologischen Messungen in Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3 durchgeführt. Im Gegensatz zum zeitlichen Verlauf

wurden aus den Signalen nur die zeitunabhängigen Amplituden zur Auswertung herangezogen.

Konzentrationsabhängigkeit des Transistorsignals

HEK-5HT3A-Zellen wurden bei einem Membranpotential von -120 mV mit Serotonin-Lösungen der Konzentrationen $2,5$ μ M, 5 μ M, 10 μ M und 100 μ M stimuliert. Membranstrom I_M und Spaltspannung V_J wurden simultan aufgezeichnet. Abbildung 26 zeigt eine Messung von I_M und V_J an einer Zelle mit Serotonin-Lösungen von 5 μ M und 100 μ M über einen Zeitraum von fünf Sekunden. Wie in Abschnitt 4.1.2 waren mit abnehmender Konzentration Aktivierung und Desensitivierung der Kanäle verlangsamt, die Amplitude von mehreren Nanoampere nahm mit kleineren Konzentrationen ab. Die Membranströme verursachten Transistorsignale von mehreren hundert Mikrovolt. Diese Signale nahmen ebenfalls bei kleineren Konzentrationen ab, ebenso wurden auch hier Anstieg und Abfall des Signals verlangsamt. Konzentrationen von weniger als $2,5$ μ M wurden nicht eingesetzt, da bei niedrigeren Konzentrationen Rauschen und Drift des Transistors die Amplitude von V_J verdeckten. Eine leichte Drift von V_J in den positiven Bereich ist auch in Abbildung 26B innerhalb der ersten 1000 ms zu erkennen.

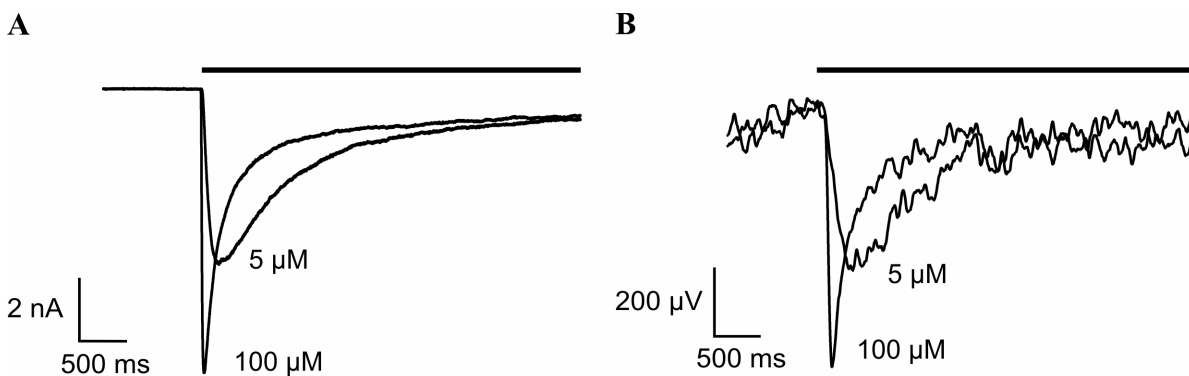


Abbildung 26: Messung von I_M und V_J an einer Zelle für zwei verschiedene Serotonin-Lösungen über fünf Sekunden. (A) Membranströme nach Stimulation mit 5 μ M und 100 μ M Serotonin. (B) Transistorsignale derselben Zelle.

Die Hill-Kurve mit Membranstrom und Spaltspannung

Die Konzentrationsabhängigkeit der Kanäle in der adhären Membran (aus der Messung von V_J) und in der gesamten Membran (aus der Messung von I_M) wurde in diesem Abschnitt verglichen. Dazu wurden die Amplituden der konzentrationsabhängigen Messungen aus dem vorangegangenen Abschnitt ausgewertet: Die Amplituden beider Signale für die Konzentrationen $2,5$ μ M, 5 μ M und 10 μ M wurden auf die Amplituden bei 100 μ M Serotonin

normiert und in Abbildung 27A gegen die logarithmisch skalierte Konzentration aufgetragen. Für jeden Messpunkt wurden fünf bis 15 Messungen von I_M und V_J von verschiedenen Zellen gemittelt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. In Abbildung 27A wurde ebenfalls die gefittete Hill-Kurve aus der elektrophysiologischen Messung aus Abschnitt 4.1.2 mit den Parametern $n = 1,8$ und $EC50 = 4,2 \mu\text{M}$ dargestellt. Sowohl die Werte für I_M als auch für V_J stimmen mit der Hill-Kurve aus Abschnitt 4.1.2 überein. Die Konzentrationsabhängigkeit der Ströme durch die Kanäle konnte somit mit Transistormessungen ebenso wie mit *Patch Clamp*-Messungen beschrieben werden.

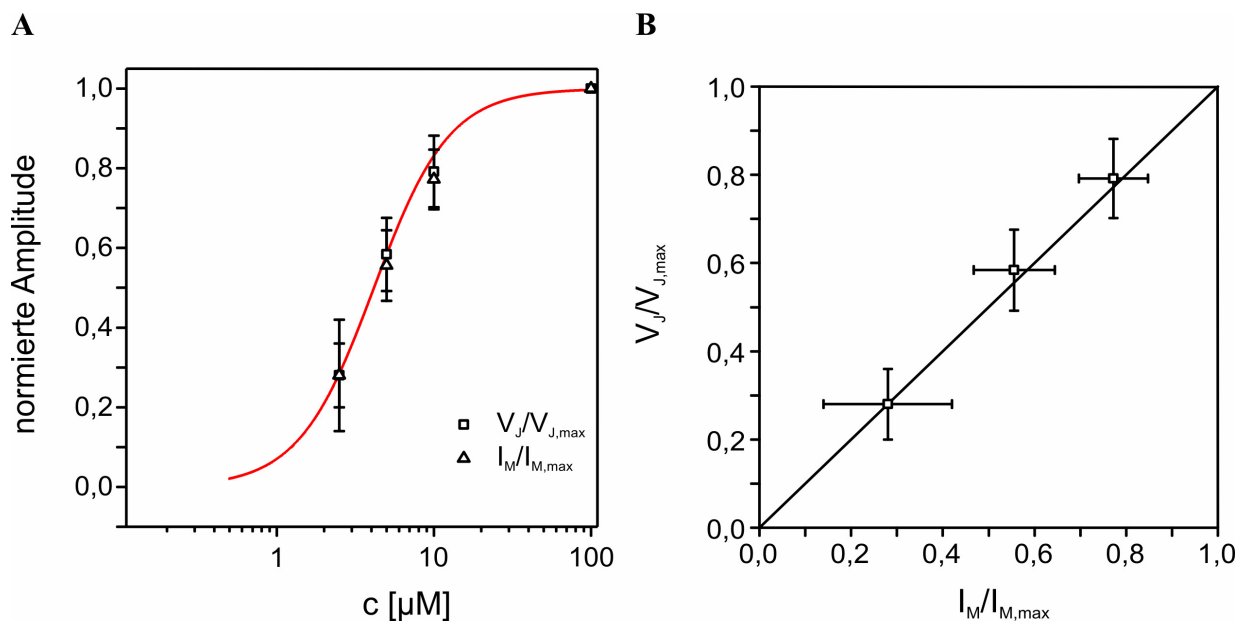


Abbildung 27: (A) Hill-Plot für die auf $100 \mu\text{M}$ Serotonin normierten Amplituden von V_J (□) und I_M (Δ). Die rote Kurve ist identisch mit der gefitteten Hill-Kurve aus Abschnitt 4.1.2 mit den Parametern $n = 1,8$ und $EC50 = 4,2 \mu\text{M}$. (B) Zur Korrelation von I_M und V_J bei verschiedenen Konzentrationen wurden die normalisierten Amplituden gegeneinander aufgetragen. Die Messpunkte liegen auf einer Geraden der Steigung 1.

Die normierten Amplituden von I_M und V_J für die drei getesteten Konzentrationen ($2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$) wurden in Abbildung 27B gegeneinander aufgetragen. Diese Auftragung entspricht Abbildung 19B bei der Beschreibung des zeitlichen Verlaufs. Für diesen zeitunabhängigen Fall liegen die Punkte im Graphen auf einer Geraden mit der Steigung 1 da die Abhängigkeit beider Signale von der Konzentration übereinstimmt.

Abhängigkeit von V_J vom Membranpotential

In Abschnitt 4.1.3 wurde die Abhängigkeit des Membranstroms vom angelegten Haltepotential untersucht, und die Strom-Spannungskurve wurde gemessen. Zur Transistormessung der Beziehung zwischen Membranstrom und Haltepotential konnte keine

Spannungsrampe wie in Abschnitt 4.1.3 angelegt werden, da dieses Verfahren nur mit kleinen Serotonin-Konzentrationen angewendet werden kann. Das Signal-Rausch-Verhältnis für V_J bei kleinen Konzentrationen reichte dafür nicht aus.

Daher wurden die Zellen nacheinander auf verschiedene Haltepotentiale V_M gehalten. Bei jedem Haltepotential wurde mit einer Serotonin-Lösung von $100 \mu\text{M}$ stimuliert, und I_M sowie das daraus resultierende Transistorsignal V_J wurden aufgezeichnet. Als Referenzsignale dienten I_M und V_J bei einem Haltepotential von -120 mV . Abbildung 28A zeigt eine Messung der Membranströme bei drei unterschiedlichen Haltepotentialen während der Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ Serotonin.

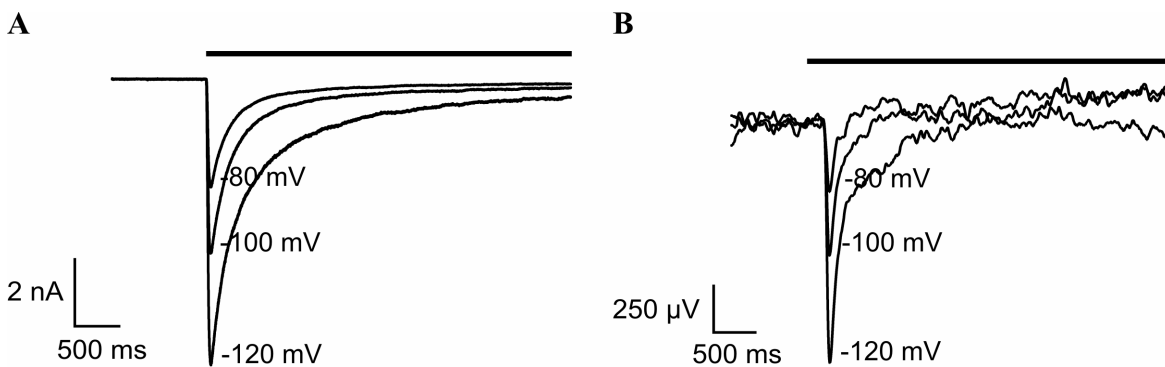


Abbildung 28: (A) Messung der Membranströme während der Applikation einer Serotonin-Lösung von $100 \mu\text{M}$ bei unterschiedlichen Haltepotentialen. (B) Resultierende Transistorsignale für die Membranströme aus (A).

Die Zeitkonstanten für Aktivierung und Desensitivierung blieben unverändert, während die Signalamplitude bei niedrigeren Haltepotentialen abnahm. In Abbildung 28B sind die resultierenden Transistorsignale dargestellt. Auch hier ändern sich die Amplituden, nicht aber die Zeitkonstanten.

Das Umkehrpotential aus der Messung von V_J

Die Amplituden von I_M und V_J wurden auf die jeweilige Amplitude bei -120 mV Haltepotential normiert. Ebenso wurde die Strom-Spannungskurve aus Abschnitt 4.1.3 auf den Membranstrom bei diesem Haltepotential normiert. Die Messwerte wurden dann zusammen mit der normierten Strom-Spannungskurve in Abbildung 29 dargestellt.

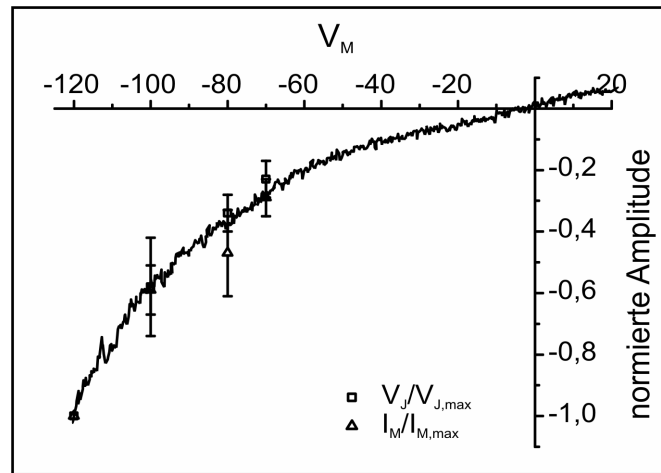


Abbildung 29: Darstellung der Strom-Spannungskurve aus Abschnitt 4.1.3 und der Messwerte für I_M (Δ) und V_J (\square) bei verschiedenen Haltepotentialen. Die Messwerte und die Kurve wurden auf die jeweilige Amplitude bei -120 mV Haltepotential normiert.

Es ist zu erkennen, dass die normierten Messpunkte von I_M und V_J dem Verlauf der Kurve aus der elektrophysiologischen Messung folgten, so dass V_J und I_M das gleiche Umkehrpotential von $E_{rev} = -3,8$ mV beschrieben. Auch bei der Abhängigkeit beider Signale vom Membranpotential korrelieren somit die Amplituden.

4.2.4. Wechselspannungsmessungen

Die Abhängigkeit von V_J von der angelegten Frequenz wurde gemessen, um die Spaltleitfähigkeit g_j und den Skalierungsfaktor $1/(g_j A_M)$ berechnen zu können.

Wechselspannungsmessungen wurden an HEK-5HT3A-Zellen zusätzlich zu Gleichspannungsmessungen bei konstantem Membranpotential durchgeführt. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt, welches anschließend mit einer Amplitude von 10 mV und der gewünschten Frequenz moduliert wurde. Serotonin wurde nicht appliziert, so dass bei geschlossenen Kanälen gemessen wurde.

Abhängigkeit von V_J von der Frequenz

Mit dem *Patch Clamp*-Verstärker wurde das Haltepotential über 500 ms mit Wechselspannungen moduliert, während die Spaltspannung V_J mit dem Transistor aufgezeichnet wurde. Die Amplitude der Sinusschwingungen betrug 10 mV, die verwendeten Frequenzen waren 600 Hz, 800 Hz, 1 kHz, 1,2 kHz, 1,4 kHz und 1,6 kHz.

Abbildung 30 zeigt Messungen der Spaltspannung V_J^{AC} bei zwei Wechselspannungsstimulationen V_M^{AC} an derselben Zelle. In Abbildung 30A und Abbildung

30B sind Modulationen des Membranpotentials mit Frequenzen von 600 Hz bzw. 1600 Hz dargestellt (Amplitude 10 mV). Die entsprechenden Spaltspannungen V_J^{AC} sind jeweils darunter aufgetragen (Abbildung 30C bzw. D). Es wurde eine Erhöhung der Amplitude von V_J^{AC} bei höherer Frequenz der Modulation des Membranpotentials V_M^{AC} beobachtet.

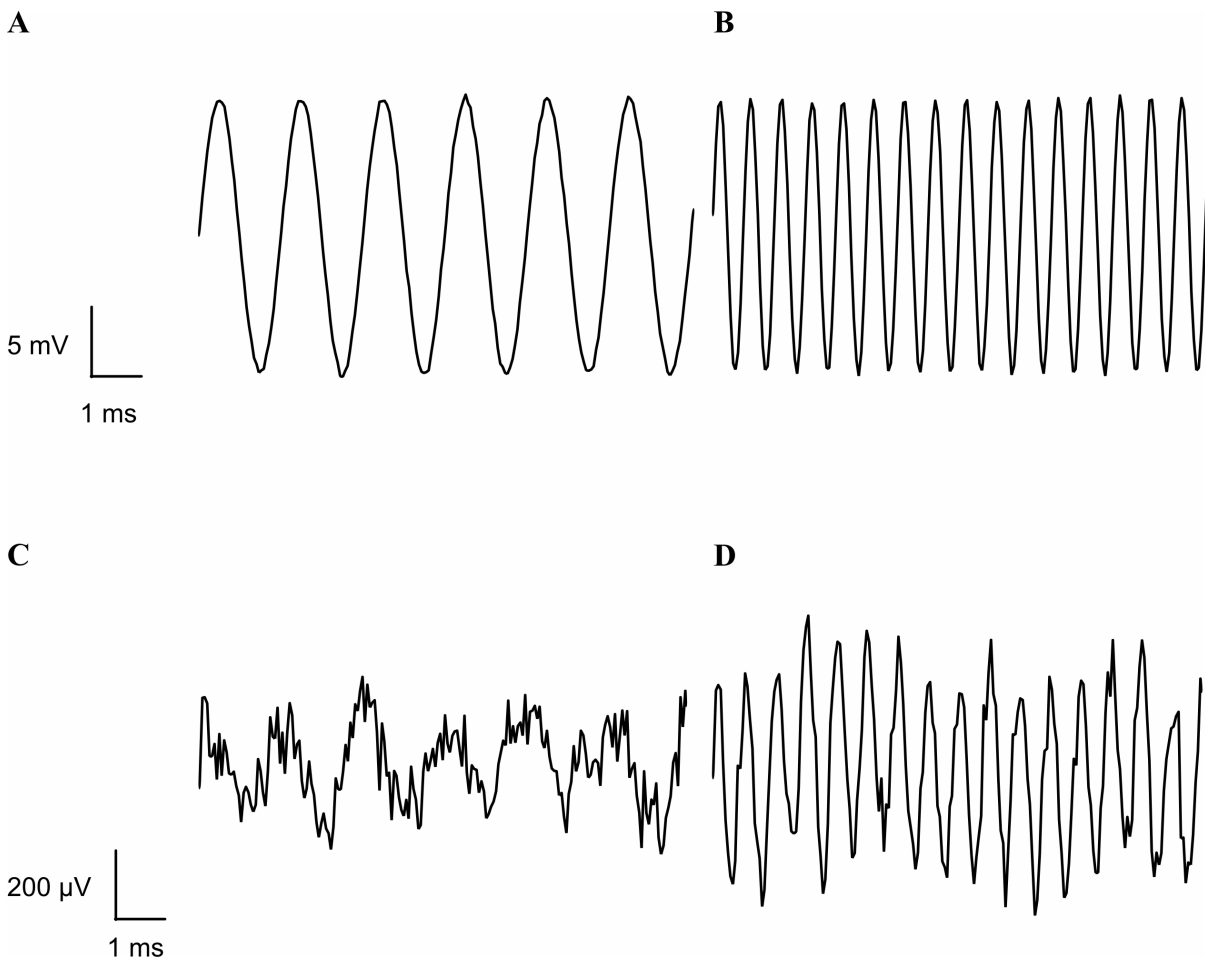


Abbildung 30: Verlauf des Membranpotentials (A, B) und resultierende Spaltspannungen (C, D) für zwei Frequenzen. (A) 600 Hz Modulation, (B) 1600 Hz Modulation von V_M . In (C) und (D) steigen die gemessenen Amplituden von V_J bei höheren Frequenzen des Membranpotentials in (A) und (B) (jeweils darüber).

Aus den Wechselspannungsmodulationen von V_J für die verwendeten sechs Frequenzen wurden die Amplituden V_J^{AC} bestimmt, um die Spaltleitfähigkeit und den Skalierungsfaktor zu ermitteln.

Bestimmung der Spaltleitfähigkeit und des Skalierungsfaktors

Zur Ermittlung der Leitfähigkeit g_j im Spalt zwischen Zellen und Transistoren wurde die Transferfunktion in Abschnitt 2.1.2 definiert: Die Transferfunktion ist der Quotient aus den

Beträgen von Spaltspannung V_J und Membranpotential V_M in Abhängigkeit der Frequenz des angelegten Membranpotentials (s. Abschnitt 2.1.2, Gleichung 16):

$$\left| \frac{V_J^{AC}}{V_M^{AC}} \right| = \frac{c_M}{g_J} \omega$$

Gleichung 16

In Abbildung 31 wurde für die Beispielmessung aus dem vorangegangenen Abschnitt der Quotient V_J^{AC}/V_M^{AC} gegen die Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$ nach Gleichung 16 aufgetragen. Die Messpunkte lagen auf einer Geraden durch den Ursprung, die rot eingezeichnet wurde. Die Steigung betrug $3,01 \mu\text{s}$. Nach Gleichung 16 ist die Steigung der Geraden c_M/g_J . Mit der bekannten spezifischen Membrankapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ergibt sich daraus für diese Kopplung eine spezifische Spaltleitfähigkeit von $g_J = 332 \text{ mS}/\text{cm}^2$.

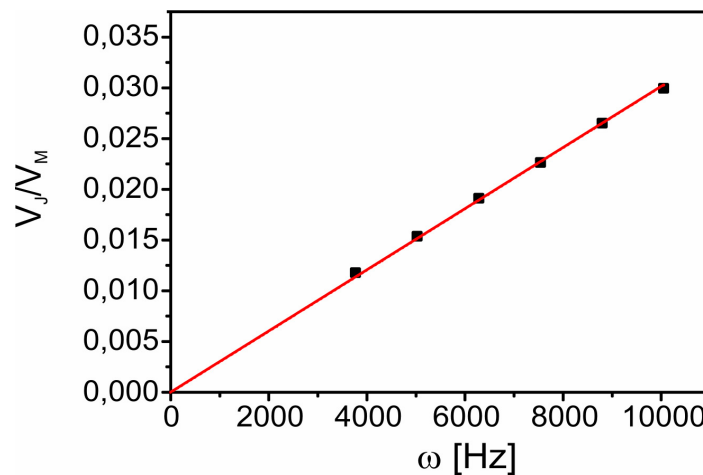


Abbildung 31: Auftragung von V_J^{AC}/V_M^{AC} gegen ω für die Messung aus dem vorangegangenen Abschnitt. Die Punkte liegen auf einer Geraden durch den Ursprung mit der Steigung $3,01 \mu\text{s}$.

g_J wurde dann für die Berechnung des Skalierungsfaktors $1/(g_J A_M)$ verwendet. Die Membranfläche A_M wurde aus der Messung der Zellkapazität ermittelt. Die Zellkapazität C_M wurde vor jeder Gleich- oder Wechsellspannungsmessung mit dem *Patch Clamp*-Verstärker ermittelt. Mit der spezifischen Membrankapazität wurde die gemessene Zellkapazität in die Membranfläche A_M umgerechnet. Für die Zelle in dieser Beispielmessung betrug die Membranfläche $A_M = 1400 \mu\text{m}^2$. Für den Skalierungsfaktor ergab sich damit in diesem Fall $1/(g_J A_M) = 215 \text{ k}\Omega$.

Bestimmung der Verteilung der Ionenkanäle in der Membran

Mit Gleich- und Wechselspannungsmessungen kann nach Gleichung 9 das Verhältnis der Leitfähigkeit von adhärierter Membran zu gesamter Membran g_{JM}/g_M berechnet werden:

$$\frac{V_J}{I_M} = \frac{1}{g_J A_M} \cdot \frac{g_{JM}}{g_M}$$

Gleichung 9

Daraus lassen sich Aussagen über eine eventuelle Anreicherung oder Verarmung von Kanälen in den unterschiedlichen Membrandomänen treffen. Aus Gleichspannungsmessungen mit 100 μM Serotonin wurden die Amplituden von Membranstrom und Spaltspannung ermittelt und der Quotient $V_{J,\text{max}}/I_{M,\text{max}}$ berechnet. Für die Zelle, an der die Beispielmessungen der vorangegangenen Abschnitte durchgeführt wurden, wurde mit $I_{M,\text{max}} = -5,22 \text{ nA}$ und $V_{J,\text{max}} = -1327 \mu\text{V}$ der Quotient $V_{J,\text{max}}/I_{M,\text{max}} = 254 \text{ k}\Omega$ berechnet. Nach Gleichung 9 ergab sich daraus für das Verhältnis der Leitfähigkeiten $g_{JM}/g_M = 1,18$. Die Leitfähigkeit der adhärerten Membran unterschied sich somit nicht wesentlich von der Leitfähigkeit der gesamten Membran, so dass bei dieser Zelle keine Anreicherung oder Verarmung von 5HT3A-Rezeptoren in der adhärerten Membran gemessen wurde.

Statistik der Membranverteilung der 5HT3A-Kanäle

Insgesamt wurden für 16 Zellen die Quotienten der Gleichspannungsmessungen $V_{J,\text{max}}/I_{M,\text{max}}$ und die Skalierungsfaktoren $1/(g_J A_M)$ aus Wechselspannungsmessungen für g_J bestimmt. Diese Werte wurden in Abbildung 32 gegeneinander aufgetragen. Nach Gleichung 9 ergeben die Punkte eine Gerade mit der Steigung g_{JM}/g_M . Allerdings wurde eine relativ hohe Streuung der Messpunkte beobachtet. In Abbildung 32 wurde daher zum Vergleich eine Gerade der Steigung 1 eingezeichnet, die bei einer Gleichverteilung der Kanäle in der Membran zu erwarten ist. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Punkte um diese Gerade herum streuen, so dass hier von $g_{JM}/g_M \approx 1$ ausgangen wurde. In Abschnitt 4.2.4 wird diskutiert, welche Faktoren die Streuung der Punkte verursacht haben können.

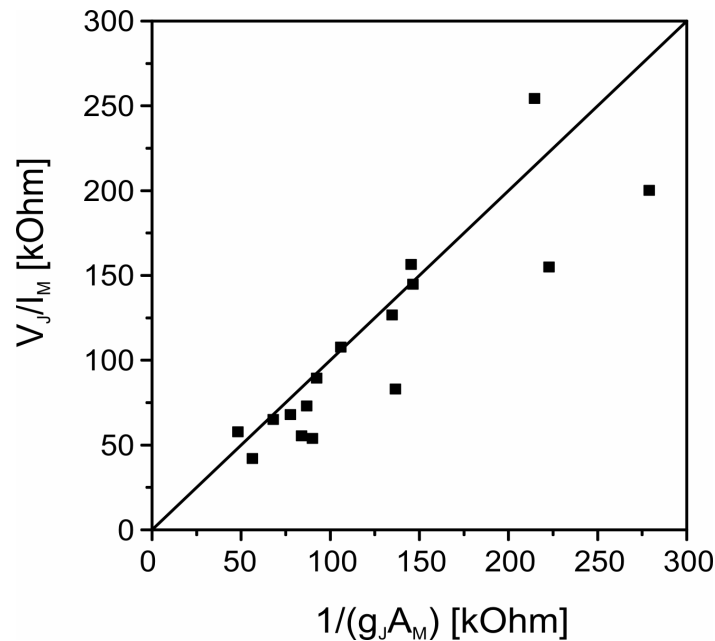


Abbildung 32: Auftragung des Quotienten V_J/I_M aus Gleichspannungsmessungen gegen den Skalierungsfaktor $1/(g_J A_M)$ aus Wechselspannungsmessungen. Eingezeichnet ist außerdem eine Gerade der Steigung 1, um die herum die Punkte streuen.

Aus den 16 Messungen wurde außerdem nach Gleichung 9 g_{JM}/g_M als Quotient $(V_{J,max}/I_{M,max})/(1/(g_J A_M))$ berechnet. Insgesamt wurde damit ein Mittelwert von g_{JM}/g_M von $0,9 \pm 0,2$ ermittelt. Somit wurde auch bei 16 gemessenen Zell-Chip-Kopplungen im Rahmen der Genauigkeit der Methode keine Anreicherung oder Verarmung der Rezeptoren in der adhären Membran beobachtet.

4.2.5. Diskussion der Wechselspannungsmessungen

Membrananreicherung

Anreicherung bestimmter Proteine in voneinander abgegrenzten Membrandomänen ist in Neuronen (Axonale Membran – Dendritische Membran) und Epithelzellen (Basolaterale Membran – Apikale Membran) ein aktiver Prozess, der von Signalen in der Struktur oder Aminosäuresequenz von Membranproteinen gesteuert wird.^{36,37} Die Anreicherung von Ionenkanälen in der adhären Plasmamembran könnte für ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis bei Transistormessungen genutzt werden. Die Proteinsortierung von ligandengesteuerten Ionenkanälen ist in der Epithelzelllinie MDCK für den $GABA_A$ -Rezeptor nachgewiesen worden.⁹ Auch bei fibroblastischen Zellen, wie die hier verwendeten HEK-Zellen, ist eine Anreicherung von Proteinen in der adhären Membran nicht ausgeschlossen.³⁸ Allerdings ist unklar, inwiefern hier die Anreicherung das Ergebnis einer

gerichteten Zielsteuerung sein kann, oder ob vielmehr die Bindung an extrazelluläre Matrixmoleküle im Adhäsionsbereich eine Akkumulierung verursacht.

Eine Akkumulierung oder Verarmung von 5HT_{3A}-Rezeptoren in der Adhäsionsmembran konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Die in Abbildung 32 dargestellten Messwerte streuen zwar z.T. erheblich, die Streuung bewegt sich allerdings um eine Gerade der Steigung 1, was auf eine Gleichverteilung der Kanäle in der Membran hindeutet. Auch der Mittelwert der Leitfähigkeitsquotienten g_{JM}/g_M von $0,9 \pm 0,2$ liegt fast bei 1 und zeigt trotz der Standardabweichung eine Gleichverteilung an. Zumindest aktive Proteinzielsteuerung in verschiedene, unterscheidbare Membrandomänen kann somit ausgeschlossen werden. In diesem Fall würde eine mögliche Anreicherung einen Faktor 10 übersteigen und nahezu für alle Kanäle gelten, wie dies in MDCK-Zellen der Fall ist.

Streuung von Spaltleitfähigkeit und Skalierungsfaktor

Die Leitfähigkeit g_J bzw. der als Kehrwert daraus resultierende Widerstand ist die Voraussetzung einer messbaren Spaltspannung V_J . g_J ist daher ein wichtiger Parameter der Zell-Chip-Kopplung. g_J und der resultierende Skalierungsfaktor $1/(A_M g_J)$ können als Maß für die Kopplungsstärke bzw. -effizienz des Zell-Chip-Kontaktes angesehen werden. Die Spaltleitfähigkeit g_J wurde mit Wechselspannungsmessungen bestimmt (Abschnitt 4.2.4). Der in der Beispielmessung ermittelte Wert von $g_J = 332 \text{ mS/cm}^2$ ist im beobachteten Wertebereich als relativ kleine Spaltleitfähigkeit anzusehen. Obwohl auch kleinere Werte gemessen wurden, lagen die meisten Werte für g_J höher als in der Beispielmessung. Insgesamt wurden Werte für g_J zwischen 280 mS/cm^2 und $1,4 \text{ S/cm}^2$ gemessen. Aus der Beispielmessung ergab sich ein Skalierungsfaktor von $215 \text{ k}\Omega$. Dieser Wert lag im oberen Bereich der gemessenen Werte, d.h. die Mehrzahl der gemessenen Skalierungsfaktoren wies auf eine schwächere Kopplung hin. Dies wird in Abbildung 32 deutlich, in der die Skalierungsfaktoren aufgetragen sind. Die Mehrzahl der ermittelten Messwerte liegt im Bereich zwischen 50 und $100 \text{ k}\Omega$, allerdings wurden auch $280 \text{ k}\Omega$ gemessen.

Vergleich mit Literaturwerten von Neuronen und HEK-Zellen

Zell-Transistor-Kopplungen wurden an Neuronen und verschiedenen HEK-Zelllinien bereits untersucht.^{2,3,7} Für Neuronen lag g_J dabei zwischen 600 und 1700 mS/cm^2 (Vassanelli et al., 1999).⁷ Dieser Bereich der Leitfähigkeiten liegt etwas höher als in dieser Arbeit. In einer Beispielmessung wurde bei einem Neuron eine Spaltleitfähigkeit von 1000 mS/cm^2 gemessen. Mit einer Membranfläche von $1100 \mu\text{m}^2$ ergab sich daraus ein Skalierungsfaktor von $90 \text{ k}\Omega$.

Dieser Wert stimmt gut mit den Skalierungsfaktoren in dieser Arbeit überein, die überwiegend zwischen 50 und 100 k Ω liegen.

HEK-Zellen wurden durch die Expression von sog. maxi-K-Kanälen an Transistoren gekoppelt (Straub et al., 2001).² In einer Messung wurde $g_J = 1,9 \text{ S/cm}^2$ ermittelt. Dieser Wert liegt über dem in dieser Arbeit ermittelten Bereich für g_J . Der Skalierungsfaktor wurde mit $15 \pm 8 \text{ k}\Omega$ angegeben. Dieser Wert erscheint niedrig im Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Kopplungswiderständen. Insgesamt lassen die Werte aus dieser Arbeit auf eine effektivere Zell-Chip-Kopplung schließen.

HEK-Zellen mit spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen wurden ebenfalls an Transistoren gekoppelt.³ Es wurden allerdings extrazelluläre Lösungen mit geringeren Ionenkonzentrationen verwendet. Dies diente der Verringerung der Spaltleitfähigkeit und führte zu höheren Spannungen und dadurch zu einer besseren Kopplung. Ein direkter Vergleich der Werte für g_J und $1/(g_J A_M)$ kann aufgrund der veränderten Zusammensetzung der Lösungen nicht durchgeführt werden. In Tabelle 3 sind die Werte aus diesem Abschnitt zusammen gefasst.

Tabelle 3: Literaturwerte für die Wechsellspannungsparameter g_J und $1/(g_J A_M)$.

g_J [mS/cm ²]	$1/(g_J A_M)$ [k Ω]	Zellen	Referenz
600-1700	90	Neuron	Vassanelli et al. (1999) ⁷
1900	15 ± 8	HEK	Straub et al. (2001) ²
280-1400	50-280	HEK	eigene

Ursachen der Variabilität

Die Streuung der Punkte in Abbildung 32 um eine Gerade der Steigung 1 bedeutet, dass die Quotienten $V_{J,\max}/I_{M,\max}$ aus den Gleichspannungsmessungen ähnliche Variabilitäten wie die Skalierungsfaktoren aufweisen. Die Wechsellspannungsmessungen zur Ermittlung von g_J und damit auch $1/(g_J A_M)$ sind dabei hinreichend genau: In den Abschnitt 4.2.4 wird deutlich, dass das Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend ist, in Abbildung 31 liegen alle Punkte auf einer Geraden durch den Ursprung. Auch die Proportionalität der Amplituden von V_J und I_M in Gleichspannungsmessungen wurde in dieser Arbeit dokumentiert (Abschnitt 4.2.3). In den bereits erwähnten Arbeiten mit Neuronen und HEK-Zellen mit spannungsabhängigen Kanälen wurden ebenfalls Streuungen in den Werten für g_J , $1/(g_J A_M)$ und $V_{J,\max}/I_{M,\max}$ beobachtet. Die Streuung ist somit eine Eigenschaft des Zell-Chip-Kontaktes.

Eine Untersuchung der Streuung in diesen Werten findet sich bei Schmidtner und Fromherz (2006).³ Der Geometriefaktor η trägt wesentlich zur Variabilität des Zell-Chip-Kontaktes bei

(Gleichung 3: $G_J = \eta \cdot d_J / \rho_J$): Die vollständige oder unvollständige Bedeckung des *Gates* durch die adhärerte Zelle hat demnach einen Einfluss auf die Variabilität, ebenso unterschiedliche Verhältnisse von adhärierter Membranfläche zu freier Membranfläche. Mögliche Schwankungen der Spalthöhe d_J können ein weiterer Grund für die Streuung sein.

4.3. Kopplungen ohne *Patch Clamp*

Zur Messung von elektrophysiologischen Eigenschaften von 5HT3A-Kanälen musste das Membranpotential als Triebkraft des Membranstromes konstant gehalten werden. In den Messungen zur Elektrophysiologie (Abschnitt 4.1) und in der Charakterisierung der Zell-Chip-Kopplung (Abschnitt 4.2) wurde dazu die *Patch Clamp*-Technik eingesetzt. Dadurch konnten Ströme von einigen Nanoampere über einen Zeitraum von einigen Sekunden erzeugt werden, die messbare Transistorsignale verursachten.

Bei einem Biosensor aus Transistoren und Zellen muss auf den Einsatz von *Patch Clamp*-Pipetten verzichtet werden, da das zeitaufwändige Kontaktieren von einzelnen Zellen die Vorteile des parallelen Auslesens mehrerer bedeckter Transistoren aufhebt. Wird das Membranpotential nicht mehr von einer Elektrode konstant gehalten, wird die Zelle nach der Öffnung der Kanäle durch einfließende Kationen depolarisiert und das Membranpotential als Triebkraft des Einstroms bricht zusammen.

Eine Abschätzung des Transistorsignals für Zell-Chip-Kopplungen ohne *voltage clamp* wurde vorgenommen und wird im nächsten Abschnitt beschrieben. Um dem Zerfall der Triebkraft des Signals entgegenzuwirken, wurden für weitere Messungen Zellen verwendet, die neben dem Serotonin-Rezeptor 5HT3A auch mit den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 transfiziert waren. Messungen mit diesen Zellen konnten dann ohne *Patch Clamp*-Pipette durchgeführt werden und als Abschluss des experimentellen Abschnittes dieser Arbeit vorgestellt.

4.3.1. Abschätzung des Signals ohne *voltage clamp*

Die Gleichung für die Spaltspannung $V_J(t)$

Für Transistorsignale von Zellen ohne *voltage clamp*, d.h. mit variablem Membranpotential, gelten Gleichung 1 und Gleichung 4 aus dem Ein-Kompartiment-Modell:

$$I_M = G_{FM}(V_M - V_0) + G_{JM}(V_M - V_J - V_0) + C_{FM} \frac{dV_M}{dt} + C_{JM} \frac{d}{dt}(V_M - V_J)$$

Gleichung 1

$$(c_{JM} + c_{Ox}) \frac{dV_J}{dt} = -g_J V_J + g_{JM}(V_M - V_J - V_0) + c_{JM} \frac{dV_M}{dt}$$

Gleichung 4

Aus beiden Gleichungen wurde eine Gleichung für $V_J(t)$ aufgestellt. Die entsprechenden Rechnungen sind im Anhang (Abschnitt E) enthalten, $V_J(t)$ lässt sich demnach abschätzen mit:

$$V_J(t) = -\frac{(1-\mu)}{(1+\beta\mu)} \cdot \frac{g_M}{g_J} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 69

Dabei ist μ das Verhältnis der spezifischen Leitfähigkeiten g_{JM}/g_{FM} , β ist das Flächenverhältnis A_{JM}/A_{FM} , g_M und g_J sind die spezifischen Leitfähigkeiten der Zellmembran bzw. des Spalts und V_M^0 und V_0^0 sind Membranpotential und Umkehrpotential bei $t=0$. $\tau_M = c_M/g_M$ ist die Zeitkonstante der Membrandepolarisierung. Der Term $(V_M^0 - V_0^0)$ bezeichnet die Triebkraft des Membranstroms, der zur Depolarisierung der Membran führt. Diese Triebkraft zerfällt mit einer e-Funktion mit der Zeitkonstante τ_M , bis das Umkehrpotential erreicht ist. Danach fließt kein Strom mehr über die Membran, bzw. durch den Spalt.

Spezifische Leitfähigkeiten und Anreicherung μ

Laut Gleichung 69 wird $V_J(t) = 0$ wenn das Verhältnis der spezifischen Leitfähigkeiten $\mu = g_{JM}/g_{FM} = 1$ ist. Damit eine Spaltspannung gemessen werden kann, müssen also die spezifischen Leitfähigkeiten der beiden Membrandomänen unterschiedlich sein, d.h. Kanäle müssen in einer Membrandomäne akkumuliert oder verarmt sein:

Die Zellmembran ist im Ruhezustand innen negativ geladen. An der Außenseite der Zellmembran liegen Kationen ihrer negativen Gegenladung in der Zelle gegenüber. Bei einer Öffnung der Kanäle fließen diese als lokale Ausgleichsströme in die Zelle und neutralisieren ihre Gegenladung, die Membran wird dadurch depolarisiert. Bei gleichverteilten Kanälen in freier und adhärirter Membran findet dieser Prozess über die gesamte Zelloberfläche statt, so dass kein Nettostrom durch den Spalt fließt, der eine Spaltspannung verursachen könnte.

Im Fall der 5HT3A-Kanäle in HEK-Zellen konnte keine ungleiche Verteilung der Kanäle festgestellt werden (s. Abschnitt 4.2.4) und entsprechend Gleichung 69 sollten daher keine Signale ohne *voltage clamp* bei HEK-5HT3A-Zellen erwartet werden.

Die verzögerte Öffnung der Kanäle in der adhärirten Membran verursacht allerdings eine ungleiche Verteilung von Kanälen im offenen Zustand zu unterschiedlichen Zeiten der Messung, obwohl die Rezeptoren homogen in der Plasmamembran verteilt sind. Diese zeitliche Ungleichverteilung könnte messbare Spaltspannungen erzeugen. μ ist allerdings für diesen Fall nicht bekannt und hängt von der Zeit ab.

Alternativ könnten andere Zelllinien verwendet werden, die Proteine in Membranbereichen akkumulieren können: In Abschnitt 4.2.5 wurden bereits Epithelzellen und die Sortierung von GABA_A-Rezeptoren erwähnt.

Simulation des Signalzerfalls

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass der Verteilungsfaktor μ unbekannt ist. Die Signalamplitude lässt sich mit Gleichung 69 daher nicht simulieren. Der Zerfall des zu erwartenden Signals hängt allerdings nur von der Zeitkonstante τ_M ab.

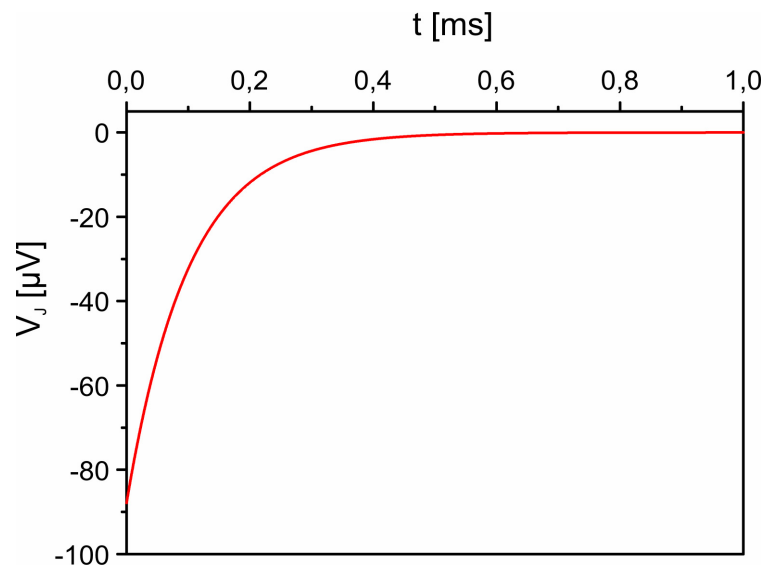


Abbildung 33: Abschätzung der Spaltspannung einer Zelle ohne *voltage clamp* nach Gleichung 69.

Um den Zerfall der Spaltspannung diskutieren zu können, wurde daher mit Gleichung 69 $V_J(t)$ von Zellen ohne *Patch Clamp* berechnet, für μ wurde dabei 1,1 eingesetzt. Die Spaltspannung wurde über eine Millisekunde berechnet, Abbildung 33 zeigt den Verlauf. Die Amplitude des Signals betrug $-90 \mu\text{V}$, ist wegen des unbekanntes Faktors μ jedoch nicht aussagekräftig. Das Signal zerfiel mit der Zeitkonstante $\tau_M = c_M/g_M = 100 \mu\text{s}$ (s.u.), so dass nach $200 \mu\text{s}$ noch etwa $-10 \mu\text{V}$ im Spalt anlagen, und V_J nach $600 \mu\text{s}$ fast abgeklungen war.

Als Vereinfachung wurde für die Simulation neben $\mu = 1,1$ angenommen, dass die Leitfähigkeit g_M konstant war, d.h. dass die Kanäle ab $t = 0$ in der gesamten Membran ohne Berücksichtigung der Kanaldynamik geöffnet vorlagen. In den nächsten Abschnitten werden die Probleme des schnellen Zerfalls von V_J in Zusammenhang mit der Kanaldynamik diskutiert. Die spezifische Leitfähigkeit der gesamten Membran g_M und die Leitfähigkeit des Spalts g_J wurden entsprechend einiger typischer Messwerte aus dieser Arbeit abgeschätzt: $g_M = I_M/V_M/A_M \approx 10 \text{ nA}/100 \text{ mV}/1000 \mu\text{m}^2 \approx 10 \text{ mS}/\text{cm}^2$. g_J lag in den meisten Messungen

zwischen 300 und 1000 mS/cm², hier wurde $g_j \approx 500$ mS/cm² eingesetzt. Die spezifische Membrankapazität betrug $c_M = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (s. Abschnitt 2.1.2), das Umkehrpotential $V_0^0 \approx -4$ mV (gemessen als E_{rev}) und für das Ruhemembranpotential wurde $V_M^0 = -60$ mV eingesetzt. Für das Flächenverhältnis wurde wie in Abschnitt 4.2.2 $\beta = 0,25$ angenommen.³¹

Depolarisierung der Zelle

Im Vergleich zur Kanalaktivierung (8 ms für die 5HT3A-Kanäle) ist die Zeitkonstante des Signalzerfalls τ_M mit 100 μs schnell. Eine Öffnung der Kanäle führt daher unmittelbar zur Depolarisierung der Zelle und somit zum Zerfall der Triebkraft des weiteren Ioneneinstroms. Die Kanäle in der adhären Membran sind durch die verzögerte Öffnung für die Zeitspanne der Depolarisierung, die nach der Simulation nur wenige hundert Mikrosekunden dauert, geschlossen. Die Zelle wird somit durch die Kanäle der freien Membran depolarisiert, so dass die Triebkraft für einen weiteren Einstrom von Ionen zerfällt, bevor ein Strom in den Spalt fließen kann. Die Verzögerung der Kanäle in der adhären Membran verursacht somit zwar eine zeitlich inhomogene Verteilung offener Kanäle als Voraussetzung für eine Spaltspannung nach Gleichung 69. Gleichzeitig verhindert aber der Einstrom durch die schnelleren Kanäle der freien Membran den Stromfluss in den Spalt durch die Depolarisierung der Zelle, so dass keine Spaltspannung entstehen kann. Abbildung 34 zeigt schematisch den Mechanismus, der das Entstehen der Spaltspannung V_j verhindert.

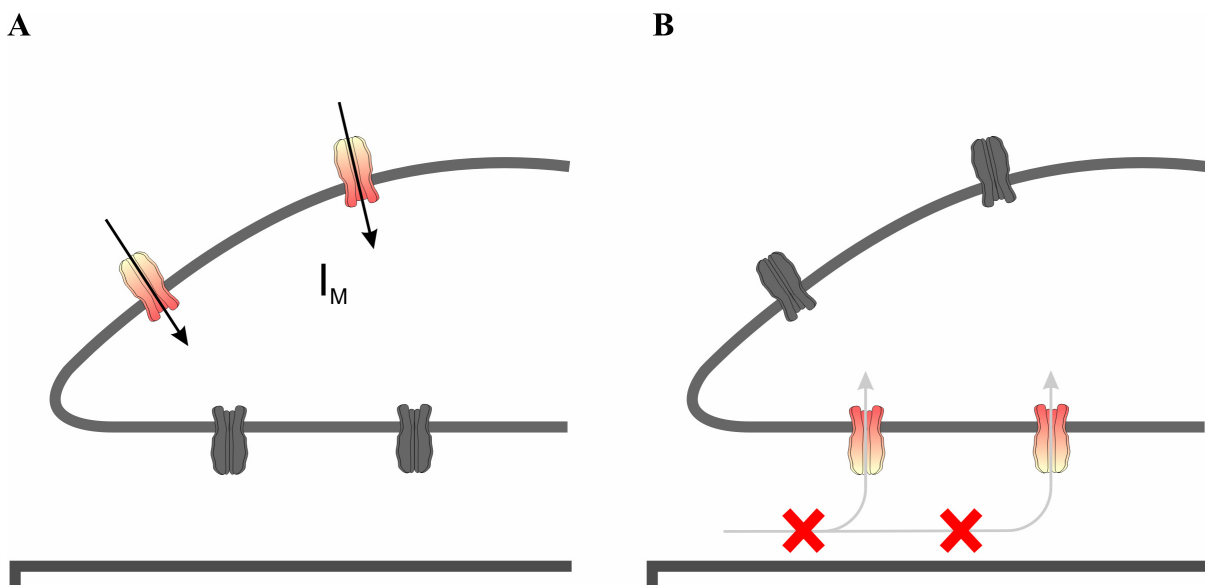


Abbildung 34: (A) Die oberen Kanäle öffnen sich schneller als die unteren, der Einstrom I_M depolarisiert die Zelle. (B) Dadurch ist keine Triebkraft mehr für einen Strom durch die unteren Kanäle vorhanden, die später öffnen. Eine Spaltspannung kann nicht entstehen.

Konsequenz für HEK-5HT3A-Zellen

Die vorangegangenen Abschnitte zeigen, dass ohne *Patch Clamp* keine messbaren Signale mit den verwendeten HEK-5HT3A-Zellen erzeugt werden können. Um Spaltspannungen mit 5HT3A-Rezeptoren zu erzeugen, muss die vorzeitige Depolarisierung der Zelle durch die Kanäle der freien Membran verhindert werden, da sonst kein messbarer Strom durch den Spalt fließt. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist die vollständige Sortierung der Kanäle in die adhärenzte Membran z.B. in MDCK-Zellen mittels einer Signalsequenz. Neben der Sortierung von Kanälen wird im nächsten Abschnitt eine Methode zur Stabilisierung des Membranpotentials gezeigt, die die Messung von V_J bei Zellen ohne *Patch Clamp* ermöglicht.

4.3.2. Doppelt transfizierte Zellen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Zelle durch die schnelleren Kanäle in der freien Membran depolarisiert wird, bevor die Kanäle in der adhärenzten Membran öffnen. Um dieses Problem zu lösen, wurden für die Kopplung ohne *Patch Clamp* doppelt transfizierte Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren neben dem Serotonin-Rezeptor 5HT3A auch den Kaliumkanal Kv1.3. In diesem Abschnitt wird das Konzept kurz dargestellt, bevor zum Abschluss dieser Arbeit die Ergebnisse mit HEK-5HT3A-Kv1.3-Zellen gezeigt werden.

Einfluss von Kv1.3 auf das Membranpotential.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen sich bei einer Depolarisierung der Zelle wenn ein bestimmtes Membranpotential überschritten wird. Gemäß des Nernstpotentials für Kalium führt dies unter physiologischen Bedingungen zu einem Kalium-Ausstrom, der der Depolarisierung entgegen wirkt. Kaliumkanäle sind daher in der Lage, das negative Membranpotential zu stabilisieren, wenn ein depolarisierender Kationeneinstrom auftritt. Dadurch kann der Einstrom von Kationen länger aufrecht erhalten werden.

Um in der Zelle die Depolarisierung so lange zu verhindern, bis die 5HT3A-Kanäle in der adhärenzten Membran öffnen, wurden in dieser Arbeit die 5HT3A-Zellen zusätzlich mit dem Kaliumkanal Kv1.3 transfiziert. Im Anhang (Abschnitt A) wurde auf Kv1.3-Kanäle und deren Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphocyten näher eingegangen. Zwischen der physiologischen Funktion von Kv1.3 und der Funktion in der Zell-Chip-Kopplung ohne *Patch Clamp* besteht folgender Zusammenhang: In T-Lymphocyten wird der Kv1.3-Kanal exprimiert, um das Membranpotential während eines depolarisierenden Ca^{2+} -Einstroms zu

stabilisieren. Dadurch kann der Ca^{2+} -Einstrom länger aufrecht erhalten werden, was schließlich zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen führt.

Depolarisierung bewirkt die Öffnung von Kv1.3

Die verzögerte Öffnung der unteren Kanäle verursacht bei doppelt transfizierten Zellen die Entstehung einer biphasischen Spaltspannung nach dem folgenden Mechanismus:

Die 5HT3A-Kanäle in der adhären Membran öffnen durch die Diffusion von Serotonin im Spalt langsamer und werden für die erste Phase des Signals als geschlossen betrachtet. Die Kanäle in der freien Membran öffnen schneller und führen zu einem Einstrom von Kationen. Dieser Einstrom durch die freie Membran erzeugt keine Spaltspannung, da er durch die Kanäle der freien Membran stattfindet. Der Kationen-Einstrom durch die freie Membran wirkt allerdings depolarisierend auf die gesamte Zellmembran (Umkehrpotential ≈ -4 mV, Membranpotential im Ruhezustand ≈ -60 mV). Die Kv1.3-Kanäle öffnen ab einem Membranpotential von -50 mV. Die Öffnung der Kv1.3-Kanäle findet sowohl in der freien Membran als auch in der adhären Membran statt, da die Depolarisierung auf die gesamte Zellmembran wirkt. Daher setzt in der ersten Phase ein Ausstrom von Kalium über die gesamte Zellmembran - und somit auch in den Spalt - ein. Abbildung 35A zeigt schematisch die Ströme in dieser ersten Phase bei doppelt transfizierten Zellen. Die Kv1.3-Kanäle und der K^+ -Ausstrom in den Spalt sind in Abbildung 35A blau hervorgehoben. Der K^+ -Strom in den Spalt führt zu einer positiven Spannung bzw. einer steigenden Phase in der Messung.

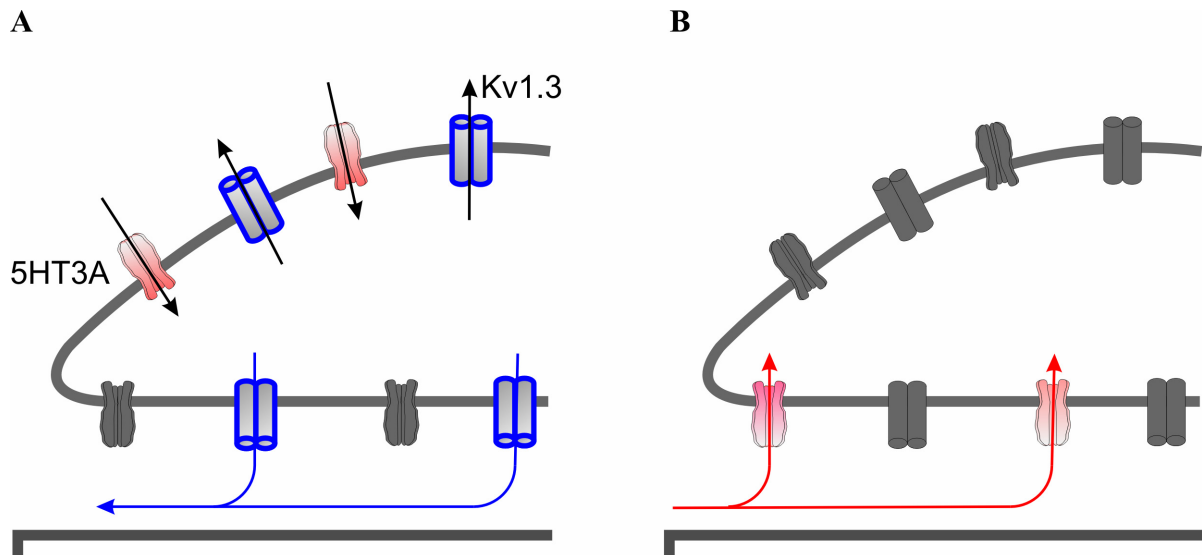


Abbildung 35: Schematisches Konzept von doppelt transfizierten Zellen. (A) In der ersten Phase öffnen die 5HT3A-Kanäle der freien Membran (rot). Das Membranpotential in der Zelle steigt, bis die Kv1.3-Kanäle (blau) öffnen. Kalium strömt in den Spalt und erzeugt eine positive Spaltspannung. (B) Wenn die 5HT3A-Kanäle der freien Membran schließen, repolarisieren die Kv1.3-Kanäle die Zelle. Damit ist eine Triebkraft für den verzögerten Einstrom durch die 5HT3A-Kanäle der adhären Membran vorhanden (rot), der eine negative Spaltspannung erzeugt.

Öffnen der 5HT3A-Kanäle in der unteren Membran

Der Ausstrom von Kalium wirkt dem Einstrom durch die 5HT3A-Kanäle entgegen. Nach der simultanen Messung von V_J und I_M in Abschnitt 4.2.1 schließen die 5HT3A-Kanäle der freien Membran, bevor die Kanäle der adhären Membran in den offenen Zustand übergehen. Nun repolarisiert der K^+ -Ausstrom die Zelle. Erreicht das Membranpotential wieder einen negativeren Wert als die Aktivierungsschwelle der Kv1.3-Kanäle von -50 mV schließen auch die Kv1.3-Kanäle. Wenn dann die 5HT3A-Kanäle in der adhären Membran öffnen, liegt in der Zelle wieder ein negatives Membranpotential vor, das als Triebkraft für einen Kationen-Einstrom wirkt. Somit fließt ein Strom durch den Spalt und die adhären Membran in die Zelle, was zu einer negativen Spaltspannung führt. In Abbildung 35A ist schematisch der Strom im Spalt für diese zweite Phase des Signals dargestellt.

Die repolarisierende Wirkung von Kv1.3 wurde in Zusammenhang mit der T-Zellaktivierung u.a. 2005 von György Panyi diskutiert.³⁹ Die Zeitkonstanten für Aktivierung und Inaktivierung, die Abhängigkeit der Aktivierung von der Depolarisierung und die Öffnung der Kanäle bei Membranpotentialen knapp oberhalb des Ruhemembranpotentials sind nach Panyi besonders für die repolarisierende Wirkung von Kv1.3 in T-Zellen geeignet. Panyi fasst die

biophysikalischen Eigenschaften von Kv1.3 damit zusammen, dass das Membranpotential durch die Expression dieser Kanäle auf einen Wert knapp negativ der Aktivierungsschwelle der Kv1.3-Kanäle nahezu geklemmt wird, wenn auch nur für kurze Zeit. Von Panyi wurde die Expression von Kv1.3 in T-Zellen als physiologischer „Ersatz“ für *voltage clamp* angesprochen.

4.3.3. Messungen mit HEK-5HT3A-Kv1.3-Zellen

Zellen, die den Serotonin-Rezeptor 5HT3A exprimieren, wurden auf Chips kultiviert und ohne *voltage clamp* mit 100 μ M Serotonin stimuliert. Es konnten keine messbaren Spaltspannungen gegenüber dem Rauschen der Transistoren beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies konnte nach der Abschätzung von V_J bei den einfach transfizierten HEK-5HT3A-Zellen auch nicht erwartet werden.

Eine Zelllinie, die mit dem 5HT3A-Rezeptor transfiziert war, wurde zusätzlich mit dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 transfiziert. Positive Zellen wurden durch Kotransfektion mit EGFP und Fluoreszenzmikroskopie identifiziert.

Signalform und Zeitkonstanten

Doppelt transfizierte Zellen wurde ohne *voltage clamp* mit 100 μ M Serotonin stimuliert. In Abbildung 36 ist eine Beispielmessung der Spaltspannung V_J während der Serotonin-Applikation dargestellt (schwarzer Balken). Ein biphasisches Signal von mehreren hundert Mikrovolt ist zu erkennen, welches durch die Applikation von Serotonin ausgelöst wurde. Auf einen relativ schnellen Anstieg des Signals folgte eine negative zweite Phase und ein langsamer Zerfall des Signals.

Als Negativkontrolle wurden Zellen gemessen, die allein den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 exprimierten. Bei diesen Zellen konnte kein Transistorsignal gemessen werden (nicht gezeigt).

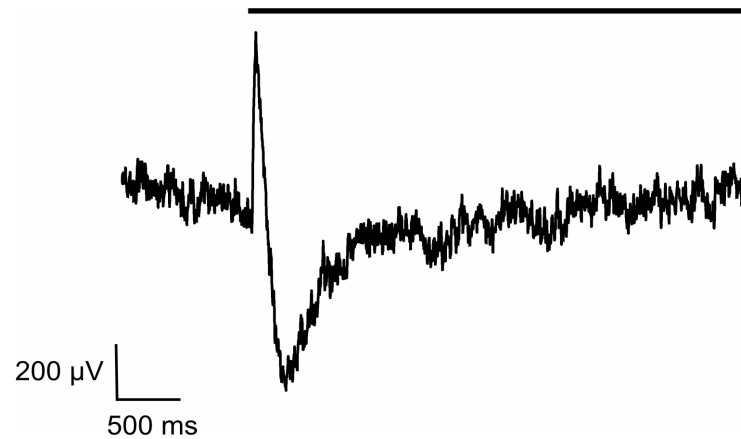


Abbildung 36: Spaltspannung V_j einer mit 5HT3A und Kv1.3 doppelt transfizierten Zelle während der Applikation von 100 μM Serotonin ohne *voltage clamp*.

Die positive Amplitude erreichte in der Beispielmessung ihren Maximalwert innerhalb von 30 ms, was im Bereich des verzögerten Öffnens der Kanäle in der adhärten Membran liegt. Die Zeit zwischen 10% und 90% des Signals betrug 22-24 ms. Mit $t_{10-90\%} \approx 2,2\tau$ folgt eine Zeitkonstante für den Signalanstieg von etwa 10 ms, was mit der Zeitkonstanten der Kanalöffnung von 5HT3A (8 ms) übereinstimmt. Der Kaliumausstrom, der die positive Phase verursacht, folgte demnach der Depolarisierung der Zelle, die mit der Zeitkonstante der Aktivierung der 5HT3A-Kanäle abläuft. Die Zeitkonstante der 5HT3A-Kanäle dominiert für den Anstieg der ersten Phase des Signals als langsamste Zeitkonstante im System. Danach erfolgt die zweite Phase des Signals durch das Öffnen der Kanäle in der adhärten Membran.

Der langsame Zerfall der negativen Amplitude wurde in dieser Messung mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen gefittet, was die Zeitkonstanten $\tau_1 = 210$ ms und $\tau_2 = 1300$ ms ergab. Der erste Wert lag damit im Bereich der ersten Zeitkonstante der Desensitivierung des 5HT3A-Rezeptors (180 ms). Eine statistische Auswertung der Zeitkonstanten wurde erschwert, da zu wenige Messungen vorlagen, bei denen die Zeitkonstanten ausgewertet werden konnten. Die ermittelten Zeitkonstanten und auch die Art des exponentiellen Zerfalls wichen außerdem voneinander ab: Bei einer weiteren Messung betrug die Zeitkonstanten $\tau_1 = 370$ ms und $\tau_2 = 3600$ ms, während eine dritte Messung nur mit einem einfach exponentiellen Zerfall beschrieben werden konnte. Die Zeitkonstante betrug hier $\tau = 160$ ms. Wegen den uneinheitlichen Messungen der Zeitkonstanten können hier keine Aussagen über der Dynamiken der beteiligten Kanäle während des Zerfalls der negativen Phase gemacht

werden. Es kann daher nicht davon ausgegangen werden dass der Zerfall des Signals allein auf den Kanaleigenschaften des 5HT3A-Rezeptors, wie z.B. der Desensitivierung, beruht. Auch die Dynamik der Kv1.3-Kanäle und die Ionenkonzentrationen in der Zelle und im Spalt würden das Abklingen des Signals beeinflussen, wie schon bei der dynamischen Kopplung gezeigt wurde.

Tropisetron

Der Einfluss des 5HT3A-spezifischen Antagonisten Tropisetron auf das Transistorsignal von 5HT3A-Kv1.3-transfizierten Zellen wurde getestet, um die Beteiligung der 5HT3A-Rezeptoren pharmakologisch nachzuweisen. Die Zellen wurden wie im vorangegangenen Abschnitt mit Serotonin stimuliert. Eine weitere Messung wurde danach in Gegenwart von 1 μM Tropisetron durchgeführt (s. auch Abschnitt 4.1.1). Abbildung 37A zeigt eine Messung vor der Zugabe von Tropisetron, in Abbildung 37B ist die zweite Messung an derselben Zelle mit Tropisetron dargestellt (oberer Balken: Tropisetron, unterer Balken: Serotonin). Das Signal wurde in Gegenwart von Tropisetron blockiert.

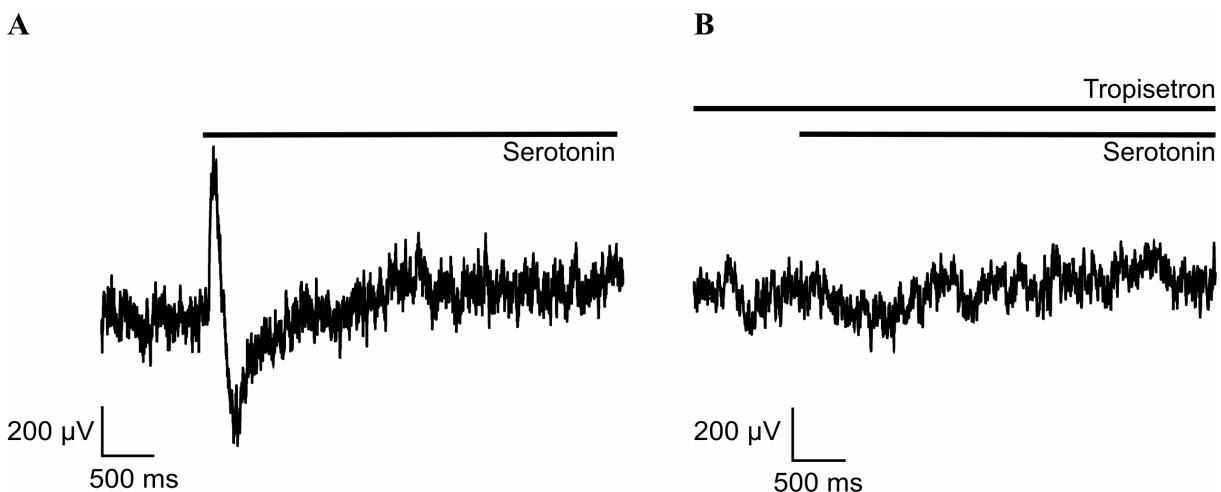


Abbildung 37: A Spaltspannung einer 5HT3A-Kv1.3-transfizierten Zelle während der Applikation von 100 μM Serotonin (schwarzer Balken). B Messung an derselben Zelle in Gegenwart von 1 μM Tropisetron (oberer Balken: Tropisetron, unterer Balken: Serotonin).

Die Blockade des Signals mit Tropisetron ist das Basisexperiment für eine mögliche *Screening*-Anwendung des Systems für 5HT3A-Antagonisten.

Um die Kreuzreaktivität von Tropisetron mit Kv1.3 auszuschließen, wurden Zellen, die nur Kv1.3-Kanäle exprimierten unter *voltage clamp* gemessen. Während der Messung wurde 1 μM Tropisetron in die Badlösung gegeben. Tropisetron hatte keinen Einfluss auf die Kanalöffnung und den Strom durch die Kv1.3-Kanäle (nicht gezeigt).

CPBG

Doppelt transfizierte Zellen, die auf Serotonin mit einem biphasischen Signal reagierten, wurden mit dem 5HT3A-Agonisten CPBG stimuliert (s. auch Abschnitt 4.1.1). Eine Beispielmessung von V_J während der Stimulation mit 100 μM Serotonin ist in Abbildung 38A dargestellt. Abbildung 38B zeigt eine Messung an derselben Zelle während der Stimulation mit 100 μM CPBG.

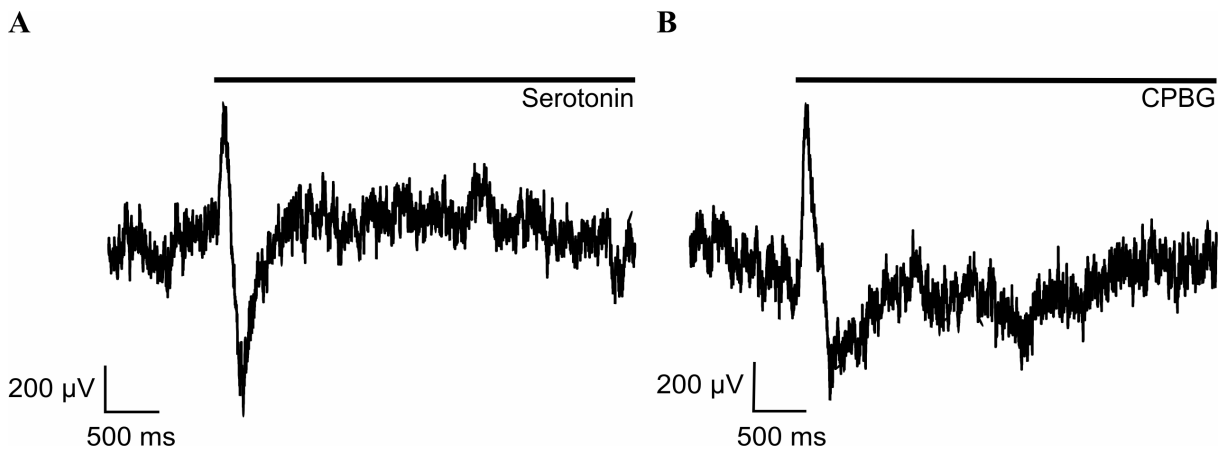


Abbildung 38: A Spaltspannung einer Kv1.3-5HT3A-transfizierten Zelle, stimuliert mit 100 μM Serotonin (schwarzer Balken). B Spaltspannung derselben Zelle bei Stimulation mit 100 μM CPBG (schwarzer Balken).

Auch mit dem Agonisten CPBG konnte ein biphasisches Signal von mehreren hundert Mikrovolt gemessen werden.

Zusammenfassung der Messungen

Zellen, die mit 5HT3A und Kv1.3 transfiziert wurden, erzeugten ohne *voltage clamp* bei Stimulation mit Serotonin messbare Transistorsignale. Stimulation mit dem 5HT3A-Agonisten CPBG erzeugte ebenfalls messbare Spaltspannungen. Diese Signale konnten durch den spezifischen 5HT3A-Antagonisten Tropisetron blockiert werden. Die Experimente beweisen, dass die Transistorsignale vom 5HT3A-Rezeptor abhängen. Der Anteil des Kv1.3-Kanals am Signal konnte noch nicht mit spezifischen Antagonisten nachgewiesen werden, da der verwendete Kv1.3-Antagonist Margatoxin ebenfalls den Strom durch den Serotonin-Rezeptor blockierte (nicht gezeigt). Negativkontrollen mit HEK-Zellen, die nur mit Kv1.3 transfiziert waren erzeugten jedoch keine Signale mit Serotonin. Die durchgeführten Messungen reichen nicht aus, um das System vollständig zu charakterisieren. Die Experimente im vorangegangenen Abschnitt beweisen aber, dass Transistormessungen von serotonin-abhängigen Signalen ohne *voltage-clamp* möglich sind, wenn doppelt transfizierte

Zellen verwendet werden. Wegen den uneinheitlichen Messungen der Zeitkonstanten können hier keine Aussagen über der Dynamiken der beteiligten Kanäle gemacht werden. Der Zerfall des Signals nach der zweiten Phase ist noch nicht angesprochen worden. Es kann nicht davon ausgegangen werden das der Zerfall des Signals allein auf den Kanaleigenschaften des 5HT3A-Rezeptors, wie z.B. der Desensitivierung, beruht. Auch die Dynamik der Kv1.3-Kanäle und die Ionenkonzentrationen in der Zelle und im Spalt würden das Abklingen des Signals beeinflussen, wie schon bei der dynamischen Kopplung gezeigt wurde.

Ausbeute

Im Vergleich zum Zell-Chip-*Interfacing* unter *voltage clamp* war die Ausbeute an Kopplungen bei doppelt transfizierten Zellen geringer. Bei den verwendeten Zellen wurde der Kv1.3-Kanal stabil exprimiert. Vor den Experimenten wurden die Zellen zusätzlich transient mit dem 5HT3A-Rezeptor transfiziert. Die dabei erreichte Effizienz ließ sich durch die Cotransfektion von EGFP abschätzen und erreichte meist etwa 50 %. Es lagen dann pro Chip 1-2 doppelt transfizierte Zellen auf Transistoren. Von diesen Zellen erzeugten dann allerdings lediglich etwa 20 % der Zellen Signale, was zu einer geringen Anzahl an Messungen führte. Mögliche Ursachen für die geringe Ausbeute an Kopplungen bei doppelt transfizierten Zellen sollen kurz angesprochen werden.

Die Triebkraft des Stroms in Experimenten mit doppelt transfizierten Zellen ist kleiner als in Experimenten unter *Patch Clamp*-Bedingungen mit -120 mV Membranpotential. In Abschnitt 4.2.5 wurde auf die Variabilität von g_j und die Abhängigkeit vom Geometriefaktor η hingewiesen. In Experimenten ohne *Patch Clamp* ist aufgrund der geringeren Triebkraft eine Kopplung mit einer geringen Spaltleitfähigkeit g_j wichtig, damit eine Spaltspannung gemessen werden kann. Vermutlich ist dies nur bei wenigen Zell-Chip-Kopplungen der Fall, was mit der Variabilität von g_j erklärt werden kann.

Molekularbiologische und Zellbiologische Effekte könnten die Ausbeute an Messungen ebenfalls beeinflussen: Bei den hier eingesetzten molekulargenetischen Methoden konnte die Expression von 5HT3A nach der Transfektion nicht gesteuert werden. Der CMV-Promotor auf dem Plasmid verursacht eine hohe Überexpression. Möglicherweise müssen aber beide Kanäle in einem bestimmten Mengenverhältnis zueinander vorliegen, um ein biphasisches Signal zu erzeugen.

Der metabolische Stress der Zelle (Verbrauch der Ressourcen während der Proteinbiosynthese), der bei der Überexpression von zwei Proteinen (mit EGFP: drei Proteine) auftritt, könnte eventuell groß genug sein, um die ausreichende Expression von

einem der beiden nötigen Kanäle zu behindern. Nur eine geringe Anzahl sehr gesunder oder „fitter“ Zellen würde dann ein Transistorsignal erzeugen. In diesem Fall könnten möglicherweise nährstoffreichere Medien für die Zellkultur, wie sie schon bei HEK-Zellen mit Natriumkanälen verwendet wurden, bessere Ausbeute liefern.³

Bei Überexpression von Kv1.3 und 5HT3A könnte auch eine gegenseitige Beeinträchtigung während der Prozessierung im Endoplasmatischen Reticulum stattfinden.

Um diese zellbiologischen Probleme in weiteren Experimenten umgehen zu können, sollten doppelt stabile Zellen hergestellt werden, die auf die Expression beider Kanäle und das gewünschte biphasische Signal selektiert sind.

4.3.4. *Screening* nach 5HT3A- und Kv1.3-Liganden

Das Signal ohne *Patch Clamp* beruht sowohl auf 5HT3A- als auch auf Kv1.3-Kanälen. Sowohl die Transfektion mit 5HT3A als auch mit Kv1.3 ist für das Signal notwendig. Die Blockierung des Signals mit Antagonisten (Abschnitt 4.3.3) ist das Basisexperiment für das *Screening* nach Kanalblockern für 5HT3A mit einem hybriden Zell-Chip-Biosensor. Ein Verschwinden des Signals könnte mit dem vorgeschlagenen Mechanismus allerdings auch durch die Blockade der Kv1.3-Kanäle verursacht werden. Ohne den K^+ -Ausstrom würde die Zelle durch den 5HT3A-Kanal schnell depolarisiert werden, Transistormessungen wären nicht möglich. Ein entsprechendes Experiment konnte in dieser Arbeit aufgrund der unzureichenden Selektivität des verwendeten Margatoxins für Kv1.3 nicht gezeigt werden. Beim *Screening* nach Antagonisten für 5HT3A würde sich daraus aber scheinbar der Nachteil ergeben, dass in anschließenden *Patch Clamp*-Experimenten die Bindung des vermeintlichen 5HT3A-Liganden an den Kv1.3-Kanal ausgeschlossen werden müsste.

Dieser scheinbare Nachteil wird allerdings aufgehoben durch die erweiterte Einsetzbarkeit des Systems: Da Kv1.3-Kanäle für das Signal nötig sind, könnte mit diesem System ebenfalls nach Kv1.3-Antagonisten gesucht werden. Wegen der herausgehobenen Stellung während der T-Zell-Aktivierung und damit einhergehender Störungen wie Transplantatabstoßungen oder Autoimmunerkrankungen ist Kv1.3 als *Target* für pharmakologisches *Screening* interessant geworden.³⁹

Allgemein eignet sich das hier implementierte System zur Untersuchung einer Vielzahl von spannungsabhängigen und liganden-gesteuerten Ionenkanälen, die bisher nur in zeitaufwendigen *Patch Clamp*-Experimenten geöffnet und blockiert werden konnten.

5. Ausblick

Für die Entwicklung eines Biosensors sind doppelt transfizierte Zellen geeignet, da für Messungen an diesen Zellen keine *Patch*-Pipette mehr benötigt wird. In dieser Arbeit wurden grundlegende Experimente hierzu durchgeführt. Zur Aufklärung des Mechanismus der Zell-Chip-Kopplung, die zu dem biphasischen Signalverlauf führt, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Besonders Messungen im *current clamp*-Modus sind hierfür nötig, da so der Verlauf des Membranpotentials während des Membranstroms gemessen werden kann. Außerdem müssen Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit der Signale durchgeführt werden.

Weiterentwicklung zum Sensorprototyp

Zur Entwicklung eines zell-basierten Biosensors entsprechend des in der Einleitung vorgestellten Konzepts, müssen Transistorsignale von vielen doppelt transfizierten Zellen parallel aufgezeichnet und ausgewertet werden. Die für eine aussagekräftige Statistik nötige Zahl an Zell-Chip-Kopplungen würde dann mit einer simultanen Stimulation vieler Zellen erreicht. Dafür müssen Zellkultur, Stimulation und *Recording* auf Chips mit einer großen Anzahl an Transistoren durchgeführt werden. *Multi-Transistor-Arrays* (MTA) mit über 16000 Transistoren auf 1 mm² Oberfläche sind bereits in biologischen bzw. neurologischen Fragestellungen angewendet worden.⁴⁰ Der Lösungswechsel im Millisekundenbereich ist Voraussetzung für die Messung von liganden-gesteuerten Ionenkanälen. Auf einer Chipoberfläche von 1 mm² ist diese schnelle Ligandenapplikation dabei ein Problem, was noch nicht gelöst ist. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten *Theta-Tube* ist nur die Stimulation einzelner Zellen möglich.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Um die schnelle Ligandenapplikation zu umgehen und die Anwendbarkeit des Zell-Chip-Systems auf andere Rezeptorklassen zu erweitern, können G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) verwendet werden. GPCR verfügen nicht über einen Ionenkanal und die Signaltransduktion findet langsamer statt, als bei liganden-gesteuerten Ionenkanälen. Civelli et al. haben HEK-Zellen mit GPCR und CNG-Kanälen (*cyclic nucleotide gated*) cotransfiziert.⁴¹ CNG-Kanäle öffnen sich bei Bindung von cAMP oder cGMP an intrazelluläre Domänen des Kanals und leiten unselektiv Kationen. Die Aktivierung der Rezeptoren verursachte bei Civelli et al. eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels,

wodurch die CNG-Kanäle geöffnet wurden. Einströmendes Ca^{2+} wurde dann optisch durch *Calcium-Imaging* nachgewiesen. Somit genügte die endogen in HEK-Zellen vorhandene Enzymkaskade zur Herstellung von cAMP für die Detektion des Ca^{2+} -Signals. Lediglich der Rezeptor als Startpunkt und die CNG-Kanäle als Endpunkt der Kaskade mussten in HEK-Zellen rekombinant exprimiert werden.

Dieses System könnte für Zell-Chip-Kopplungen genutzt werden, wenn auch hier der depolarisierende Einstrom durch einen repolarisierenden Ausstrom (z.B. durch Kv1.3) ausreichend lange aufrecht erhalten werden kann. In diesem Fall wäre die Rezeptorkomponente vom Ionenstrom entkoppelt und somit fast beliebig austauschbar. Eine große Anzahl GPCR könnte dann für Zell-Chip-Assays verwendet werden.

Neben GPCR und CNG-Kanälen muss dafür ein weiterer Ionenkanal wie z.B. Kv1.3 von der Zelle exprimiert werden. Die Transfektion von drei rekombinanten Proteinen könnte durch den Einsatz von Vektoren mit sog. *IRES*-Sequenzen (*Internal Ribosome Entry Sites*) erleichtert werden. Mit diesen Vektoren können Zellen simultan mit zwei cDNAs auf einem Plasmid transfiziert werden.⁴²

6. Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen zu Volumen
(w/v)	Gewicht zu Volumen
AMP	Ampicillin
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i>
CPBG	1-(m-Chlorophenyl)biguanid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP, ddNTP	Desoxyribonucleotide, Didesoxyribonucleotide (jeweils Triphosphate)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(b-Aminoethylether)-N'N'N'N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EZM	extrazelluläre Matrix
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> , und Mitarbeiter
FET	Feld-Effekt-Transistor
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
LB	Luria Bertani
LSM	Laserscanmikroskop
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
min.	Minute(n)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-RNA
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
sog.	sogenannt
std.	Stunde(n)

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
UTR	<i>untranslated region</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Anhang

A Biochemischer Hintergrund

Serotonin

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen wird - meist neben anderen Aufgaben – vom Organismus auch als Neurotransmitter verwendet. Zu den Neurotransmittern gehören Acetylcholin, biogene Amine, Aminosäuren, Neuropeptide und Nucleotide.^{43,44}

Serotonin ist ein biogenes Amin

Biogene Amine werden im Stoffwechsel aus Aminosäuren durch Decarboxylierung synthetisiert. Synthese, Speicherung, Recycling und Abbau jedes dieser Amine beruht auf einer definierten Enzym- und Proteinausstattung im entsprechenden Neuron.⁴⁵ Im sympathischen und parasympathischen Nervensystem enthalten fast alle Neurone biogene Amine als Neurotransmitter, während sie im sensorischen Nervensystem nahezu vollständig fehlen. Hier übernehmen Neuropeptide und Glutamat die synaptische Transmission. Im Zentralnervensystem (ZNS) können bestimmte Regionen ausgemacht werden, in denen Neurone gruppiert sind, die einzelne biogene Amine als Transmitter verwenden.⁴⁶

Ein biogenes Amin mit Transmitterfunktion ist z.B. Histamin, das aus Histidin gewonnen wird. Die wohl bekanntesten biogenen Amine, die als Neurotransmitter verwendet werden, sind Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, die unter dem Begriff Katecholamine zusammengefasst werden. Alle Katecholamine werden aus der aromatischen Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Dihydroxytyrosin als Zwischenprodukt der Synthese wird als Katecholkern bezeichnet.

Ebenfalls aus einer aromatischen Aminosäure wird Serotonin oder auch 5-Hydroxytryptamin hergestellt.

Synthese, Speicherung in synaptischen Vesikeln

Die Synthese von Serotonin ist eine zweistufige Reaktion, Ausgangspunkt der Synthese ist Tryptophan (Abbildung 39).⁴⁴

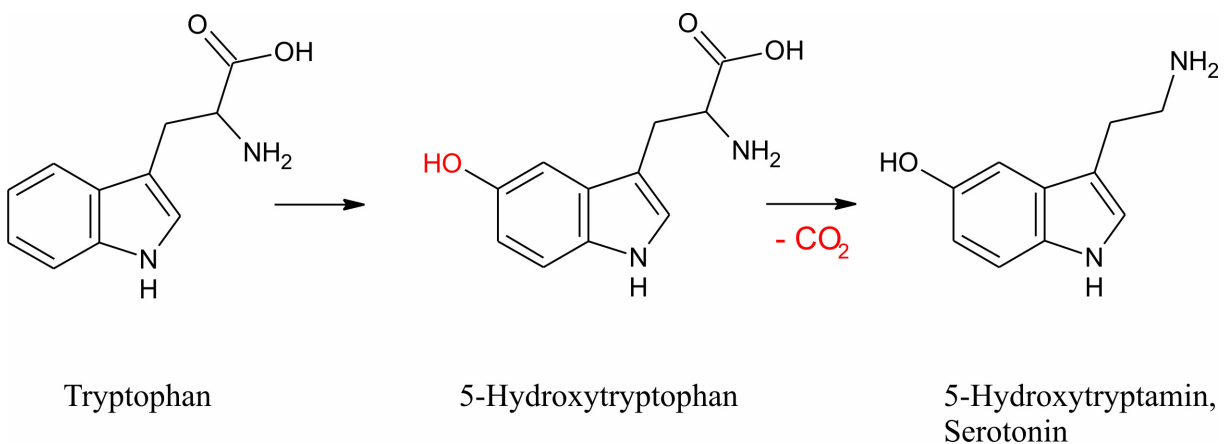


Abbildung 39: Synthese von Serotonin aus Tryptophan.

Der erste Schritt dieser Synthese wird von der Tryptophanhydroxylase katalysiert und gilt als geschwindigkeitsbestimmend. Die 5-Hydroxytryptophandecarboxylase katalysiert dann mittels des Coenzym Pyridoxalphosphat die Abspaltung von CO_2 zum Serotonin.⁴⁴

Die Synthese von Serotonin im Zentralnervensystem findet im Zellkörper (Perikaryon) der Nervenzellen statt. Über das Axoplasma gelangt Serotonin zu den Nervenendigungen, wo es in Membranvesikel aufgenommen und bis zur Ausschüttung gespeichert wird.^{44,45}

Der Transport durch die Vesikelmembran erfolgt durch sog. VMAT-Proteine (*vesicular monoamine transporter*). Die in der Synapse zuständige neuronale Isoform VMAT2 kann neben Serotonin auch die anderen biogenen Amine (Histamin, Katecholamine) transportieren. Ein elektrochemischer Protonengradient über die Vesikelmembran, der von einer H^+ -ATPase aufrechterhalten wird, ist die treibende Kraft des Transports. Um ein Serotonin-Molekül durch die Membran zu bewegen, müssen zwei Protonen das Vesikel verlassen.⁴⁵⁻⁴⁷

Ausschüttung

Die Ausschüttung von Transmittern durch die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Plasmamembran ist in den letzten Jahren immer besser verstanden worden.⁴⁵

Synaptische Vesikel liegen in der Nervenendigung in verschiedenen Zuständen vor. Ein Teil der Vesikel ist bereits irreversibel mit der Plasmamembran verbunden und kann z.T. sofort bei Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zur Transmitterfreisetzung mit der Plasmamembran fusionieren. Alle Vesikel, die im bereits gebundenen Zustand vorliegen, werden als sog. *Readily Releasable Pool* bezeichnet.⁴⁵

Eine zweite Population bildet den sog. *Reserve Pool*. Die Vesikel dieser Gruppe sind nicht mit der Plasmamembran verbunden, akkumulieren jedoch durch Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett über den Bereichen der Plasmamembran, in denen Vesikel zur Fusion bereits gebunden sind.⁴⁵

Bei Vesikeln des *Readily Releasable Pools* wird die Bindung der Vesikel an die Plasmamembran durch die *SNARE*-Proteine (von *SNAP-Receptor*) vermittelt. Vesikelmembranen sind mit *v-SNARE* ausgestattet, die mit den *t-SNARE*-Proteinen (t für *target*) der Plasmamembran einen Komplex bilden.⁴⁵

Die Fusion von Vesikeln und Plasmamembran ist calciumabhängig. Erreicht ein Aktionspotential der Nervenzelle die Synapse, werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Synaptotagmin in der Membran der synaptischen Vesikel kann direkt an diese Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran binden, so dass der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle in unmittelbarer Nähe zu gebundenen Vesikeln stattfinden kann. Synaptotagmin verfügt außerdem über drei Bindungsstellen für Calcium. Gebundenes Calcium kann durch elektrostatische Wechselwirkungen Konformationsänderungen im Synaptotagmin auslösen, so dass dieses Protein als Calciumsensor und Auslöser der Exocytose diskutiert wird.⁴⁵

Nach der Freisetzung des Transmitters können synaptische Vesikel wieder aus der Plasmamembran gewonnen werden.⁴⁵

Die Fusion von Membransystemen mittels unterschiedlicher *SNARE*-Komplexe ist neben der Neurotransmitterausschüttung auch für Zellorganellen bekannt. So sind *SNARE* z.B. an der Fusion von Vesikeln des endoplasmatischen Reticulums mit dem Golgi-Apparat oder Lysosomen beteiligt.⁴⁵

Recycling und Abbau

Serotonin muss - wie alle anderen Neurotransmitter - nach der Ausschüttung aus dem synaptischen Spalt entfernt werden, da bei hoher Serotonin-Konzentration bzw. längerer Exponierung die postsynaptischen Rezeptoren nicht

mehr auf Serotonin reagieren können (= Desensitivierung), so dass die schnelle Weiterleitung von Signalen nicht mehr möglich ist.⁴³

Zur Entfernung aus dem synaptischen Spalt wird Serotonin wieder in die präsynaptische Zelle aufgenommen, im Gegensatz zu z.B. Acetylcholin, welches nach der Ausschüttung enzymatisch hydrolysiert wird.⁴³ Für die Wiederaufnahme (*reuptake*) von Serotonin existiert in der präsynaptischen Membran ein spezialisiertes Transportprotein, der Serotonin-Transporter oder SERT. Dieses Protein gehört zur Familie der Na⁺/Cl⁻-abhängigen Transportproteine, die den Natrium-Gradienten über die Plasmamembran nutzen, um Membrantransport durchzuführen und außerdem Cl⁻ benötigen.^{45,48,49}

Serotonin kann dann in der Zelle wieder in synaptischen Vesikeln gespeichert werden, um erneut als Transmitter zur Verfügung zu stehen. Der Abbau von Serotonin kann durch die Monoaminoxidase Typ A (MAOA), der neuronalen Isoform, erfolgen. Dieses Enzym ist an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert und setzt Serotonin zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd um.⁴⁵

Pathobiochemie

Der überwiegende Anteil des Serotonins wird mit über 90 % im Magen-Darm-Trakt produziert⁵⁰, wo Serotonin als Neurotransmitter des autonomen Nervensystems an der Regulation von Bewegung und Sekretion beteiligt ist.⁵¹ Hier wird das Serotonerge System mit Reizdarmbeschwerden in Verbindung gebracht, außerdem mit Übelkeit und Erbrechen während chemotherapeutischer Krebsbehandlung.¹⁸

Serotonin wird im Blut in Thrombocyten transportiert. Tumoren serotoninproduzierender, enterochromaffiner Darmzellen, sog. Carcinoide, können durch einen erhöhten Blut-Spiegel von Serotonin und insbesondere 5-Hydroxyindolacetat, dem Abbauprodukt von Serotonin, diagnostiziert werden. Bei Gesunden wird etwa 1 % des aufgenommenen Tryptophans in Serotonin umgewandelt, bei Carcinoid-Patienten kann dieser Anteil bis auf 60 % steigen.⁴⁴

Serotonin ist durch verschiedene Rezeptortypen noch an einer Reihe wichtiger neurologischer Krankheiten beteiligt, zu denen Aggression, Depression, Phobien, Schizophrenie, chronischer Schmerz, u.a. gehören (s. auch Abschnitt 0).¹⁸

Ansätze für Wirkstoffe sind viele Proteine des serotonergen Systems. Vor allem sog. Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI) werden zur Therapie von Depression, Schmerz und anderer Krankheiten eingesetzt. Inhibitoren für die Monoaminoxidase wurden erfolgreich zur Therapie von Sozialphobien und Depression eingesetzt, werden aber immer mehr von SSRI ersetzt. Zur Therapie von Reizdarmbeschwerden und Chemotherapie-induzierter Übelkeit werden Moleküle eingesetzt, die Serotonin-Rezeptoren blockieren. Außerdem sind viele Antidepressiva u.a. Antagonisten von Serotonin-Rezeptoren.^{18,24}

Rezeptoren

Rezeptoren für Neurotransmitter lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Metabotrope Rezeptoren gehören zur Klasse der heptahelikalen Rezeptoren bzw. G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembranhelices. Sie wirken, indem sie durch die Aktivierung intrazellulärer Proteine und Enzyme *second messenger*-Moleküle bereitstellen.⁴⁴

Ionotrope Rezeptoren verfügen neben der Bindungsstelle für den Transmitter über einen Ionenkanal, der sich nach Ligandenbindung öffnet und einen Ionenstrom zulässt. Das Signal ist hier elektrisch und ermöglicht eine schnelle synaptische Transmission, im Gegensatz zu den langsameren metabotropen Rezeptoren.⁴⁴

Für viele Transmitter existieren beide Rezeptortypen (z.B. Acetylcholin mit den metabotropen muscarinischen und den ionotropen nikotinischen Rezeptoren), während andere Transmitter nur von einem Rezeptortyp gebunden werden (z.B. Neuropeptide von Opiatrezeptoren, die immer metabotrop sind).⁴⁴

Drei Klassen Ionotroper Rezeptoren werden strukturell unterschieden, Abbildung 40 zeigt schematisch die wichtigsten Strukturmerkmale wie Transmembranhelices, N- und C-Terminus und die Neurotransmitterbindungsstelle.

Glutamatrezeptoren in der ersten Gruppe binden als Neurotransmitter Glutamat, können aber pharmakologisch und funktionell in drei Untergruppen unterteilt werden: NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoren.⁵²

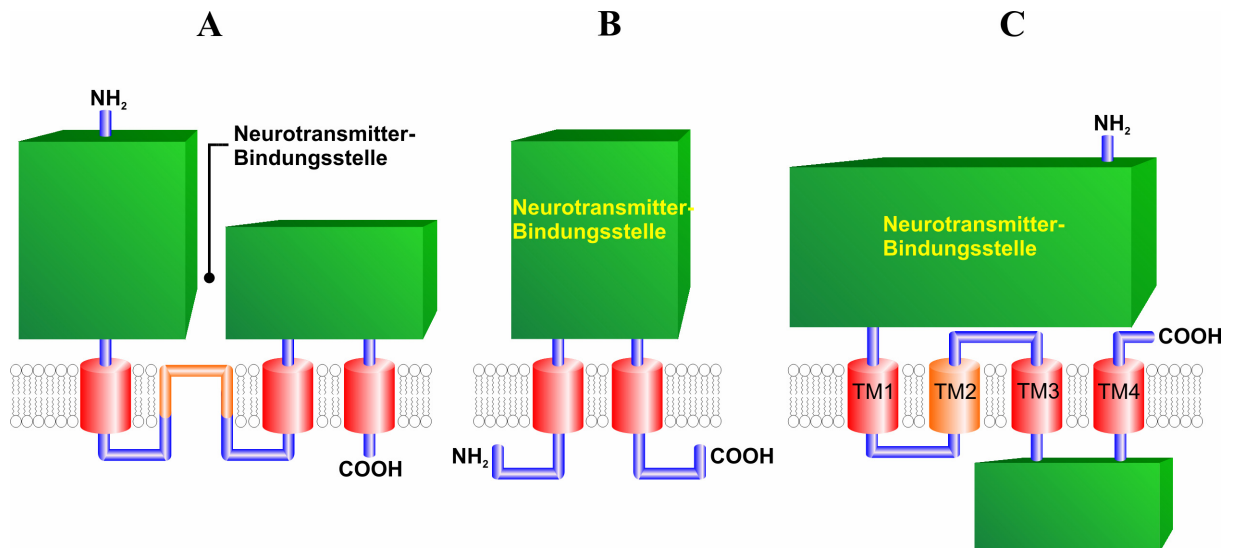


Abbildung 40: Schematische Darstellung der drei Klassen ionotroper Rezeptoren. (A) Glutamatrezeptoren mit drei Transmembranhelices und einer Membran-Schleife, die an der Porenbildung beteiligt ist (gelb). (B) P2X-Rezeptoren mit zwei Transmembranhelices. (C) Die Superfamilie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle mit vier Transmembranhelices (TM1-4), von denen die Helix TM2 (gelb) an der Porenbildung beteiligt ist.

P2X-Rezeptoren bilden die zweite Gruppe. Sie sind Rezeptoren für ADP, ATP, UDP und UTP als Neurotransmitter.⁵² Die dritte Gruppe besteht aus der sog. Superfamilie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle, die im nächsten beschrieben wird.

Die Superfamilie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle

Zur Superfamilie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle gehören Glycin- und GABA_A-Rezeptoren (γ -amino-Buttersäure, *γ -amino butyric acid*), sowie die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren und 5-Hydroxytryptamin(Serotonin)-Rezeptoren des Typs 3 (5HT3). Während Glycin- und GABA_A-Rezeptoren die Anionen HCO₃⁻ und Cl⁻ leiten, fungieren nikotinische Acetylcholinrezeptoren und 5HT3-Rezeptoren als Kanäle für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺.⁵³

Abbildung 40C zeigt die schematische Struktur einer Untereinheit dieser Proteinfamilie:^{43,44,52,54} Ein großer extrazellulärer N-Terminus trägt die Ligandenbindungsstelle. Vier Transmembranhelices durchspannen die Membran, die Helix 2 ist an der Porenbildung beteiligt. Zwischen den Helices 3 und 4 liegt ein kurzer intrazellulärer Bereich, der C-Terminus liegt wie der N-Terminus extrazellulär. Funktionelle Rezeptoren bestehen aus fünf dieser Untereinheiten.

Durch Elektronenmikroskopie mit kristallisierten nikotinischen Acetylcholinrezeptoren wurde die dreidimensionale Struktur mit einer Auflösung von 0,9 nm aufgeklärt. Die fünf Untereinheiten sind um eine Symmetrieachse herum angeordnet. Im Bereich der Pore auf Höhe der Plasmamembran nähern sich die Untereinheiten auf weniger als 1 nm an, extrallulär wird ein zylinderförmiger Hohlraum von etwa 2 nm Durchmesser von den Untereinheiten begrenzt.⁵⁴ 2003 wurde von Unwin et al. die Struktur der Pore mit einer Auflösung von 0,4 nm bestimmt und mittels einer Elektronendichtekarte der Aminosäuresequenz zugeordnet.⁵⁵ Abbildung 41 zeigt die Porenregion in Draufsicht.

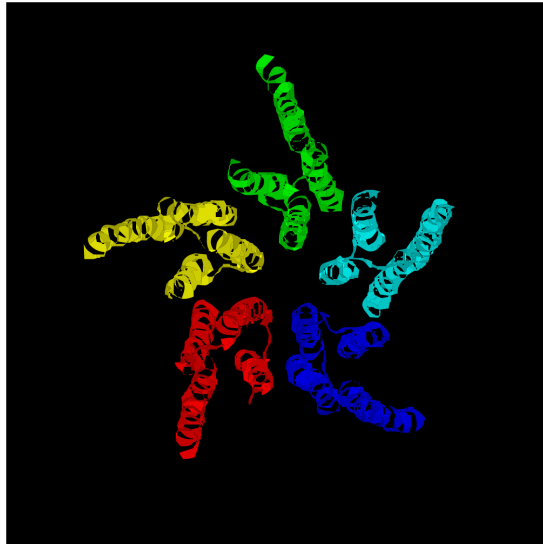


Abbildung 41: (A) Proteinstruktur der Porenregion der liganden-gesteuerten Ionenkanäle in Aufsicht am Beispiel des Acetylcholinrezeptors von Miyazawa et al.⁵⁵ (2003). Die fünf Untereinheiten sind in verschiedenen Farben dargestellt, in jeder Untereinheit sind vier Transmembranhelices zu erkennen.

Die Pore wird von der Helix 2 jeder Untereinheit ausgekleidet, die fünf Untereinheiten sind in verschiedenen Farben dargestellt. Obwohl die dreidimensionale Struktur mit dem Acetylcholinrezeptor aufgeklärt wurde, lassen sich die Ergebnisse aufgrund der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auch auf die anderen Proteine dieser Familie übertragen.

Funktion

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle üben eine zentrale Funktion in der synaptischen Transmission aus: Erreicht ein Aktionspotential eine Synapse, werden von der präsynaptischen Zelle Neurotransmitter ausgeschüttet. Diese Transmitter binden an liganden-gesteuerte Ionenkanäle auf der postsynaptischen Zelle. Durch Konformationsänderungen im Protein wird die Pore geöffnet und Ionen strömen in die Zelle.

Die postsynaptische Zelle mit einem negativen Ruhepotential wird durch den Ionenstrom entweder depolarisiert (Kationen durch Acetylcholin- oder 5HT₃-Rezeptoren) oder hyperpolarisiert (Anionen durch GABA_A- oder Glycin-Rezeptoren). Im ersten Fall kann ein neues Aktionspotential entstehen und das Signal der präsynaptischen Zelle wird weitergeleitet. Eine Hyperpolarisation erschwert dagegen die Entstehung eines Aktionspotentials, und die Reizleitung kann gehemmt oder unterbunden werden.⁴³

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle können außerdem in präsynaptischen Membranen vorliegen und durch verschiedene Mechanismen (z.B. Verstärkung des Ca²⁺-Signals zur Vesikelfusion) die Ausschüttung von Neurotransmittern beeinflussen.⁴³

Aufgrund der zentralen Position in der Funktion der Synapse kann eine Blockade oder Verstärkung des Stromes durch den Kanal mittels pharmakologischer Substanzen für verschiedene Zwecke genutzt werden: Schlaffördernde Barbiturate und muskelrelaxierende Benzodiazepine sind z.B. Agonisten des GABA_A-Rezeptors.⁴³

Serotonin-Rezeptoren des Typs 3

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten liganden-gesteuerten Ionenkanal handelt es sich um den Serotonin- oder 5-HT-Rezeptor 3A (5HT3A-Rezeptor). Auf diesen Rezeptor wird in den folgenden Abschnitten kurz eingegangen, bevor am Ende begründet wird, warum dieser Rezeptor ausgewählt wurde.

Serotonin-Rezeptoren wurden strukturell und funktionell in sieben Familien eingeteilt (5HT1-7).⁵¹ Fast alle dieser Rezeptoren sind an *second messenger*-Systeme gekoppelt, nur die Rezeptoren vom Typ 3 gehören zur Superfamilie der liganden-gesteuerten Ionenkanäle und sind strukturell den Mitgliedern dieser Gruppe ähnlicher als anderen Serotonin-Rezeptoren.⁵¹

Die erste cDNA von 5HT3-Rezeptoren wurde von Maricq et al. 1991 aus Neuroblastoma-Zellen von Mäusen kloniert und mit „A“ bezeichnet.²⁷ Die Klonierung der ersten humanen cDNA erfolgte durch Miyake et al. 1995.⁵⁶ Diese cDNA kodiert ein Protein mit 478 Aminosäuren. 23 Aminosäuren davon bilden am N-Terminus ein Signalpeptid, welches den Transport in das endoplasmatische Reticulum bewirkt und dort abgespalten wird. Durch Hydrophobizitätsanalysen wurden vier Transmembranhelices vorhergesagt, was mit der Strukturaufklärung übereinstimmt.

Neben dem 5HT3A-Rezeptor ist seit 1999 noch die 5HT3B-Untereinheit bekannt, sowie seit 2003 die Untereinheiten für die humanen Typen 3C, 3D und 3E.^{57,58}

Elektrophysiologie, Expression und Pathobiochemie von 5HT3A

5HT3A-Rezeptoren leiten neben Mg²⁺ und Ca²⁺ auch K⁺ und Na⁺ und andere einwertige Kationen wie z.B. Cs⁺. Die Einzelkanalleitfähigkeit der 5HT3A-Kanäle ist mit 0,74 pS (bei -100 mV Membranpotential) kleiner als für heteropentamere Kanäle aus 3A- und 3B-Untereinheiten mit 16 pS.^{17,57,59} Die Einzelkanalleitfähigkeit von 5HT3A-Kanälen ist abhängig vom Membranpotential der Zelle, die von 5HT3A/3B-Kanälen hingegen nicht.⁵⁷

Mit der 5HT3A-cDNA können funktionelle Kanäle aus fünf gleichen Untereinheiten in der Plasmamembran exprimiert werden, andere 5HT3-Untereinheiten können alleine keine funktionellen Kanäle bilden. Antikörpermarkierung und Autoradiographie mit radioaktiven Liganden zeigten, dass 5HT3A-Untereinheiten im peripheren Nervensystem im Magen-Darm-Trakt exprimiert werden.⁵⁰ Im Zentralnervensystem sind 5HT3A-Rezeptoren in vielen Regionen zu finden, u.a. im Cortex, im Hippocampus, in der Amygdala, sowie im Hirnstamm in hoher Dichte im Nucleus des Tractus Solitarius und der Area Postrema.^{51,60} Oft sind dies die Regionen, die für die Integration des Brechreflexes, der Schmerzprozessierung und für Angstzustände verantwortlich sind.⁶¹ 5HT3A ist in den genannten Arealen überwiegend auf GABAergen Neuronen zu finden und hier meist (70-80 %) auf Axonen und in präsynaptischen Membranen.⁶¹ Eine Ausnahme bildet der Hippocampus, wo 5HT3A in postsynaptischen bzw. somatodendritischen Membranen vorliegt.⁶¹ Blockade des Rezeptors mit Antagonisten im ZNS hat anxiolytische Wirkung für verschiedenste Angstzustände. Außerdem werden das Belohnungssystem und kognitive Funktionen beeinflusst.⁶¹ Auch nicht-neuronale Zellen wie z.B. Zellen des Immunsystems exprimieren 5HT3A-Untereinheiten.⁶²

Die bereits angesprochenen Reizdarmbeschwerden sowie Chemotherapie-induzierte Übelkeit werden vor allem mit diesem Rezeptor in Verbindung gebracht. Die vier Antagonisten Tropisetron, Ondansetron, Granisetron und Dolasetron sind derzeit in Europa (unter anderem Namen) auf dem Markt, um diese Symptome zu behandeln.^{18,51,61}

Warum 5HT_{3A}?

Neben der medizinischen Relevanz wurde der 5HT_{3A}-Rezeptor für diese Arbeit ausgewählt, weil die cDNA einer Untereinheit ausreicht, um einen funktionellen pentameren Rezeptor zu exprimieren. Somit muss nur eine cDNA in die Zellen eingebracht werden, was molekularbiologische und zellbiologische Methoden vereinfacht. Außerdem ist bekannt, dass der Rezeptor ohne Probleme in heterologen Expressionssystemen, wie z.B. der Zelllinie HEK293, exprimiert wird, im Gegensatz zu dem ebenfalls homopentameren Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$.⁶³

Die Kv1-Familie und Kv1.3

Kv-Kanäle sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, d.h. dass sie in einen offenen Zustand übergehen, wenn das Membranpotential einen bestimmten Wert erreicht. Sie sind selektiv für K^+ -Ionen und weisen praktisch keine Leitfähigkeit für andere Ionen auf. Bisher sind neun Unterfamilien von Kv-Kanälen bekannt (Kv1-9). Die Kanäle liegen als Tetramere in der Membran vor. Die Kv-Unterfamilie Kv1 kann in heterologen Expressionssystemen Kanäle aus vier gleichen Untereinheiten aufbauen.⁶⁴ In jeder Untereinheit liegen sechs Transmembranhelices vor (S1-S6), von denen die Helix S4 aufgrund vieler positiver Aminosäurereste als Spannungssensor für das Membranpotential fungiert.⁴³ Während die Kanäle Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.4 im Zentralnervensystem gefunden wurden, ist der Kanal Kv1.3 auch an der Volumenregulation und besonders an der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt.^{65,66} Daneben sind die Kv1-Kanäle 1.5, 1.6 und 1.7 bekannt. Die Eigenschaft des Kv1.3-Kanals, eine negative Membranpotential während eines depolarisierenden Einstroms von Kationen aufrecht zu erhalten, wird in den nächsten Abschnitten am Beispiel der T-Zell-Aktivierung dargestellt.

Die Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen werden durch Antigene auf der Oberfläche von antigen-präsentierenden Zellen aktiviert. Die Antigene sind dabei an MHC-Proteine gebunden, an die der T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex in der Membran der T-Zellen binden kann. Diese Wechselwirkungen resultieren dann in der Aktivierung von cytoplasmatischen Kinasen. Durch verschiedene Signalwege führt dies u.a zu. einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und schließlich zur Proliferation der T-Zellen und einer entsprechenden Immunantwort:

Die erhöhte Kinase-Aktivität führt zu Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC γ), die den *second messenger* Inositoltrisphosphat (IP₃) aus Phospholipiden der Plasmamembran synthetisiert. IP₃ bindet an einen spezifischen IP₃-Rezeptor im endoplasmatischen Reticulum, der wohl als intrazellulär liganden-gesteuerter Ionenkanal fungiert. Durch diesen Kanal strömt dann Ca^{2+} in einer ersten Phase des Calcium-Signals vom ER ins Cytosol. Ca^{2+} im Cytosol öffnet dann intrazellulär sog. CRAC-Kanäle (*calcium release activated Ca^{2+} channel*) in der Plasmamembran. Weiteres Ca^{2+} strömt durch diese Kanäle in die Zelle, worauf Ca^{2+} -bindende Proteine mit weiteren Schritten in der Signaltransduktion reagieren.³⁹

Wirkung von Kv1.3 im Ca^{2+} -*Signaling*

Die Aktivierung von T-Zellen benötigt ein anhaltendes Ca^{2+} -Signal im Cytosol. Der Einstrom von Calcium depolarisiert allerdings die Zellen, was zur Verringerung der Triebkraft des Ca^{2+} -Signals führt. In T-Zellen wird daher der Kaliumkanal Kv1.3 exprimiert. Der Kanal kann bei Spannungen zwischen -50 und -60 mV in den offenen Zustand übergehen. Mit zunehmender Depolarisierung steigt die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, und das Membranpotential für die halbmaximale Leitfähigkeit der Kanäle liegt zwischen -30 und -40 mV. Durch die Kanäle fließt K^+ entsprechend des Umkehrpotentials aus der Zelle heraus, was das Membranpotential wieder zu negativeren Werten zieht. Der Einstrom von Ca^{2+} kann dadurch andauern, die repolarisierende Wirkung des K^+ -Ausstroms ermöglicht eine weitere Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Kv1.3-Kanäle inaktivieren mit einer Zeitkonstante von etwa 200 ms, was relativ langsam ist im Vergleich zu anderen spannungsabhängigen Kanälen.³⁹

Durch seine Funktion bei der Aktivierung von T-Zellen ist der Kv1.3-Kaliumkanal zu einem wichtigen Ansatzpunkt bei der Entwicklung von Immunopharmaka geworden. Einige Peptidantagonisten mit hoher Affinität und Spezifität für Kv1.3 sind aus den Giften von Skorpionen, Schlangen und Spinnen isoliert worden. Die Eignung dieser Kanalblocker oder Analoga als immunsuppressive Medikamente nach Transplantationen oder bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose wird derzeit untersucht und optimiert.³⁹

B Herstellung der Vektoren

Material und Methoden

Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele der Konzentrationen 0,8%-1,2% (w/v) hergestellt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) gelöst und vor dem Gelatinieren mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zur Markierung von DNA versetzt.

Elektrophoresen erfolgten in TAE-Puffer bei 10 V pro Zentimeter Gellänge, nachdem die Proben mit DNA-Probenpuffer zur Sedimentation in die Geltaschen und zur Visualisierung der Lauffront nach Anleitung des Herstellers versetzt wurden. Für jede Elektrophorese wurde ein entsprechender Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Dabei wurde der 1 kbp-Größenstandard in einer Konzentration von 0,5 µg/Spur eingesetzt, der 100 bp-Größenstandard wurde zu 3 µg/Spur aufgetragen.

Aufgetrennte DNA-Banden im Gel konnten durch die Fluoreszenz des gebundenen Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Zur Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration in Lösungen wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. DNA-Präparationen wurden dazu in Quarzküvetten von 0,5 mm Durchmesser überführt. Alle Proben wurden ebenfalls bei 280 nm gemessen, um durch Quotientenbildung auf eventuelle Protein-Verunreinigungen schließen zu können.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR wurden in Ansätzen mit 25 µl Endvolumen durchgeführt. dNTP lagen in einer Endkonzentration von 1 mM in den Ansätzen vor, die entsprechenden Primer in einer Endkonzentration von 0,4 µM. Die Polymerasen wurden mit einer Aktivität von 1-5 U eingesetzt. Für analytische PCR wie z.B. der Nachweis von positiven Bakterien-Kolonien nach Transformationen wurde *Taq*-Polymerase verwendet. Für Klonierungen mit möglichst wenig zufälligen Mutationen wurde *Pfu*-Polymerase verwendet, die zwar langsamer als *Taq* ist aber falsch gepaarte Nucleotide wieder ausschneiden kann (*proof-reading activity*). Für beide Polymerasen wurde der jeweilige Reaktionspuffer ohne Magnesium verwendet. Mg²⁺ wurde als MgSO₄ (*Pfu*) oder MgCl₂ (*Taq*) mit Konzentrationen von 5-7 mM eingesetzt. Bei PCR mit Plasmiden als *Template*, wurde die DNA in Mengen von 1-10 pg eingesetzt. Die *Template*-Menge bei PCR zur Fusion von DNA-Fragmenten betrug 20-80 ng.

Für den Nachweis von positiven Bakterien-Klonen nach Transformationen mittels PCR (*PCR-Screen*) wurden Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und als *Template* direkt in die PCR-Ansätze gespült. Die Primerkonzentration wurde auf 4 µM erhöht, dNTPs wurden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt und ggf. wurde die Mg²⁺-Konzentration auf 5-10 mM erhöht.

PCR-Produkte wurden in Agarose-Gelen aufgetrennt. Fragmente zur Präparation wurden in der erwarteten Größe aus dem Gel geschnitten und mit dem entsprechenden Kit aus dem Gel extrahiert. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

DNA-Restriktionsreaktionen

Bei der enzymatischen Spaltung von DNA handelt es sich um eine spezifische Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung auf beiden Strängen. Die Enzyme erkennen und schneiden meist palindromische DNA-Sequenzen und erzeugen entweder glatte Enden oder Überhänge, die je nach Enzym eine spezifische Sequenz aufweisen.

Das Endvolumen der Reaktionsansätze betrug 20 µl. Die Enzyme wurden mit einer Aktivität von 2-20 U in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Für Restriktionsschnitte von Plasmid-DNA wurde für die Reaktionen eine Menge von 5 µg eingesetzt, für Restriktionsschnitte von DNA-Fragmenten 1,5 µg.

Alle Reaktionsansätze wurden für 1 std. 30 min. bei 37°C inkubiert. Da die Ansätze sofort in einer entsprechenden Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, fand keine Hitzeinaktivierung statt. Bei weiterer Verwendung wurden Fragmente der erwarteten Größe aus dem Gel geschnitten und mit dem entsprechenden Kit aus dem Gel extrahiert. Anschließend folgte die photometrische Konzentrationsbestimmung.

Ligationen

Die Ligation von DNA wird erreicht durch die Herstellung von neuen Phosphodiesterbindungen zwischen zwei DNA-Fragmenten. Für die Ligation von geschnittenem Plasmid mit einzufügender DNA wurde T4-DNA-Ligase mit dem entsprechenden Ligase-Puffer eingesetzt. Das Enzym kann sowohl Fragmente ohne Überhänge, als auch Fragmente mit kohäsiven Einzelstrangenden ligieren. Die Ansätze der Reaktion hatten ein Endvolumen von 20 µl. Die Menge des linearisierten Vektors betrug 135 ng. Von einzufügender DNA wurden 20 ng pro Ansatz verwendet. Zu den Ansätzen wurde 1 U des Enzyms gegeben, es folgte eine Inkubation über Nacht bei 14°C. Die Ligations-Ansätze wurden ohne weitere Aufreinigung für Transformationen eingesetzt

Sequenzierungen

Sequenzierungen von DNA wurden nach der Methode von Sanger mit fluoreszenzmarkierten ddNTP durchgeführt. Zusammen mit einem Primer und der Template-DNA wird bei dieser Methode zunächst eine PCR durchgeführt. In der Reaktion werden die ddNTP statistisch in die zu synthetisierenden komplementären Stränge eingebaut und verursachen somit einen Abbruch der Synthese. Es entstehen verschieden lange Einzelstrangfragmente, die sich in einem *Sequencer* in einer Kapillare auftrennen lassen. Idealerweise unterscheiden sich dabei die zu trennenden Fragmente - ausgehend vom Primer - immer um genau eine zusätzliche Base, da der statistische Kettenabbruch durch die ddNTP bei ausreichenden Konzentrationen des Primers an jeder Position der Sequenz ab der Primerhybridisierung auftritt. Die Konzentrationen der Reaktionspartner werden ausreichend gross gewählt, so dass der Kettenabbruch an jeder Position der Sequenz mehrmals auftritt, und höhere Signale im *Sequencer* erreicht werden. Die vier verschiedenen ddNTP sind unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und können im Sequenzer nach der Trennung von einem Laser detektiert werden. Dabei emittieren die markierten letzten Basen einer spezifischen Fragmentgröße eine der vier verschiedenen Wellenlängen, die erkannt und aufgezeichnet werden. Dieser Vorgang wiederholt sich dann mit dem Fragment, bei dem der Kettenabbruch eine Base später auftrat, bis alle getrennten Fragmente vom Laser erfasst wurden. Die Signale werden in einem Chromatogramm hintereinander dargestellt. So erhält man eine Sequenz von vier verschiedenen Farbsignalen, die den vier ddNTP entsprechen. Dadurch dass der Kettenabbruch durch die ddNTP statistisch an jeder Stelle der zu sequenzierenden DNA aufgetreten ist, erhält man die

komplette Sequenz der DNA. Mit dieser Methode lassen sich mit hoher Genauigkeit 500 bis 800 Basen eines Einzelstranges identifizieren.

Sequenzierungen wurden von der Firma Medigenomix durchgeführt. Dazu wurde der Firma Plasmid-DNA der Konzentration 200 ng/μl zur Verfügung gestellt, sowie Primer der Konzentration 10 pmol/μl. Chromatogramme wurden mit dem Programm Chromas dargestellt und geprüft.

Transformation von Bakterien und Bakterienkultivierung

Für Transformationen mit Plasmid-DNA wurden XL10-Gold-*E.coli*-Zellen der Firma Invitrogen verwendet. Außerdem wurde für Transformationen SOC-Medium verwendet:

2 % (w/v) Caseinhydrolysat
1 % (w/v) Hefeextrakt
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
10 mM NaCl
20 mM Glucose

Das Medium wurde vor der Zugabe der Glucose autoklaviert.

Transformationen wurden wie folgt durchgeführt:

Ein Aliquot kompetenter Bakterienzellen wurde pro Ligationsansatz eingesetzt. Die Bakteriensuspension wurde mit der DNA gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für zwei Minuten bei 42°C, bevor das zehnfache Volumen SOC-Medium zugegeben wurde. Die Bakterien wurden für 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert und auf Nährböden ausgestrichen (200 μl Bakteriensuspension pro Petrischale). Die Nährböden wurden mit Luria-Bertani-Medium (s.u.) hergestellt, welches vor dem Autoklavieren mit 20 mM MgSO₄ und 15 g/l Agar versetzt wurde. Nach dem Autoklavieren wurden Antibiotika der gewünschten Konzentration zugegeben. Während der Inkubation der Nährböden von 24 Stunden bei 37°C wuchsen Bakterienkolonien.

Kolonien von den Nährböden wurden isoliert, in Nährmedium geimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Übernachtskulturen von Bakterienkolonien wurde Luria-Bertani-Medium verwendet, welches mit Antibiotika versetzt wurde (LB-Medium):

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
pH 7,4

Das Medium wurde vor der Zugabe von Ampicillin autoklaviert.

Aus Übernachtskulturen wurde mittels eines Präparations-Kitsystems die Plasmid-DNA gewonnen, welche für Transfektionen oder Sequenzierungen verwendet wurde.

Karten der Ausgangsplasmide

Abbildung 42 zeigt schematische Plasmidkarten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

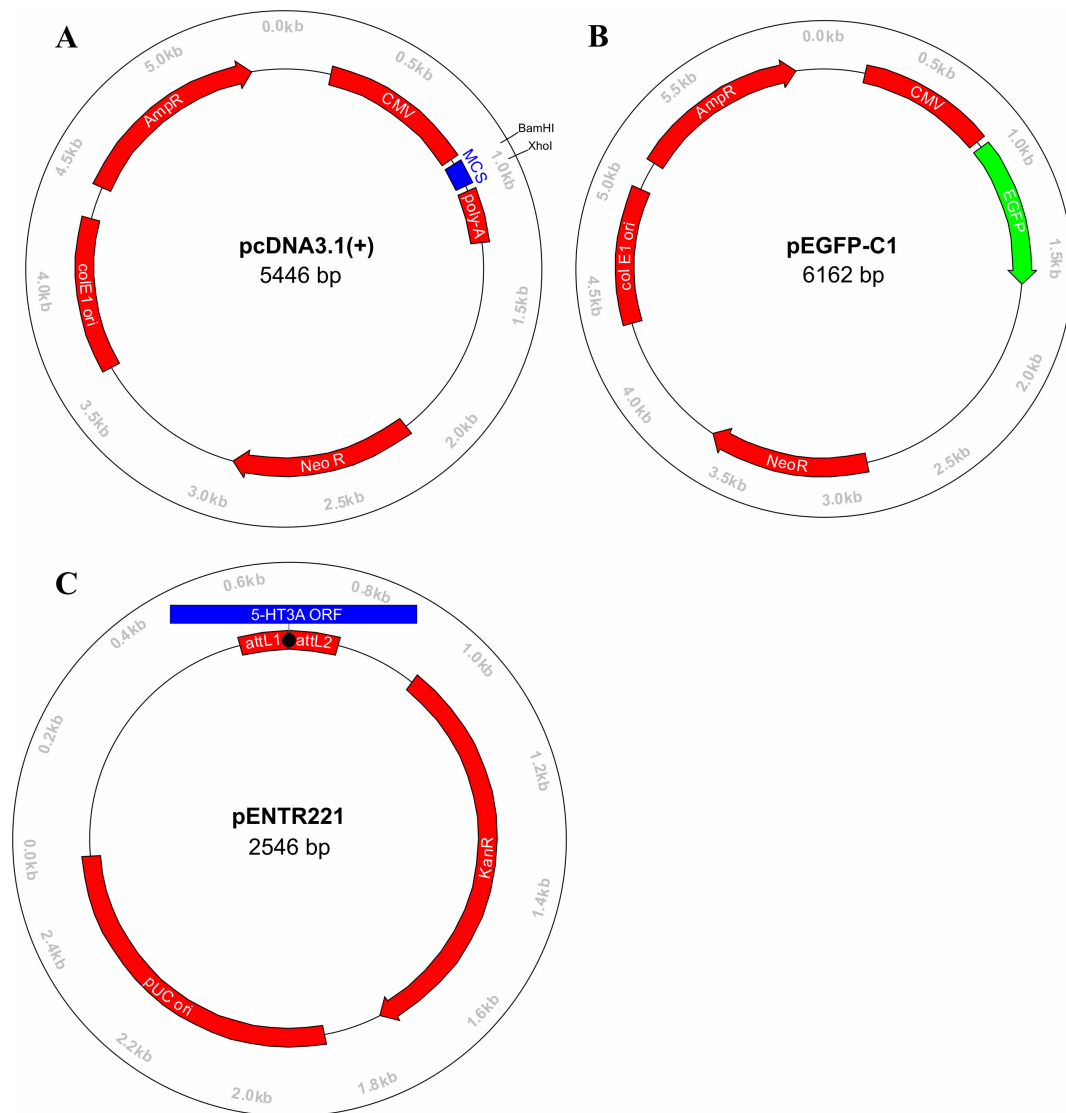


Abbildung 42: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. (A) Das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) von Invitrogen. Neben den wichtigsten DNA-Sequenzen sind ebenfalls die Schnittstellen für BamHI und XhoI markiert, die in dieser Arbeit verwendet wurden. (B) Das Expressionsplasmid für das grün fluoreszierende Protein EGFP (grün). (C) Der Vektor pENTR221 mit der cDNA für den 5HT3A-Rezeptor (blau) von Invitrogen, der Ausgangspunkt dieser Arbeit war. (CMV Cytomegaloviruspromotor, NeoR Neomycin-Resistenz, KanR Kanamycin-Resistenz, AmpR Ampicillin-Resistenz, colE1ori Replikationsursprung, MCS Multiple Cloning Site, pUCori Replikationsursprung, attL1 und attL2 Signalsequenzen für DNA-Rekombination, poly-A Polyadenylierungssignal).

pcDNA3.1(+)

Der Vektor pcDNA3.1(+) (Abbildung 42A) wurde von Invitrogen gekauft. pcDNA3.1 ist ein eukaryotisches Expressionsplasmid mit Neomycin-Resistenz. Transfizierte Zellen können aufgrund dieser Resistenz mit dem

eukaryotischen Antibiotikum Geneticin selektiert werden, um stabile Zelllinien mit der gewünschten DNA zu generieren. mRNA wird durch das BGH-Polyadenylierungssignal (*Bovine Growth Hormone*) stabilisiert. Durch den CMV-Promotor wird eine hohe Proteinexpression erreicht. Die Schnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der *multiple cloning site* in Abbildung 42A markiert. Für bakterielle Selektion ist eine Ampicillin-Resistenz auf dem Plasmid vorhanden. Die Replikation des Plasmids in *E.coli* ist durch die *colE1ori*-Sequenz zur besseren Ausbeute erhöht (*High Copy Plasmid*).

Aus diesem Plasmid wurden eukaryotische Expressionsvektoren mit 5-HT3A-cDNA-Konstrukten hergestellt.

pEGFP-C1

Das Plasmid pEGFP-C1 wurde von Clontech gekauft. Es enthält die cDNA für das grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und Elemente eines eukaryotischen Expressionsvektors (Abbildung 42B), u.a. einen CMV-Promotor und eine Neomycin-Resistenz für eukaryotische Selektion. Für bakterielle Selektion ist eine Ampicillin-Resistenz vorhanden.

Dieses Plasmid wurde verwendet, um die cDNA für EGFP zu amplifizieren, welche für Fusionskonstrukte eingesetzt wurde. Außerdem wurde der Vektor als Kontrollplasmid für Transfektionen von HEK293-Zellen verwendet.

pENTR^(TM)221-5HT3A

Die DNA für den humanen Serotonin-Rezeptor 5-HT3A war als voll sequenzierter offener Leserahmen (*open reading frame*, ORF) in einer cDNA-Klonsammlung von Invitrogen enthalten und wurde in dem Plasmid pENTR221-5HT3A (Abbildung 42 C) gekauft. Der Vektor enthält eine Kanamycin-Resistenz für bakterielle Selektion und eine pUCori-Sequenz für hohe Replikationsraten. Es ist kein Expressionsplasmid, daher muss die 5HT3A-cDNA umkloniert werden. pENTR221 wird in der Klonsammlung von Invitrogen als Standardvektor für sämtliche cDNA-Klone verwendet. Die jeweilige cDNA ist von *attL1*- bzw. *attL2*-Sequenzen flankiert. Diese Sequenzen dienen zur spezifischen Rekombination der cDNA mit Vektoren, die über die Rekombinations-Zielsequenzen *attR* verfügen. Diese Quell- und Ziel-Sequenzen für die Rekombination stammen aus dem lambda-Bakteriophagenvirus und dienen zur schnelleren Umklonierung in Expressionsvektoren. Die Rekombinationssequenzen wurden in dieser Arbeit nicht genutzt. Die cDNA für den Rezeptor 5HT3A auf dem Plasmid wurde als Grundlage für Umklonierungen und Fusionskonstrukte durch PCR verwendet.

Oligodesoxynucleotide

Als Primer für PCR-Reaktionen wurden Oligodesoxynucleotide definierter Sequenz auf Bestellung synthetisiert. Tabelle 4 enthält eine Liste der verwendeten Primer mit Beschreibung und Schmelztemperatur (T_M). Überhänge sind unterstrichen.

Tabelle 4: Liste der als Primer verwendeten Oligodesoxynucleotide. Unterstrichene Sequenzen entsprechen Überhängen (T_M = Schmelztemperatur).

	Sequenz	Firma	Verwendung	T_M
Primer 1 (<i>forward</i>)	5'- <u>GAA TCG GAT CCC CAC CAT</u> GCT GCT GTG GGT CCA G-3'	MWG	Umklonierung, Strangauffüllung	61°C (ohne Überhang)
Primer 2 (<i>reverse</i>)	5'- <u>GAA TCC TCG AGT CAA GCG</u> TAC TGC CAG ATG-3'	MWG	Umklonierung, Strangauffüllung	59°C (ohne Überhang)

Primer 3 (forward)	5'-GCT GAC CAC CTA CAT CTG GTA C-3'	MWG	PCR-Screen	59°C
Primer 4 (reverse)	5'-GTT ACT GCT TTC CAT GCT GAA C-3'	MWG	PCR-Screen	59°C
Primer 5 (reverse)	5'- <u>CTC GCC CTT GCT CAC CAT</u> TCG GCT CCT CCT GGC TTC-3'	MWG	Fragmente für PCR- Fusion	64°C (ohne Überhang)
Primer 6 (forward)	5'- <u>GGC ATG GAC GAG CTG TAC</u> <u>AAG</u> AAC ACC ACC AGG CCC G-3'	MWG	Fragmente für PCR- Fusion	61°C (ohne Überhang)
Primer 7 (forward)	5'-ATG GTG AGC AAG GGC GAG-3'	MWG	EGFP-PCR	62°C
Primer 8 (reverse)	5'-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3'	MWG	EGFP-PCR	60°C

Enzyme und Reaktionspuffer

In Tabelle 5 sind die Enzyme aufgeführt, die für verschiedene Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5: Verwendete Enzyme.

Name	Firma	Verwendung	Konzentration	Artikel-Nr.
<i>Taq</i>	MBI Fermentas	PCR	5 U/μl	#EP0072
<i>Pfu</i>	MBI Fermentas	PCR	2,5 U/μl	#EP0571
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs	Restriktionsschnitte	20 U/μl	#136S
<i>Xho</i> I	New England Biolabs	Restriktionsschnitte	100 U/μl	#101CS
T4-Ligase	MBI FermentasH	DNA-Ligation	1 U/μl	#EL0015

Tabelle 6 zeigt diejenigen der mitgelieferten Enzympuffer, die verwendet wurden.

Tabelle 6: Verwendete Puffer.

Name	Firma	Verwendung	Artikel-Nr.
10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	MBI Fermentas	PCR-Ansätze mit <i>Taq</i>	#EP0072
10x PCR-Puffer ohne MgSO ₄	MBI Fermentas	PCR-Ansätze mit <i>Pfu</i>	#EP0571
10x Puffer <i>Bam</i> HI	New England Biolabs	Restriktionsschnitte	#101CS
10x Puffer <i>Xho</i> I	New England Biolabs	Restriktionsschnitte	#R01436S
10x Ligase-Puffer	MBI Fermentas	DNA-Ligationen	#EL0015

DNA-Kitsysteme

Für die Präparation, Reinigung und Transfektion von DNA wurden vorgefertigte Kitsysteme verwendet, die in Tabelle 7 aufgelistet sind.

Tabelle 7: Kitsysteme, die für die Präparation, Reinigung und Transfektion von DNA verwendet wurden.

Name	Firma	Verwendung	Artikel-Nr.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Geextraktion von Nukleinsäuren	28704
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidpräparation aus Bakterien	27104
Effectene Transfection Reagent	Qiagen	Transfektionen	301425

Herstellung des Expressionsplasmides pcDNA3.1/h5HT3A

Die cDNA für den humanen 5HT3A-Rezeptor wurde im Plasmid pENTR221 von Invitrogen gekauft. Da pENTR221 kein eukaryotisches Expressionsplasmid ist, wurde die cDNA in den Vektor pcDNA3.1 umklontiert.

Einfügen von Schnittstellen und Kozak-Sequenz mittels PCR

Mit pENTR221/h5HT3A als *Template* wurde eine PCR mit dem Forward-Primer 1 und dem Reverse-Primer 2 durchgeführt, um zunächst Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzufügen. Die Primersequenzen waren komplementär mit dem Anfang (Primer 1) bzw. dem Ende (Primer 2) der 5HT3A-cDNA und trugen zusätzlich in einem 5'- bzw. 3'-Überhang Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI bzw. *Xho*I. Im 5'-Überhang von Primer 1 war außerdem die Kozak-Konsensussequenz CCACC hinter der *Bam*HI-Schnittstelle vorhanden, die bei eukaryotischer Genexpression für die Ribosomenbindung benötigt wird.⁶⁷ Im PCR-Produkt waren somit die Kozak-Sequenz und die anschließende 5HT3A-cDNA flankiert von einer *Bam*HI- und einer *Xho*I-Schnittstelle. Abbildung 43A zeigt schematisch die PCR-Reaktion und die entstehenden Produkte mit der Position der eingefügten Schnittstellen und der Kozak-Sequenz vor und nach der 5HT3A-cDNA.

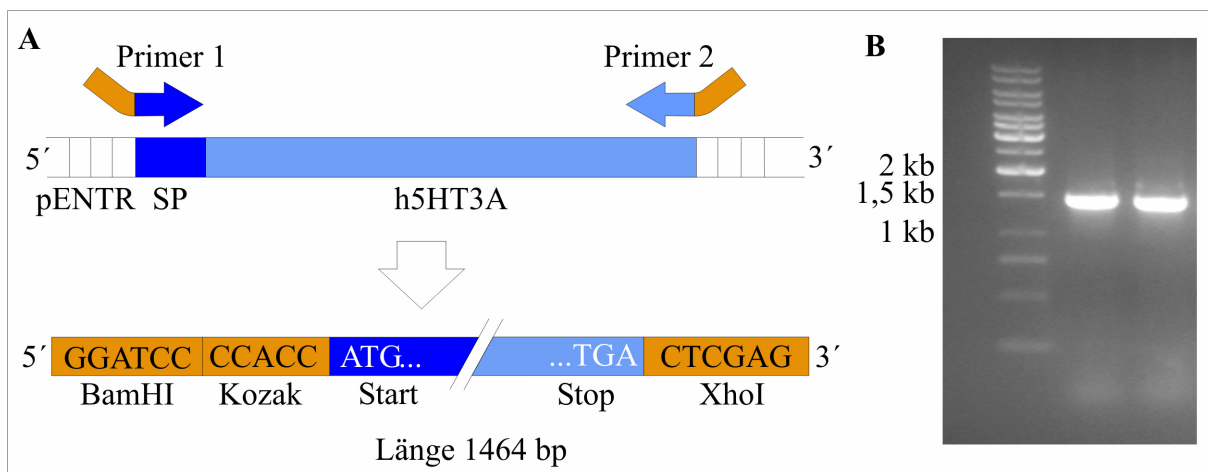


Abbildung 43: (A) Schema der PCR-Reaktion mit pENTR221/h5HT3A als *Template* und den Primern 1 und 2 mit ihren jeweiligen Überhängen (braun). Im PCR-Produkt wurden vor und nach der h5HT3A-cDNA (blau) Schnittstellen eingefügt, sowie die Kozak-Sequenz für eukaryotische Expression (SP Sequenz für das Signalpeptid des reifen Proteins). (B) Gelfoto unter UV-Anregung der durch Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente aus der PCR-Reaktion. In der rechten Spur wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die beiden Banden entsprachen der erwarteten Produktlänge von 1464 bp.

Die Gesamtlänge der entstandenen DNA-Fragmente mit Schnittstellen, Kozak-Sequenz und cDNA betrug 1464 bp. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch analysiert. Ein Foto des Elektrophorese-Gels unter UV-Anregung ist in Abbildung 43B dargestellt. Die Fragmente der erwarteten Größe wurden aus dem Gel isoliert und gereinigt.

Restriktionsreaktion mit Vektor und PCR-Produkt

Die gereinigte DNA wurde in Restriktionsreaktionen mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I eingesetzt. Die Enzyme schneiden DNA an einer bestimmten palindromen Signalsequenz (s. Abbildung 43A) und hinterlassen an den Enden spezifische Sequenzen einzelsträngiger DNA. Parallel dazu wurde der Vektor pcDNA3.1 ebenfalls mit den beiden Enzymen geschnitten um komplementäre Enden zu den bereits geschnittenen DNA-Fragmenten zu erzeugen. Abbildung 44A zeigt schematisch beide DNA-Sequenzen nach den Restriktionsreaktionen.

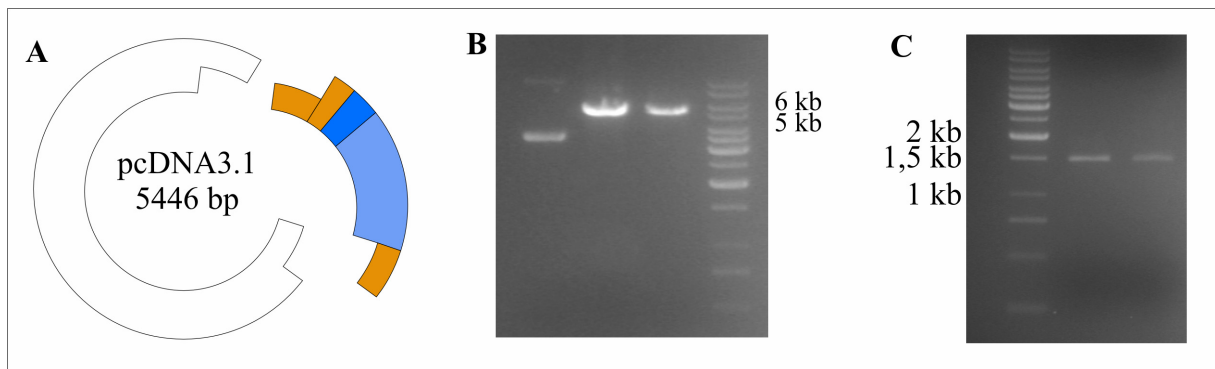


Abbildung 44: (A) Schema des pcDNA3.1-Plasmids und des PCR-Produkts nach den Restriktionsreaktionen mit *Bam*HI und *Xho*I. (B) Gelfoto von pcDNA3.1 nach der Restriktionsreaktion. Links wurde als Negativkontrolle ungeschnittener Vektor aufgetragen, rechts ein Größenstandard. (C) Gelfoto der mit *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen PCR-Produkte.

Die geschnittene DNA wurde in einer Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Fragmente wurden aus dem Gel isoliert. Abbildung 44B und Abbildung 44C zeigen die Fotos der Gelelektrophoresen der PCR-Produkte und des Vektors nach den Restriktionsreaktionen mit *Bam*HI und *Xho*I.

Ligation der beiden Fragmente zum Vektor pcDNA3.1/h5HT3A

Beide Sequenzen wurden zum Expressionsvektor pcDNA3.1/h5HT3A ligiert. In einem Transformationsansatz wurde das Plasmid in *E. coli*-Bakterien eingebracht, die auf Ampicillin-haltigen Nährböden ausgestrichen wurden. Um positive Klone zu finden, wurden einzelne Kolonien dieser Nährböden als Template in einer PCR mit den Primern 3 und 4 eingesetzt. Die Primer binden auf der 5HT3A-cDNA, und in der PCR Reaktion entstand bei Kolonien, die das Plasmid enthalten, ein DNA-Fragment von 444 bp Länge. Das Gelfoto nach der Elektrophorese der PCR-Reaktionen ist in Abbildung 45 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde die PCR ebenfalls mit dem Ausgangsplasmid pENTR221/h5HT3A durchgeführt. 2 Kolonien zeigten in dieser PCR eine DNA-Bande in der erwarteten Größe, ebenso wie die Positivkontrolle und galten somit zunächst als positiv. Die Plasmid-DNA dieser Bakterienklone wurde präpariert und sequenziert, um die geplante DNA-Sequenz zu bestätigen und Mutationen ausschließen zu können. Abbildung 46 zeigt ein Schema des fertigen

Expressionplasmids mit den Positionen der wichtigsten DNA-Abschnitte, wie es durch die abschließende Sequenzierung verifiziert wurde.

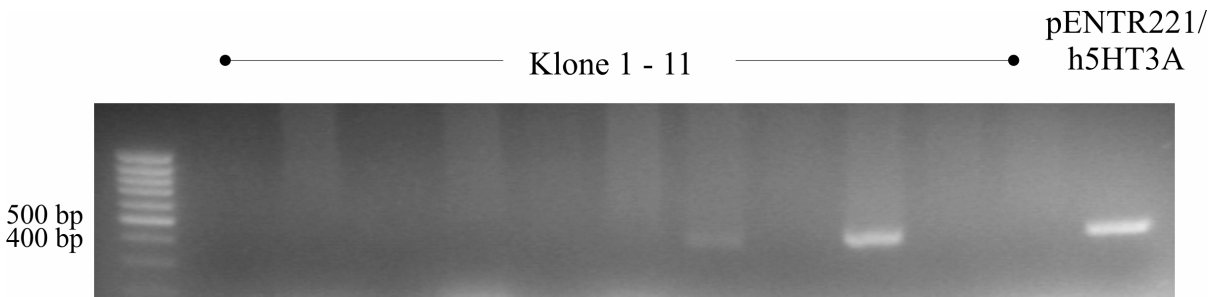
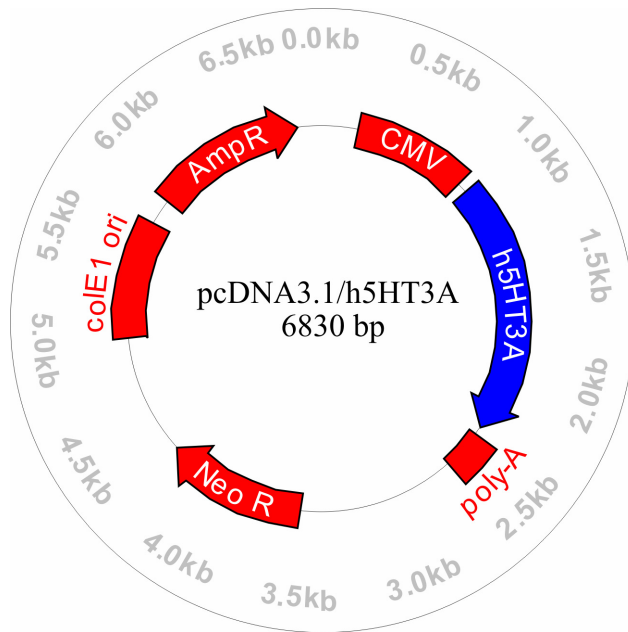


Abbildung 45: Gelfoto von PCR-Produkten mit den Primern 3 und 4 und 11 Bakterienkolonien als *Template*. In der linken Spur wurde ein Größenstandard aufgetragen und in der rechten Spur als Positivkontrolle das Ergebnis der PCR mit denselben Primern und dem Ausgangsplasmid pENTR221/h5HT3A als *Template*. Zwei der elf Kolonien zeigten die DNA-Bande in der erwarteten Größe (444 bp) wie auch die Positivkontrolle und wurden als positiv angesehen.



CMV 209-883
 h5HT3A-cDNA 918-2354
 poly-A 2402-2633
 NeoR 3535-4329
 colE1ori 5016-5689
 AmpR 5834-6694

Abbildung 46: Das durch Sequenzierung verifizierte Expressionsplasmid pcDNA3.1/h5HT3A. Die wichtigsten Eigenschaften wurden in der Abbildung mit ihren Positionen im Plasmid aufgeführt. Die umklonierte h5HT3A-cDNA ist blau markiert (CMV Cytomegaloviruspromotor, poly-A Polyadenylierungssignal, NeoR Neomycinresistenz, AmpR Ampicillin-Resistenz, colE1ori Replikationsursprung).

Herstellung des Fusionsplasmides pcDNA3.1/h5HT3A-Δ4-EGFP

Um die Expression des Serotonin-Rezeptors in Zelllinien bestätigen zu können, sowie zum Testen der angefertigten Expressionsplasmide, wurde ein Fusionsprotein aus dem Ionenkanal und dem grün fluoreszierenden Protein EGFP hergestellt. Das EGFP-Konstrukt sollte bei Expression durch

Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die Primer aus den folgenden Abschnitten sind mit Sequenz und Schmelztemperatur in Tabelle 4 aufgelistet.

Planung

Die DNA-Sequenz des Konstrukts wurde analog zu schon vorhandenen EGFP-Fusionsproteinen mit 5-HT3A-Rezeptoren oder anderen liganden-gesteuerten Ionenkanälen geplant.^{68,69}

EGFP-Fusionen am N-Terminus des reifen Proteins schienen dabei die Expression und die Funktionalität als Ionenkanal nicht zu beeinträchtigen, solange das Signalpeptid für den Transport in das endoplasmatische Reticulum und die entsprechende Proteaseschnittstelle für dieses Peptid in der Aminosäuresequenz vor der EGFP-Sequenz lagen.

Die EGFP-5HT3A-cDNA wurde dementsprechend so geplant, dass das Fusionsprotein in der Aminosäuresequenz am N-Terminus das Signalpeptid des Kanals trug. Es folgten vier Aminosäuren der reifen Kanalsequenz, um die Proteaseschnittstelle für das Signalpeptid nicht zu beeinträchtigen. Danach wurde die EGFP-Sequenz eingefügt und schließlich die übrige Sequenz des Rezeptors, ohne die ersten vier Aminosäuren.

Bei einer Fusion des EGFP-Proteins mit der Rezeptor-DNA trägt nach der Expression jede Untereinheit des Kanals ein EGFP am N-Terminus, insgesamt liegen also fünf EGFP in jedem kompletten Rezeptor vor. Die Expression dieser Fusionskonstrukte sollte durch Fluoreszenzmikroskopie direkt sichtbar sein.

Herstellung der Vorstufen des Fusionsproteins durch PCR

Zunächst wurden parallel zwei PCR-Reaktionen mit dem Ausgangsplasmid pENTR221/h5HT3A als *Template* durchgeführt. In der ersten PCR wurde dazu als *Forward*-Primer Primer 1 verwendet, der einen 5'-Überhang trug, um eine *Bam*HI-Schnittstelle und eine Kozak-Sequenz vor der Kanal-cDNA einzufügen. Als *Reverse*-Primer wurde Primer 5 verwendet. Die komplementäre Sequenz dieses Primers auf der Rezeptor-cDNA endete mit dem Codon für die vierte Aminosäure hinter dem Signalpeptid. Der Primer enthielt danach einen Überhang, der mit 18 bp komplementär zur cDNA-Sequenz des N-Terminus des EGFP-Proteins war. In Abbildung 47A ist links ein Schema dieser PCR (PCR 1) und des resultierenden PCR-Produktes dargestellt. Es enthält von 5' beginnend die *Bam*HI-Schnittstelle, die Kozak-Sequenz, die cDNA für das Signalpeptid, die cDNA für die ersten vier Aminosäuren des Rezeptors und schließlich die ersten 18 bp für den N-Terminus von EGFP. Die Länge betrug 90 bp, Abbildung 47B zeigt ein Foto der entstandenen PCR-Produkte (Produkt 1) nach der Elektrophorese.

Die zweite PCR mit demselben *Template* wurde mit den Primern 6 und 2 durchgeführt. Die Bindungsstelle von Primer 6 begann mit der cDNA für die fünfte Aminosäure des Rezeptors. Der Primer trug einen 5'-Überhang vor der komplementären Sequenz, der den letzten 21 Basen der EGFP-cDNA entsprach, also für den C-Terminus des Proteins codierte. Primer 2 wurde bereits in Abschnitt 0 verwendet: Der Primer band an das Ende der h5HT3A-cDNA und trug einen Überhang, mit dem am 3'-Ende des PCR-Produkts eine *Xho*I-Schnittstelle eingefügt wurde. PCR 2 ist in Abbildung 47A mit dem entstandenen Produkt (Produkt 2) als Schema in der Mitte gezeigt. Abbildung 47B (Mitte) zeigt das PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese.

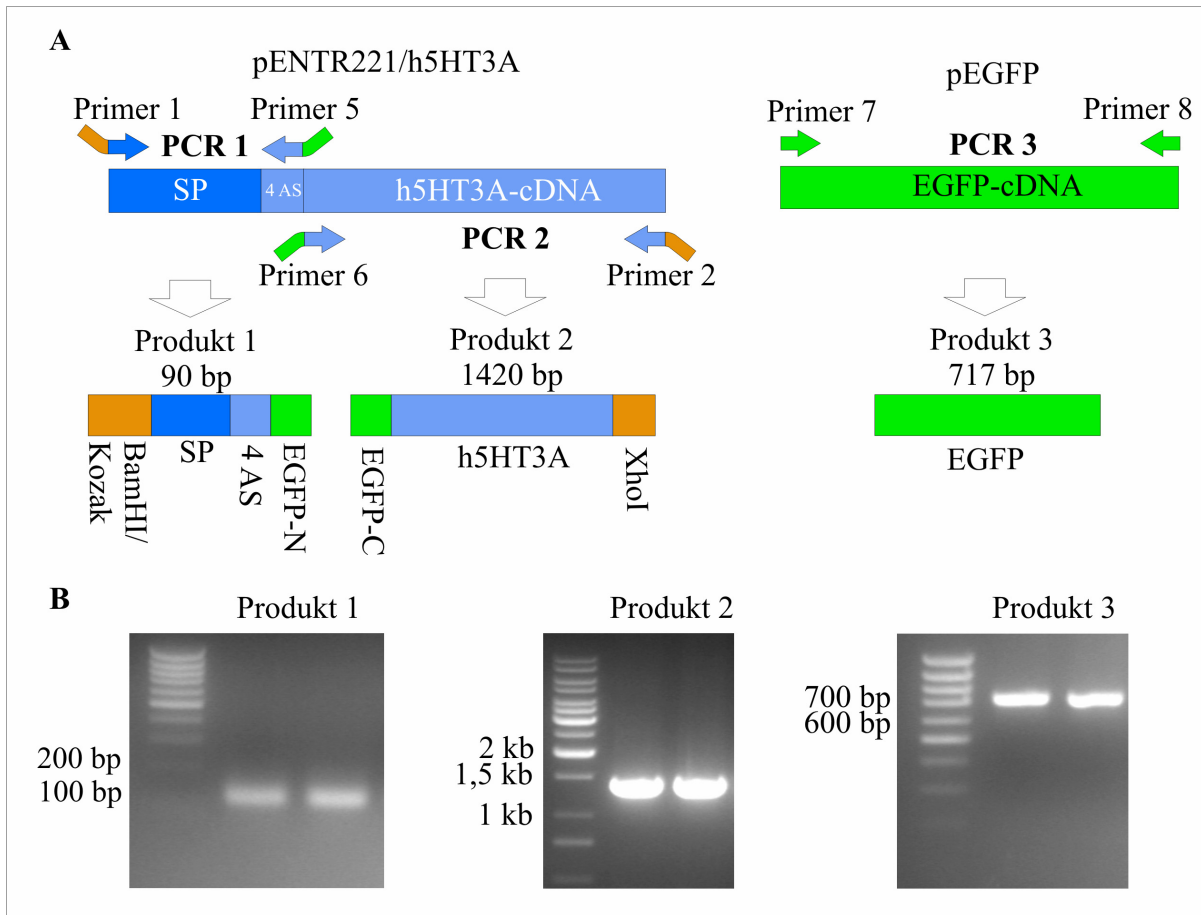


Abbildung 47: (A) Schematische Darstellung der ersten drei PCR-Reaktionen zur Gewinnung eines Kanal-Fusionsproteins. (B) Gelfotos der drei ersten PCR-Produkte, die alle mit der erwarteten Größe zu sehen sind. Produkt 1 war aufgrund der geringen Länge in den hier verwendeten Agarosegelen nicht als scharfe Bande zu sehen (AS Aminosäuren, SP Signalpeptid, EGFP-N EGFP N-Terminus, EGFP-C EGFP C-Terminus).

Eine dritte PCR wurde mit dem Plasmid pEGFP zeitgleich zu den ersten beiden mit den Primern 7 und 8 durchgeführt. Sie diente lediglich zur Amplifizierung der 717 bp langen EGFP-cDNA. Ein Schema und das PCR-Produkt (Produkt 3) sind in Abbildung 47A und B (jeweils rechts) dargestellt.

Fusion der Fragmente zur h5HT3A- Δ 4-EGFP-Sequenz

Die drei Fragmente aus dem vorangegangenen Abschnitt wurden nach der Gelelektrophorese aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. In einer weiteren PCR-Reaktion (PCR 4) wurden diese Fragmente als *Template* eingesetzt. Nach dem Aufschmelzen der DNA-Stränge während der PCR-Reaktion konnten die komplementären Sequenzen von Produkt 1 und 3 im Bereich des N-Terminus von EGFP und von Produkt 3 und 2 im Bereich des C-Terminus von EGFP als Einzelstränge aneinander binden. Die Primer 1 und 2 wurden verwendet, um die Stränge aufzufüllen oder in den folgenden Zyklen schon fusionierte Fragmente zu amplifizieren. Im PCR-Produkt von 2178 bp Länge lag die *BamHI*-Schnittstelle vor der Kozak-Sequenz, gefolgt von der DNA-Sequenz des Signalpeptids und den ersten vier Aminosäuren des Rezeptors. Dahinter schlossen sich die komplette EGFP-cDNA und der Rest der Rezeptor-Sequenz an, am 3'-Ende folgte noch die *XhoI*-Schnittstelle. Abbildung 48A gibt einen schematischen Überblick über PCR 4 und das resultierende Produkt. In Abbildung 48B ist das Foto

der Gelelektrophorese der Reaktionsprodukte dargestellt. Schwache Banden unspezifischer DNA-Sequenzen bzw. Nebenprodukte sind zwar zu erkennen, das Produkt in der erwarteten Größe bildet allerdings die stärksten Banden.

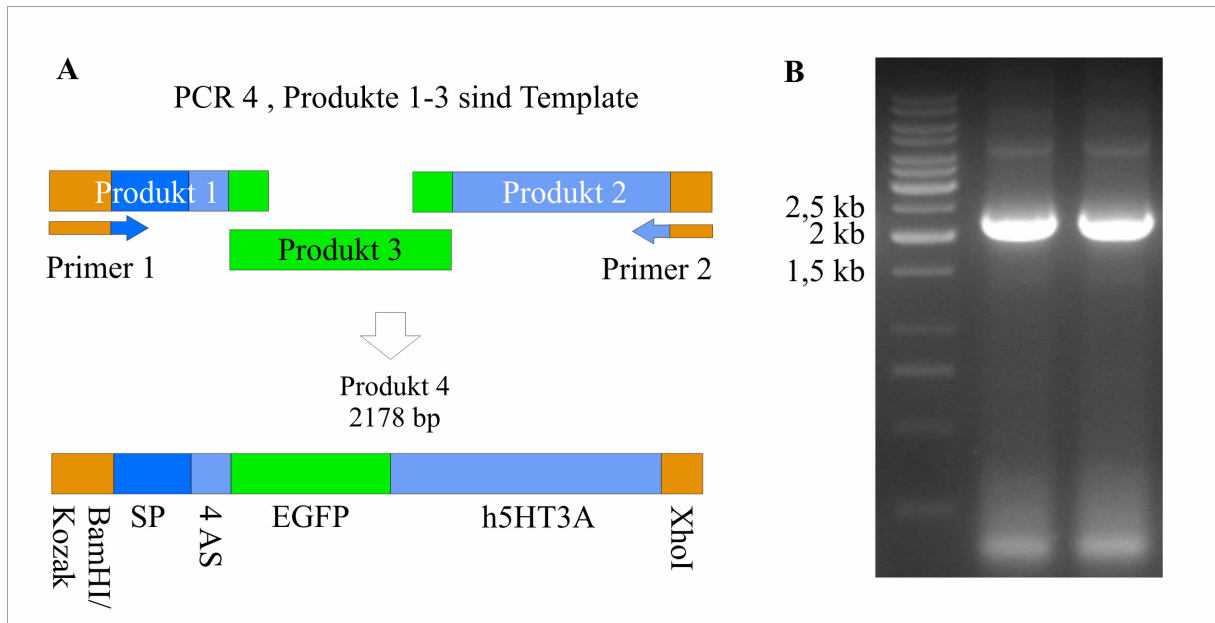


Abbildung 48: (A) Schema der letzten PCR zur Fusion der ersten drei PCR-Produkte. Nach dem Aufschmelzen in Einzelstränge haben sowohl die Primer als auch die Enden der drei DNA-Fragmente an ihre jeweils komplementären Sequenzen gebunden und die gewünschte Fusionssequenz entstand. (B) Gelfoto der aufgetrennten DNA-Fragmente aus der letzten PCR. Obwohl noch andere Sequenzen amplifiziert wurden, ist das erwartete Produkt (2178 bp) deutlich zu sehen.

Das Expressionsplasmid pcDNA3.1/h5HT3A-Δ4-EGFP

Das Einfügen der Sequenz des Fusionsproteins in den Vektor pcDNA3.1 wurde wie bei der Herstellung des Vektors pcDNA3.1/h5HT3A durchgeführt und wird hier nur kurz wiedergegeben:

Mit dem entstandenen PCR-Produkt ebenso wie mit dem Vektor pcDNA3.1 wurden Restriktionsreaktionen mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I durchgeführt, um komplementäre Einzelstrangenden zu erzeugen. Die DNA-Fragmente wurden nach den Restriktionsreaktionen durch Gelelektrophorese aufgetrennt und nach der Aufreinigung ligiert. *E.coli*-Bakterien wurden mit dem neuen Vektor pcDNA3.1/h5HT3A-D4-EGFP transformiert und auf Ampicillin-haltigen Selektions-Nährböden ausgestrichen. Bakterienkolonien mit dem gewünschten Plasmid wurden durch PCR-Screen mit den Primern 3 und 4 identifiziert. Die Plasmid-DNA dieser Bakterien wurde präpariert und sequenziert, um die neue cDNA zu verifizieren und Mutationen auszuschließen. Abbildung 49 zeigt eine Plasmidkarte des fertigen Expressionsplasmids pcDNA3.1/h5HT3A-Δ4-EGFP.

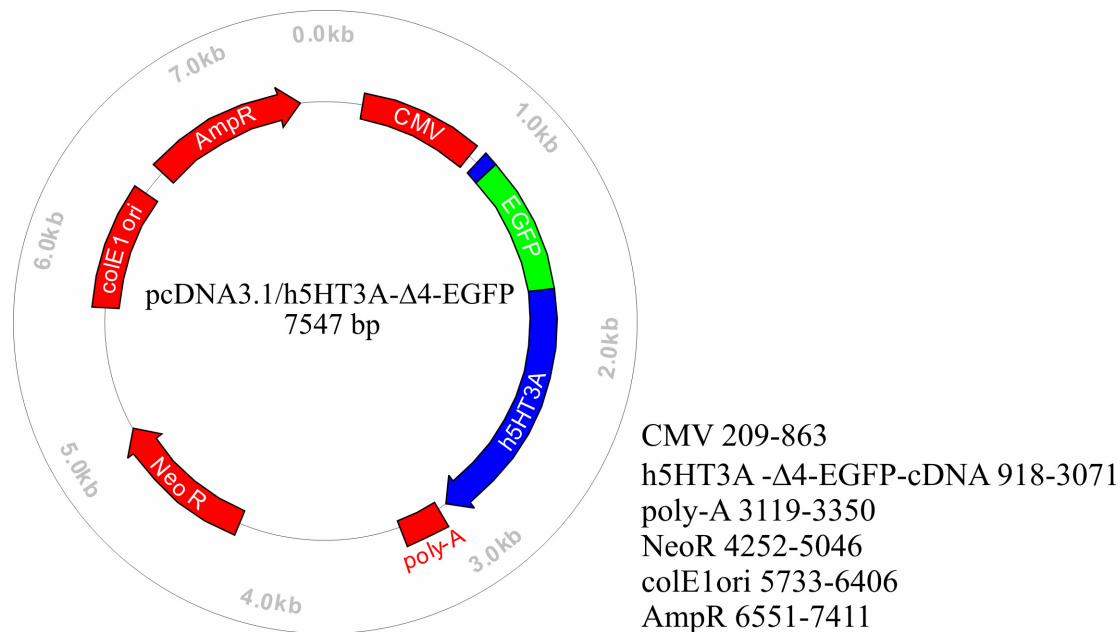


Abbildung 49: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pcDNA3.1/h5HT3A-Δ4-EGFP. Die wichtigsten Sequenzen des Plasmids sind rot markiert. Die EGFP-cDNA ist grün markiert, h5HT3A ist blau dargestellt. Die Sequenz für das Signalpeptid sowie vier anschließende Aminosäuren des Rezeptors liegt vor dem EGFP, die restliche cDNA des Rezeptors dahinter (CMV Cytomegaloviruspromotor, poly-A Polyadenylierungssignal, NeoR Neomycinresistenz, AmpR Ampicillin-Resistenz, colE1ori Replikationsursprung).

C Experimente zur Expression

Das Expressionsplasmid für den Serotonin-Rezeptor 5HT3A wurde aus der entsprechenden cDNA und dem Vektor pcDNA3.1 unter Berücksichtigung von Kozak-Sequenz, Restriktionsschnittstellen, usw. hergestellt. Zum Test ob ein solches Plasmid zur Expression des gewünschten Proteins führt, wurde in gleicher Weise das Expressionsplasmid pcDNA3.1/h5HT3A-Δ4-EGFP mit einem Fusionskonstrukt aus dem 5HT3A-Rezeptor und EGFP angefertigt. HEK-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transfiziert und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Anregungswellenlänge 488 nm, Emission 511 nm). Zum Vergleich wurden HEK-Zellen ebenfalls mit dem Plasmid pEGFP-C1 transfiziert, welches die Expression von EGFP im Cytosol von transfizierten Zellen bewirkte. Abbildung 50A zeigt eine Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von HEK-Zellen, die mit pEGFP-C1 transfiziert waren. Die Expression von EGFP in verschiedenen Zellen war unterschiedlich hoch. Die Fluoreszenz war aber bei allen Zellen gleichmäßig verteilt, da das exprimierte EGFP in alle Bereiche des Cytosols gelangen konnte.

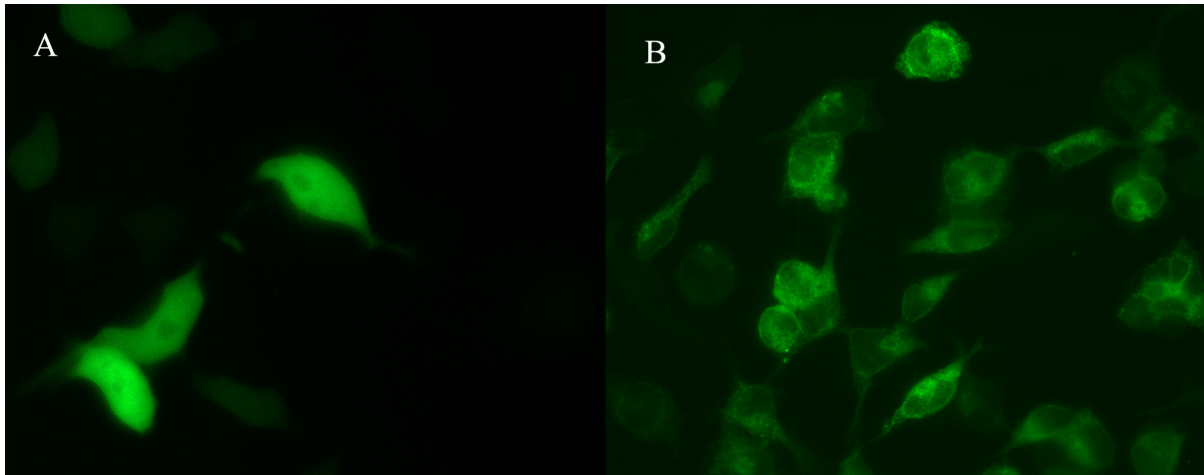


Abbildung 50: (A) Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von HEK-Zellen, die mit pEGFP-C1 transfiziert waren. Die Fluoreszenz ist gleichmäßig über die Zelle verteilt. (B) Aufnahme von HEK-Zellen, die mit dem Fusionskonstrukt pcDNA3.1/5HT3A-Δ4-EGFP transfiziert wurden. Die Fluoreszenz ist lokalisiert, vermutlich durch den Einbau der Rezeptoren in Membranorganellen wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat oder Plasmamembran.

Abbildung 50B zeigt eine Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von HEK-Zellen, die mit dem EGFP-Fusionskonstrukt transfiziert waren. Fluoreszierende Zellen sind zu erkennen, das Expressionsplasmid führte in HEK-Zellen somit zur Bildung des Fusionskonstruktes, obwohl auch hier der Expressionslevel innerhalb der Zellpopulation variierte. Die Fluoreszenz war im Gegensatz zu Abbildung 50A aber nicht mehr gleichmäßig über die Zelle verteilt, sondern schien in den Zellen lokalisierter zu sein. Dies beruht auf der Einlagerung des mit EGFP markierten Rezeptors in Membranorganellen (endoplasmatisches Retikulum, Golgi). Eine Fluoreszenzmarkierung der Plasmamembran konnte allerdings nicht von der Gesamtfluoreszenz der Zelle unterschieden werden.

Das Expressionsplasmid für den 5-HT3A-Rezeptor ohne fusioniertes EGFP (pcDNA3.1/h5HT3A) beinhaltet dieselben Komponenten bzw. Sequenzen (Restriktionsschnittstellen, Kozak-Sequenz, usw.) und beruht ebenfalls auf pcDNA3.1. Daher wurde hier davon ausgegangen, dass die Transfektion von HEK-Zellen mit pcDNA3.1/h5HT3A zur Expression des 5HT3A-Rezeptors führen würde. Dies wurde durch die elektrophysiologischen Messungen in Abschnitt 4.1 bestätigt, mit denen gleichzeitig die Membranlokalisierung der Kanäle nachgewiesen wurde.

Fluoreszenzmikroskopie

Für Fluoreszenzexperimente wurden HEK293-Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert. Die Deckgläschen wurden dazu wie folgt behandelt: Die Gläschen wurden mit 70° C heissem Glasreiniger (Tickopur) gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschliessend wurden die Gläschen für 30 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS) im Stickstoffstrom begast. Dabei wurden Methylgruppen an die Glasoberfläche adsorbiert, was zur Hydrophobisierung der Oberfläche führte. Die Gläschen wurden für weitere 30 min unter UV-Licht sterilisiert und über Nacht mit Fibronectinlösung der Konzentration 20-40 µg/ml inkubiert, um das Fibronectin auf der hydrophobisierten Glasoberfläche abzuscheiden.

Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz 1:4 (HEK) aufgeteilt und auf Kulturschalen mit behandelten Deckgläschen verteilt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden transiente Transfektionen mit pEGFP-C1 oder pcDNA3.1/5HT3A-Δ4-EGFP durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt:

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült, anschliessend mit Fixierlösung (4 % Formaldehyd (w/v), 0,5 % Triton-100 (w/v) in PBS) 30 min bei 4° C inkubiert. Die Zellen wurden mit Waschlösung (10 % BSA (w/v) und 0,5 % Triton-100 (w/v) in PBS) dreimal gespült, 15 min. an der Luft getrocknet und schliesslich mit "Glow Mounting Medium" auf Objektträger gebracht.

Bilder unter UV-Anregung wurden mit einem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss), ausgerüstet mit einer MicroMax CCD-Camera (Princeton Instruments) und einem Filtersatz für EGFP-Fluoreszenz (Anregung 488 nm, Emission 507-509 nm, aufgenommen. Kamerasteuerung und Bildbearbeitung wurden mit der Software IP-Lab von Princeton Instruments durchgeführt.

D Methode zur Simulation von Membranströmen

In diesem Abschnitt wird eine analytische Methode zur Lösung von Gleichung 24 beschrieben, wie sie auch in „Single-Channel Recording“ (Sakmann, B., Neher, E., Plenum Press) dargestellt ist.⁷⁰ Die Ratenkonstanten, die in den Gleichungen vor den Besetzungswahrscheinlichkeiten stehen, werden dazu in die $k \times k$ -Matrix Q überführt, mit $k = 12$ für die 12 Zustände in Abbildung 6. Für erlaubte Übergänge zwischen den Zuständen i und j befindet sich dabei in Q in Reihe i und Spalte j die Ratenkonstante des jeweiligen Überganges. Nicht erlaubte Übergänge bekommen in Q den Wert 0 zugewiesen. Somit sind alle Elemente der Matrix außer der Diagonalen ($i = j$) definiert. In der Diagonalen wird die Summe aller Ratenkonstanten der jeweilige Reihe i als negativer Wert eingesetzt. Für das verwendete Modell hat die Matrix folgende Form:

-0,04	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0
0	-0,04	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0
0	0	-0,04	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0
0,08	0	0	-1,46	1,28	0	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0	0	0,09	0	0
0	2,85	0	0,13	-3,68	0,64	0	0,07	0	0	0	0
0	0	0,09	0	0,16	-0,29	0	0	0,04	0	0	0
0	0	0	$6,2 \cdot 10^{-5}$	0	0	-1,28	1,28	0	0	0	0
0	0	0	0	$6,2 \cdot 10^{-5}$	0	0,13	-0,77	0,64	0	0	0
0	0	0	0	0	$6,2 \cdot 10^{-5}$	0	0,16	-0,16	0	0	0
0	0	0	1,92	0	0	0	0	0	-1,98	0,06	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,56	-2,53	0,03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,2	-3,2

Allgemeine Lösung

Obwohl die Zahl der Zustände im Modell in Abbildung 6 bekannt ist, wird hier zunächst eine allgemeine Lösung für ein Modell mit einer beliebigen Zahl k von Zuständen gezeigt. Die linke Seite des Gleichungssystems in Gleichung 24 kann als Vektor ausgedrückt werden als:

$$\frac{dp(t)}{dt} = \left[\frac{dp_1(t)}{dt} \quad \frac{dp_2(t)}{dt} \quad \dots \quad \frac{dp_k(t)}{dt} \right].$$

Gleichung 29

Die k Besetzungen $p_i(t)$ auf der rechten Seite des Gleichungssystems werden in einem Reihenvektor bzw. einer $1 \times k$ -Matrix $p(t)$ zusammengefasst, und die kinetischen Gleichungen, die das System beschreiben, können dann in Vektorschreibweise ausgedrückt werden als

$$\frac{dp(t)}{dt} = p(t)Q.$$

Gleichung 30

Zunächst wird die Besetzung der Zustände im Gleichgewicht ($t \rightarrow \infty$) berechnet. Gleichung 30 soll dann gelöst werden, um die Relaxation zur Gleichgewichtsbesetzung zu beschreiben

Die Besetzung der Zustände im Gleichgewicht

Im Gleichgewicht ändert sich die Besetzung der Zustände nicht mit der Zeit, so dass gilt:

$$0 = p(\infty)Q.$$

Gleichung 31

0 bezeichnet hier eine Matrix, in der alle Elemente 0 sind. Gesucht wird die Besetzung des Zustandes i im Gleichgewicht $p_i(\infty)$. Colquhoun und Hawkes beschreiben eine Methode, wie diese Besetzungen mittels der Determinanten von modifizierten Matrizen, die auf Q basieren, gefunden werden können.⁷¹ Für die Besetzung des i -ten Zustandes im Gleichgewicht werden zunächst aus Q die i -te Reihe und die i -te Spalte entfernt. Von der resultierenden Matrix Q' wird die Determinante $d_i(Q')$ bestimmt und durch die Summe aller k möglichen Werte von d geteilt:

$$p_i(\infty) = d_i(Q') / \sum_{j=1}^k d_j.$$

Gleichung 32

Relaxation zum Gleichgewicht

Die formale Lösung von Gleichung 30 lautet:

$$p(t) = p(0)e^{Qt}.$$

Gleichung 33

$p(0)$ enthält die Besetzungswahrscheinlichkeiten bei $t = 0$, beschreibt also den Grundzustand des Systems. Um die Funktion einer Matrix $f(Q)$ zu berechnen, wird hier die sog. Spektrale Expansion angewendet:

Um die Funktion $f(Q)$ einer $n \times n$ Matrix zu berechnen, kann die Lösung als Funktion der Eigenwerte λ von $-Q$ ausgedrückt werden:

$$f(Q) = \sum_{i=1}^{i=k} A_i f(\lambda_i).$$

Gleichung 34

Die A_i heißen spektrale Matrizen der Matrix Q und sind wie folgt definiert: Von der Matrix $-Q$ werden die k möglichen Eigenvektoren $x_1 \dots x_k$ bestimmt und als Spalten in der Matrix $X = [x_1 \dots x_k]$ zusammen gefasst.

Diese Matrix wird invertiert zu $Y = X^{-1}$. y_i soll dann ein Reihenvektor bzw. eine $1 \times k$ Matrix aus den Elementen der i -ten Reihe der Matrix Y sein. Die Spektralen Matrizen A_i ergeben sich dann aus

$$A_i = x_i y_i$$

Gleichung 35

mit $i = 1$ bis k .

Aus Gleichung 34 folgt:

$$e^{Qt} = \sum_{i=1}^k A_i e^{-\lambda_i t}$$

Gleichung 36

und die Lösung für Gleichung 33 lautet

$$p(t) = p(0) \sum_{i=1}^k A_i e^{-\lambda_i t}$$

Gleichung 37

Ein System mit k Zuständen kann als Summe von $k-1$ Exponentialtermen beschrieben werden. Für Q existieren k Eigenwerte und es folgen aus Gleichung 37 k Exponentialterme. Allerdings kann gezeigt werden, dass Q eine singuläre Matrix ist, so dass einer der i Eigenwerte von Q den Wert null hat. Da die Reihenfolge der Summation beliebig ist, wird dieser Eigenwert mit $\lambda_1 = 0$ definiert, so dass $e^{-\lambda_1 t} = e^0 = 1$ gilt. Für die anderen Eigenwerte kann gezeigt werden, dass sie real und positiv sind, und bei den anderen Summanden geht daher $e^{-\lambda_i t}$ gegen null für $t \rightarrow \infty$. Somit ergibt sich aus Gleichung 37 ein Grenzwert für $t \rightarrow \infty$:

$$p(\infty) = p(0) A_1$$

Gleichung 38

und der Term $p(0)A_1$ kann als $p(\infty)$ in Gleichung 37 vor den Summenterm gestellt werden. Mit $\lambda_i = 1/\tau_i$ als Zeitkonstanten des i -ten Terms folgt:⁷⁰

$$p(t) = p(\infty) + p(0) \sum_{i=2}^k A_i e^{-t/\tau_i}.$$

Gleichung 39

$p(t)$ ist ein Vektor, der den Besetzungsgrad aller Zustände zum Zeitpunkt t angibt. Die Komponenten von $p(\infty)$ können am einfachsten mit Gleichung 32 aus der Matrix Q berechnet werden. Gleichung 39 ist die allgemeine Lösung für ein beliebiges System zu jedem Zeitpunkt mit einer bekannten Zahl von Zuständen und bekannten Ratenkonstanten für die Übergänge zwischen den Zuständen.

Berechnung der Membranströme aus der Zustandsgleichung

Um den skalaren Membranstrom $I(t)$ zu bestimmen, müssen die Besetzungen $p_i(t)$ der Zustände mit deren Leitfähigkeiten γ_i multipliziert werden. Anschließend werden alle Komponenten zu einer Gesamtleitfähigkeit addiert und mit der Spannung über die Membran ($V-V_0$) und der Anzahl der Kanäle N multipliziert:

$$I = N(V - V_0) [\gamma_1 p_1 + \gamma_2 p_2 + \dots + \gamma_k p_k].$$

Gleichung 40

Aus Gleichung 39 folgt dann in skalarer Form für die Berechnung der Membranströme nach dem aufgestellten Modell:

$$I(t) = I(\infty) + \sum_{i=2}^k b_i e^{-t/\tau_i},$$

Gleichung 41

mit den skalaren Koeffizienten b_i der Exponentialterme

$$b_i = N(V - V_0) p(0) A_i v,$$

Gleichung 42

wobei v ein Vektor mit den k Leitfähigkeiten $\gamma_{1\dots k}$ der Zustände ist. Ausmultiplizieren der Matrizen A_i mit dem Vektor $p(0)$ liefert:

$$b_i = N(V - V_0) \sum_{r=1}^{r=k} \sum_{j=1}^{j=k} p_r(0) \gamma_j a_{ij}^{(i)},$$

Gleichung 43

mit $a_{ij}^{(i)}$ als Wert aus Reihe r und Spalte j der Matrix A_i .

E Abschätzung der Spaltspannung ohne *voltage clamp*

In diesem Abschnitt wird ein vereinfachtes Modell zur Berechnung der Spaltspannung von Zellen ohne *voltage clamp* entwickelt.

Ein-Kompartiment-Modell unter *voltage clamp*

Für Pipettenstrom und Spaltspannung unter *voltage clamp* gelten Gleichung 1 und Gleichung 4:

$$I_M = G_{FM}(V_M - V_0) + G_{JM}(V_M - V_J - V_0) + C_{FM} \frac{dV_M}{dt} + C_{JM} \frac{d}{dt}(V_M - V_J) \quad \text{Gleichung 1}$$

$$(c_{JM} + c_{Ox}) \frac{dV_J}{dt} = -g_J V_J + g_{JM}(V_M - V_J - V_0) + c_{JM} \frac{dV_M}{dt} \quad \text{Gleichung 4}$$

In Gleichung 1 werden die Leitfähigkeiten und Kapazitäten durch flächenspezifische Größen für die freie und adhärierte Membran (FM und JM) und die gesamte Membran (M) ersetzt: $C_i = c_i \cdot A_i$, $G_i = g_i \cdot A_i$ (s.a. Abschnitt 0). Die Kapazität c_{Ox} bezieht sich dabei ebenfalls auf die adhärierte Membran. Gleichung 1 wird durch A_{FM} geteilt, das Flächenverhältnis A_{JM}/A_{FM} wird als β geschrieben und der letzte, kapazitive Term wird aufgetrennt:

$$\frac{I_M}{A_{FM}} = g_{FM}(V_M - V_0) + \beta g_{JM}(V_M - V_J - V_0) + c_{FM} \frac{dV_M}{dt} + \beta c_{JM} \frac{dV_M}{dt} - \beta c_{JM} \frac{dV_J}{dt}. \quad \text{Gleichung 44}$$

Die spezifischen Membrankapazitäten sind für alle Membranbereiche gleich ($c_{JM} = c_{FM} = c_M$, s. Abschnitt 2.1.2) und betragen $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Außerdem kann $V_J \ll V_M - V_0$ angenommen werden. Aus Gleichung 2 folgt damit

$$c_M \frac{dV_M}{dt} = -g_{JM}(V_M - V_0) + (c_M + c_{Ox}) \frac{dV_J}{dt} + g_J V_J. \quad \text{Gleichung 45}$$

Ein-Kompartiment-Modell ohne *voltage clamp*

Im Fall ohne *voltage clamp* fließt kein Pipettenstrom ($I_M/A_{FM} = 0$) und Gleichung 44 wird zu

$$0 = g_{FM}(V_M - V_0) + \beta g_{JM}(V_M - V_0) + c_M \frac{dV_M}{dt}(1 + \beta) - \beta c_M \frac{dV_J}{dt}. \quad \text{Gleichung 46}$$

Das Membranpotential ist ohne *voltage clamp* nicht mehr konstant und kann durch einen Membranstrom mit der Zeitkonstante der Membranumladung $\tau_M = c_M/g_M$ depolarisiert werden. $V_M - V_0$ wird daher nun zeitabhängig ausgedrückt als Zerfall des Potentials, welches zum Zeitpunkt $t = 0$ anlag:

$$(V_M - V_0) = (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 47

Gleichung 45 kann in Gleichung 46 eingesetzt werden. Zusammenfassen liefert:

$$\frac{dV_J}{dt} + \frac{(1+\beta)g_J}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot V_J = -\frac{g_{FM} - g_{JM}}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot (V_M - V_0).$$

Gleichung 48

Einsetzen von Gleichung 47 ergibt die folgende Differentialgleichung:

$$\frac{dV_J}{dt} + \frac{(1+\beta)g_J}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot V_J = -\frac{g_{FM} - g_{JM}}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 49

Lösung der Differentialgleichung

Gleichung 49 ist eine inhomogene Differentialgleichung der Form $y' + Py = Q$, mit

$$P = \frac{(1+\beta)g_J}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \quad \text{und}$$

Gleichung 50

$$Q = -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 51

Die Lösung der Differentialgleichung lautet allgemein:

$$y(t) = e^{-I} \cdot \int Q e^{I} dt + c e^{-I}, \quad \text{mit}$$

Gleichung 52

$$I = \int P dt = \frac{(1+\beta)g_J}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot t = Pt.$$

Gleichung 53

Mit der allgemeinen Lösung (Gleichung 52) ergibt sich für $V_J(t)$:

$$V_J(t) = e^{-Pt} \cdot \int -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}} \cdot e^{Pt} dt + c e^{-I}.$$

Gleichung 54

Die Integrationskonstante muss aus dem folgenden Grund null sein: Das Membranpotential der Zelle wird bei offenen Kanälen depolarisiert, so dass die Triebkraft des Stromes verschwindet. Wenn kein Strom mehr fließt, muss auch die Spaltspannung $V_J(t)$ null sein. Gleichung 54 muss dementsprechend irgendwann null werden können, was nur möglich ist, wenn auch $c e^{-I} = 0$ möglich ist. Dafür muss entweder die Integrationskonstante $c = 0$ sein, womit der letzte Term entfällt, oder e^{-I} wird irgendwann null. Letzteres trifft nur für $I = \infty$ zu, wofür $t = \infty$ sein muss, da sonst nur Konstanten in Gleichung 53 auftauchen. Die Dauer eines Transistorsignales wird aber durch die Zeitkonstante der Membranumladung τ_M eingeschränkt (etwa $100 \mu\text{s} - 1 \text{ms}$), d.h. es muss gelten $V_J(t) = 0$ bei $t \ll t_\infty$. In diesem Zeitbereich wird e^{-I} nicht null, daher muss gelten $c = 0$ und aus Gleichung 54 folgt:

$$V_J(t) = e^{-Pt} \cdot \int -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M} + Pt} dt.$$

Gleichung 55

Die Integration ergibt dann:

$$V_J(t) = -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot \frac{\tau_M}{-1 + P\tau_M} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 56

Folgende Zusammenfassungen werden definiert:

$$\tilde{c}_M = \frac{c_M}{(1+\beta)} \text{ und}$$

Gleichung 57

$$\tilde{\tau}_J = \frac{\tilde{c}_M + c_{Ox}}{g_J}.$$

Gleichung 58

Damit folgt aus Gleichung 50

$$P = \frac{(1+\beta)g_J}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} = \frac{(1+\beta)g_J}{(1+\beta)(c_{Ox} + \frac{c_M}{(1+\beta)})} = \frac{g_J}{c_{Ox} + \tilde{c}_M} = \frac{1}{\tilde{\tau}_J}.$$

Gleichung 59

In Gleichung 56 kann P also mit $1/\tilde{\tau}_J$ ersetzt werden. Außerdem wird der erste Term wie folgt umgeformt:

$$\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{(1+\beta)c_{Ox} + c_M} = \frac{(g_{FM} - g_{JM})g_J}{g_J(1+\beta)c_{Ox} + g_Jc_M} = \frac{(g_{FM} - g_{JM})g_J}{g_J(1+\beta)(c_{Ox} + \frac{c_M}{(1+\beta)})} = \frac{(g_{FM} - g_{JM})}{g_J(1+\beta)} \cdot \frac{1}{\tilde{\tau}_J},$$

Gleichung 60

und aus Gleichung 56 ergibt sich damit:

$$V_J(t) = -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{g_J(1+\beta)} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot \frac{1}{1 - \frac{\tau_J}{\tau_M}} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 61

Für die Zeitkonstanten kann $\tau_J \ll \tau_M$ angenommen werden, und es folgt

$$V_J(t) = -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{g_J(1+\beta)} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 62

Mit dieser Gleichung kann die Spaltspannung zu jedem Zeitpunkt berechnet werden.

Ersetzen der spezifischen Leitfähigkeiten g_{JM} und g_{FM}

Die spezifischen Leitfähigkeiten in Gleichung 62 können durch das Flächenverhältnis $\beta = A_{JM}/A_{FM}$ und das Leitfähigkeitsverhältnis $\mu = g_{JM}/g_{FM}$ ausgedrückt werden. Aus Gleichung 63 wird zunächst:

$$V_J(t) = -\frac{(g_{FM} - g_{JM})}{g_M(1+\beta)} \cdot \frac{g_M}{g_J} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 63

Für die Gesamtleitfähigkeit und die Leitfähigkeiten der Teilmembranen gilt:

$$A_M g_M = A_{JM} g_{JM} + A_{FM} g_{FM}.$$

Gleichung 64

Für g_{FM} folgt mit den oben genannten Quotienten:

$$g_{FM} = \frac{A_M g_M - A_{JM} g_{JM}}{A_{FM}} = \frac{(A_{FM} + A_{JM}) g_M}{A_{FM}} - \frac{A_{JM} g_{JM}}{A_{FM}} = (1+\beta) g_M - \beta g_{JM} = g_M \frac{(1+\beta)}{(1+\beta\mu)},$$

Gleichung 65

und g_{JM} wird zu:

$$g_{JM} = \frac{A_M g_M - A_{FM} g_{FM}}{A_{JM}} = \frac{(A_{FM} + A_{JM}) g_M}{A_{JM}} - \frac{1}{\beta} g_{FM} = \left(1 + \frac{1}{\beta}\right) g_M - \frac{1}{\beta} g_{FM} = g_M \frac{(\beta\mu + \mu)}{(1+\beta\mu)}.$$

Gleichung 66

Für $g_{FM} - g_{JM}$ gilt dann:

$$g_{FM} - g_{JM} = g_M \left(\frac{1+\beta-\beta\mu-\mu}{1+\beta\mu} \right) = g_M \frac{(1+\beta)(1-\mu)}{(1+\beta\mu)},$$

Gleichung 67

und einsetzen in Gleichung 63 liefert:

$$V_J(t) = -\frac{1}{g_M(1+\beta)} \cdot g_M \frac{(1+\beta)(1-\mu)}{(1+\beta\mu)} \cdot \frac{g_M}{g_J} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}},$$

Gleichung 68

oder schliesslich

$$V_J(t) = -\frac{(1-\mu)}{(1+\beta\mu)} \cdot \frac{g_M}{g_J} \cdot (V_M^0 - V_0^0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_M}}.$$

Gleichung 69

In Gleichung 69 tauchen nur noch die Leitfähigkeiten g_M und g_J auf und die Spaltspannung V_J zerfällt mit der Zeitkonstanten der Membranumladung.

F Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Agar, Becton Dickinson, Artikel-Nr. 214010
Agarose, Serva, Artikel-Nr. 11396
Ampicillin, Fluka, Artikel-Nr. 10044
BSA (Immunfluoreszenz), Sigma, Artikel-Nr. A-7888
BSA (PCR), MBI Fermentas, Artikel-Nr. #EP0072
CaCl₂, Merck, Artikel-Nr. 102388
Caseinhydrolysat, Fluka, Artikel-Nr. 70171
CPBG, Sigma, Artikel-Nr. C-144
CsCl₂, Biomol, Artikel-Nr. 02452
Deckgläschen, Roth, Artikel-Nr. 0657
D-Glucose, Sigma, Artikel-Nr. G-7021
DMEM, Gibco, Artikel-Nr. 21885-O25
DNA-Größenstandard, MBI Fermentas, Artikel-Nr. #SM0241 (100 bp)
DNA-Größenstandard, MBI Fermentas, Artikel-Nr. #SM0311 (1000 bp)
DNA-Probenpuffer, MBI Fermentas, Artikel-Nr. #R0411S
dNTP, MBI Fermentas, Artikel-Nr. #R0181
EDTA, Sigma, Artikel-Nr. E-5134
EGTA, Sigma, Artikel-Nr. E-4378
Eisessig, Merck, Artikel-Nr. 100063
Eppendorfreaktionsgefäße, Eppendorf, Artikel-Nr. 0030120.86
Ethidiumbromid, Biorad, Artikel-Nr. 161-0493, 10 mg/ml
Falcon-Reaktionsgefäße, Falcon, Artikel-Nr. 2070
Fibronectin, Sigma, Artikel-Nr. F-2006
fetales Kälberserum, Gibco, Artikel-Nr. 100270-106
Geneticin, Sigma, Artikel-Nr. A-1720
Glow Mounting Medium, Energene, Artikel-Nr. M0010010
Hefeextrakt, Difco, Artikel-Nr. 212750
Hepes, Sigma, H-9136
HMDS, Merck, Artikel-Nr. 111409
Isopropanol, Merck, Artikel-Nr. 109634
KCl, Merck, Artikel-Nr. 104933
L-Glutamin, Gibco, Artikel-Nr. 25030-024, 200 mM
MgCl₂ (patch clamp, SOC-Medium), Merck, Artikel-Nr. 105832
MgCl₂ (PCR), MBI Fermentas, Artikel-Nr. #EP0072
MgSO₄, Sigma, Artikel-Nr. M-2643
NaCl, Merck, Artikel-Nr. 6404
Objektträger, Roth, Artikel-Nr. H868
Paraformaldehyd, Fluka, Artikel-Nr. 76240

PBS, Gibco, Artikel-Nr. 14040-090
PCR-Gefäße, Stratagene, Artikel-Nr. #410090
Petrischalen 9,4 cm Ø, Greiner Labortechnik, Artikel-Nr. 633161
Pipettengläser, Vitrex, Artikel-Nr. 1387
Pipettenspitzen 0,5-20 µl, Eppendorf, Artikel-Nr. 6127961
Pipettenspitzen 2,5 ml, Eppendorf, Artikel-Nr. 146945010
Pipettenspitzen 2-200 µl, Eppendorf, Artikel-Nr. 6127962
Pipettenspitzen 50-1000 µl, Eppendorf, Artikel-Nr. 6127963
Plastikpipetten 10 ml, Greiner Labortechnik, Artikel-Nr. 607180
Plastikpipetten 25 ml, Greiner Labortechnik, Artikel-Nr. 760180
Plastikpipetten 5 ml, Greiner Labortechnik, Artikel-Nr. 606180
Serotonin, Sigma, Artikel-Nr. H-9523
Tickopur, Dr. H. Stamm GmbH, Artikel-Nr. 30475
Tris, Roth, Artikel-Nr. 4855.2
Triton-100, Roth, Artikel-Nr. 6683.1
Tropisetron, Sigma, Artikel-Nr. T-104
Trypton, Becton Dickinson, Artikel-Nr. 211705
Ultrax 102 S, KLN Ultraschallgesellschaft
Zellkulturschalen 35 mm Ø, Falcon, Artikel-Nr. #3001

Literaturverzeichnis

- [1] P. Thomas and T. G. Smart. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187-200 (2005).
- [2] B. Straub, E. Meyer and P. Fromherz. Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing. *Nat. Biotechnol.* **19**, 121-4 (2001).
- [3] M. Schmidtner and P. Fromherz. Functional Na⁺ channels in cell adhesion probed by transistor recording. *Biophys. J.* **90**, 183-9 (2006).
- [4] Y. Iwanaga, D. Braun and P. Fromherz. No correlation of focal contacts and close adhesion by comparing GFP-vinculin and fluorescence interference of Dil. *Eur. Biophys. J.* **30**, 17-26 (2001).
- [5] R. Gleixner and P. Fromherz. The extracellular electrical resistivity in cell adhesion. *Biophys. J.* **90**, 2600-11 (2006).
- [6] R. Weis, B. Muller and P. Fromherz. Neuron adhesion on a silicon chip probed by an array of field-effect transistors. *Phys. Rev. Lett.* **76**, 327-30 (1996).
- [7] S. Vassanelli and P. Fromherz. Transistor probes local potassium conductances in the adhesion region of cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 6767-6773 (1999).
- [8] P. Fromherz, C. O. Muller and R. Weis. Neuron transistor: electrical transfer function measured by the patch-clamp technique. *Phys. Rev. Lett.* **71**, 4079-82 (1993).
- [9] C. N. Connolly et al. Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9899-904 (1996).
- [10] M. Brittinger and P. Fromherz. Field-effect transistor with recombinant potassium channels: fast and slow response by electrical and chemical interactions. *Appl. Physics A* **81**, 439-447 (2005).
- [11] D. D. Mott et al. Open probability of homomeric murine 5-HT_{3A} serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J. Physiol. (Lond)*. **535**, 427-43 (2001).
- [12] J. Kupper. Functional expression of GFP-tagged Kv1.3 and Kv1.4 channels in HEK 293 cells. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 3908-12 (1998).
- [13] E. J. Molinari et al. Up-regulation of human alpha7 nicotinic receptors by chronic treatment with activator and antagonist ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **347**, 131-9 (1998).
- [14] K. Matsuda et al. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **100**, 43-52 (2002).
- [15] M. Voelker and P. Fromherz. Signal transmission from individual mammalian nerve cell to field-effect transistor. *Small* **1**, 206-210 (2005).

- [16] M. Barann et al. Recombinant human 5-HT_{3A} receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 255-65 (2000).
- [17] A. M. Brown et al. Ion permeation and conduction in a human recombinant 5-HT₃ receptor subunit (h5-HT_{3A}). *J. Physiol. (Lond)*. **507 (Pt 3)**, 653-65 (1998).
- [18] B. J. Jones and T. P. Blackburn. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 555-68 (2002).
- [19] G. Hapfelmeier et al. Cloned human and murine serotonin(3A) receptors expressed in human embryonic kidney 293 cells display different single-channel kinetics. *Neurosci. Lett.* **335**, 44-8 (2002).
- [20] S. Lankiewicz et al. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine₃ receptor cDNA and its splice variants from guinea pig. *Mol. Pharmacol.* **53**, 202-12 (1998).
- [21] A. E. Dubin et al. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) receptor subunit. *J. Biol. Chem.* **274**, 30799-810 (1999).
- [22] N. Hussy, W. Lukas and K. A. Jones. Functional properties of a cloned 5-hydroxytryptamine ionotropic receptor subunit: comparison with native mouse receptors. *J. Physiol. (Lond)*. **481 (Pt 2)**, 311-23 (1994).
- [23] M. Bruss et al. Modified 5-HT_{3A} receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT_{3A} receptor isoforms. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 392-401 (2000).
- [24] B. Eisensamer et al. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT₃) receptor. *Mol. Psychiatry* **8**, 994-1007 (2003).
- [25] J. A. Peters, T. G. Hales and J. J. Lambert. Divalent cations modulate 5-HT₃ receptor-induced currents in N1E-115 neuroblastoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **151**, 491-5 (1988).
- [26] N. Lobitz et al. A single amino-acid in the TM1 domain is an important determinant of the desensitization kinetics of recombinant human and guinea pig alpha-homomeric 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol. Pharmacol.* **59**, 844-51 (2001).
- [27] A. V. Maricq et al. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* **254**, 432-7 (1991).
- [28] M. J. Gunthorpe and S. C. Lummis. Diltiazem causes open channel block of recombinant 5-HT₃ receptors. *J. Physiol. (Lond)*. **519 (Pt 3)**, 713-22 (1999).
- [29] L. J. Steward et al. Importance of phenylalanine 107 in agonist recognition by the 5-hydroxytryptamine(3A) receptor. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1249-55 (2000).
- [30] P. Vanysek. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (ed. Lide, D. R.) (CRC Press, Boca Raton, 2001).
- [31] B. Straub. Kopplung von Feldeffektransistoren mit rekombinanten Ionenkanälen. *Dissertation*, Technische Universität München, 2001

- [32] David R. Lide. *Handbook of Chemistry and Physics* (ed. Lide, D. R.) (2001).
- [33] D. Braun and P. Fromherz. Fluorescence interferometry of neuronal cell adhesion on microstructured silicon. *Phys. Rev. Lett.* **81**, 5241-4 (1998).
- [34] N. Burnashev. Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium* **24**, 325-32 (1998).
- [35] Z. Zhou and E. Neher. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* **425**, 511-7 (1993).
- [36] B. L. Tang. Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J. Neurochem.* **79**, 923-30 (2001).
- [37] P. Urquhart, S. Pang and N. M. Hooper. N-glycans as apical targeting signals in polarized epithelial cells. *Biochem. Soc. Symp.*, 39-45 (2005).
- [38] M. S. Bretscher. Moving membrane up to the front of migrating cells. *Cell* **85**, 465-7 (1996).
- [39] G. Panyi. Biophysical and pharmacological aspects of K⁺ channels in T lymphocytes. *Eur. Biophys. J.* **34**, 515-29 (2005).
- [40] A. Lambacher et al. Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at 7.8 μ m resolution. *Appl. Physics A* **79**, 1607-1611 (2004).
- [41] R. K. Reinscheid et al. High-throughput real-time monitoring of Gs-coupled receptor activation in intact cells using cyclic nucleotide-gated channels. *Eur. J. Pharmacol.* **478**, 27-34 (2003).
- [42] E. Martinez-Salas. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 458-64 (1999).
- [43] E.R. Kandel, J. H. Schwartz and T. M. Jessell. *Neurowissenschaften* (Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1996).
- [44] G. Löffler and P. E. Petrides. *Biochemie & Pathobiochemie* (Springer Verlag, Heidelberg, 2003).
- [45] E. A. Fon and R. H. Edwards. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve* **24**, 581-601 (2001).
- [46] E. Weihe and L. E. Eiden. Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. *FASEB J.* **14**, 2435-49 (2000).
- [47] J. D. Erickson and H. Varoqui. Molecular analysis of vesicular amine transporter function and targeting to secretory organelles. *FASEB J.* **14**, 2450-8 (2000).
- [48] J. Haase et al. Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 722-8 (2001).
- [49] J. A. Schmid, H. Just and H. H. Sitte. Impact of oligomerization on the function of the human serotonin transporter. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 732-6 (2001).

- [50] C. Mazzia, G. A. Hicks and N. Clerc. Neuronal location of 5-hydroxytryptamine₃ receptor-like immunoreactivity in the rat colon. *Neuroscience* **116**, 1033-41 (2003).
- [51] D. Hoyer, J. P. Hannon and G. R. Martin. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533-54 (2002).
- [52] EMBL-EBI. Ligand-Gated Ion Channel database, <http://www.ebi.ac.uk/compneur-srv/LGICdb/LGICdb.php>
- [53] A. Keramidas et al. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86**, 161-204 (2004).
- [54] L. Stryer. *Biochemie* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995).
- [55] A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi and N. Unwin. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **424**, 949-55 (2003).
- [56] A. Miyake et al. Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol. Pharmacol.* **48**, 407-16 (1995).
- [57] P. A. Davies et al. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* **397**, 359-63 (1999).
- [58] B. Niesler et al. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* **310**, 101-11 (2003).
- [59] S. P. Kelley et al. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* **424**, 321-4 (2003).
- [60] F. E. Bloom and M. Morales. The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders. *Neurochem. Res.* **23**, 653-9 (1998).
- [61] L. Farber et al. Physiology and pathophysiology of the 5-HT₃ receptor. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 2-8 (2004).
- [62] B. L. Fiebich et al. Expression of 5-HT_{3A} receptors in cells of the immune system. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 9-11 (2004).
- [63] S. T. Cooper and N. S. Millar. Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha₇ subunit. *J. Neurochem.* **68**, 2140-51 (1997).
- [64] M. Stocker, M. Hellwig and D. Kerschensteiner. Subunit assembly and domain analysis of electrically silent K⁺ channel alpha-subunits of the rat Kv9 subfamily. *J. Neurochem.* **72**, 1725-34 (1999).
- [65] L. N. Manganas and J. S. Trimmer. Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 29685-93 (2000).
- [66] C. Deutsch and L. Q. Chen. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10036-40 (1993).
- [67] M. Kozak. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125-48 (1987).

- [68] B. David-Watine et al. Functional integrity of green fluorescent protein conjugated glycine receptor channels. *Neuropharmacology* **38**, 785-92 (1999).
- [69] R. Grailhe et al. Distinct subcellular targeting of fluorescent nicotinic alpha 3 beta 4 and serotonergic 5-HT3A receptors in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 855-62 (2004).
- [70] B. Sakmann and E. Neher. *Single-Channel Recording* (Plenum Press, New York, 1995).
- [71] D. Colquhoun and A. G. Hawkes. A note on correlations in single ion channel records. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **230**, 15-52 (1987).

Danksagung

Zum Schluss bedanke ich mich bei den Personen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Peter Fromherz für das Projekt und die Betreuung
- Dr. Moritz Völker für die Bereitstellung der Chips
- Dr. Janosch Lichtenberger, Frank Wallrapp und Michael Hutzler für das Korrekturlesen
- Alexander Kunze, Walter Wagner und Robert Papst für die Arbeiten am Setup
- den Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik für die hilfreichen Diskussionen und die angenehme Atmosphäre

Ingmar Peitz

Schule

1990-1996: Gymnasium Hankensbüttel

Juni 1996: Abitur (LF Biologie und Chemie)

Wehrdienst

August 1996 – Mai 1997: Wehrdienst bei der Panzerlehrbrigade 9 in Munster

(Ausbildung zum Richtfunker)

Studium

Oktober 1997: Immatrikulation im Fach Biochemie (Diplom) an der Universität Hannover

September 1999: Vordiplom in Physik, Biologie, Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Biochemie

Februar 2002: Diplomprüfung in den Fächern

Biochemie

Immunologie

Biophysikalische Chemie

Februar 2002 – Oktober 2002: Diplomarbeit

Max-Planck-Institut für Biochemie in München

Abteilung Membran- und Neurophysik, Prof. Fromherz,

Titel: „Zur Anreicherung des KV1.3-Kaliumkanals auf Transistorchips durch Fusion einer C-terminalen Signalsequenz“,

November 2002: Diplom der Universität Hannover im Fach Biochemie