

---

**Kapazitive Aktivierung von  
Calciumkanälen mit Halbleiterchips:  
Auf dem Weg zur extrazellulären Kontrolle  
neuronaler Wachstumskegel**

**Kerstin Scheidt**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

angefertigt am Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Membran- und Neurophysik

vorgelegt von  
Kerstin Scheidt  
München, 25.02.2009

Erstgutachter:

Prof. Dr. Benedikt Grothe

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Axel Borst

Tag der mündlichen Prüfung:

15.06.2009

## Zusammenfassung

Hybride Systeme aus neuronalen Netzwerken und mikroelektronischen Chips werden zur Aufklärung von Netzwerkprozessen wie Lernvorgängen und Gedächtnisbildung eingesetzt. Systematische Experimente zur Netzwerkdynamik sind nur mit einer wohldefinierten Topologie der synaptischen Verknüpfungen möglich. Grundvoraussetzung dafür ist das benutzerdefinierte Richtungswachstum der Neuriten.

In der vorliegenden Arbeit werden die Grundlagen dafür gelegt, das Richtungswachstum vom Chip aus über extrazelluläre elektrische Stimulation der Wachstumskegel zu steuern. Die intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  von Wachstumskegeln spielt bei neuronalen Wachstumsprozessen eine entscheidende Rolle. Der Grundgedanke der Arbeit ist die chipgesteuerte Manipulation von  $[Ca^{2+}]_i$  in Wachstumskegeln über extrazelluläre Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (*Voltage Dependent  $Ca^{2+}$ -Channels*, VDCCs) zur Steuerung des Richtungswachstums. Um undefinierte Effekte durch direkte Ströme zu vermeiden, werden isolierte Halbleiterchips verwendet, die nur kapazitive Ströme zulassen und die kapazitive Aktivierung von spannungsabhängigen Kanälen ermöglichen. Zellschädigung durch Elektroporation wird ebenfalls vermieden.

Die Experimente werden an zwei Modellsystemen durchgeführt:

Im ersten Teil der Arbeit wird die kapazitive Aktivierung der Kanäle unter *Voltage Clamp*- und *Current Clamp*-Bedingungen an HEK293-Zellen studiert, die den L-Typ VDCC  $Ca_v1.2$  exprimieren. Ihre kleine Kopplungsfläche wird über einen hochohmigen Badelektrolyten kompensiert. Die eingeströmten  $Ca^{2+}$ -Ionen werden mit Hilfe von Fura-2 Fluoreszenzmikroskopie detektiert. In diesem einfachen Modellsystem führt die kapazitive Stimulation zur Aktivierung von  $Ca_v1.2$  und die repetitive Stimulation hat einen starken  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zur Folge.

Im zweiten Teil der Arbeit werden große, immotile Wachstumskegel von A-Cluster-Neuronen der Süßwasserschnecke *Lymnaea stagnalis* in physiologischem Badelektrolyten stimuliert.  $[Ca^{2+}]_i$  der Wachstumskegel wird dabei mit Fura-2 Fluoreszenzmikroskopie überwacht. Die Messungen zeigen deutliche  $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten bei repetitiver Stimulation. Als Signalmechanismus werden kapazitive Kanalöffnung und die Ausbildung von Aktionspotentialen diskutiert. Die Morphologie der Wachstumskegel vor, während und nach repetitiver Stimulation zeigt eine deutliche strukturelle Reorganisation, die mit Kollaps und repulsivem Richtungswachstum in Zusammenhang gebracht werden kann.

Die vorgestellten Ergebnisse sind der erste Schritt auf dem Weg hin zur kapazitiven Kontrolle des Richtungswachstums von Neuriten auf Halbleiterchips. Weitere Experimente mit kleineren, motilen Wachstumskegeln und asymmetrischer Stimulation müssen folgen, um chipgesteuertes Richtungswachstum zu erreichen.



## Abstract

Hybrid systems of neural networks and microelectronic chips can be used to elucidate network processes like learning and memory. Systematic experiments on network dynamics require a well defined topology of the synaptic connections. A prerequisite is the user-defined directional outgrowth of neurites.

This thesis provides the basis for chip-controlled directional outgrowth by extracellular electrical stimulation of growth cones. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  of growth cones is known to play a decisive role in neural outgrowth. The basic idea of the present thesis was to manipulate  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by extracellular stimulation of voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channels (VDCCs) to steer growth cone guidance. To avoid undefined effects of direct current semiconductor chips were used. They only allow capacitive currents and activate voltage dependent ion channels capacitively. Cell damage by electroporation is avoided.

The experiments are performed in two different model systems:

In the first part of the thesis, capacitive opening of VDCC is studied in HEK293 cells expressing L-type VDCC  $\text{Ca}_v1.2$  under whole cell voltage clamp and current clamp conditions. The small coupling area of the HEK293 cells is compensated by an electrolyte of high resistivity. We detect the  $\text{Ca}^{2+}$  influx by Fura-2 fluorescence microscopy. In this simple model system capacitive stimulation activates  $\text{Ca}_v1.2$  and repetitive stimulation causes a strong  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cells.

In the second part, large nonmotile growth cones of A-cluster neurons from fresh water snail *Lymnea stagnalis* are stimulated in physiological electrolyte. Growth cone  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is monitored by Fura-2 fluorescence microscopy. Repetitive capacitive stimulation is shown to induce profound changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . For the mechanism, capacitive activation of VDCCs and generation of action potentials are discussed. Observation of growth cone morphology before, during and after repetitive stimulation reveals significant structural reorganisation that relates to growth cone collapse and repulsion.

The present work provides a first step towards capacitive control of growth cone guidance on semiconductor chips. Further experiments with smaller, motile growth cones and asymmetric stimulation have to be performed to achieve chip-controlled directional neurite outgrowth.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation . . . . .	1
1.2	Ca <sup>2+</sup> und das Richtungswachstum von Neuriten . . . . .	2
1.3	Extrazelluläre Stimulation mit Halbleiterchips . . . . .	3
1.4	Spannungsabhängige Calciumkanäle in Vertebraten und Invertebraten . . . . .	4
1.5	HEK-Zellen mit rekombinanten L-Typ Calciumkanälen . . . . .	6
1.6	Immotile Wachstumskegel von <i>Lymnea stagnalis</i> . . . . .	6
1.7	Gliederung der vorliegenden Arbeit . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Prinzip der kapazitiven Stimulation</b>	<b>11</b>
2.1	Zwei-Domänen-Modell . . . . .	11
2.2	Spannungsabfall im Bad . . . . .	13
2.3	Spannungsabfall im Spalt . . . . .	13
2.4	Wirkung kapazitiver Stimulation auf Zellen . . . . .	13
2.5	Stimulationsrampen zur kapazitiven Öffnung von Kanälen . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Stimulationschips . . . . .	19
3.2	HEK-Zellen mit rekombinanten L-Typ Calciumkanälen . . . . .	22
3.3	Wachstumskegel von Schneckenneuronen . . . . .	29
3.4	<i>Patch Clamp</i> -Messungen an HEK-Zellen . . . . .	32
3.5	Fluoreszenzmikroskopie mit Fura-2 . . . . .	33
3.6	Messaufbau . . . . .	38
<b>4</b>	<b>Kapazitive Öffnung von Ca<sub>v</sub>1.2 in HEK-Zellen</b>	<b>41</b>
4.1	Elektrophysiologie von Ca <sub>v</sub> 1.2 . . . . .	41
4.2	Kapazitive Öffnung von Ca <sub>v</sub> 1.2 in <i>Voltage Clamp</i> . . . . .	45
4.3	Kapazitive Öffnung von Ca <sub>v</sub> 1.2 in <i>Current Clamp</i> . . . . .	56
4.4	Zusammenfassung . . . . .	60
<b>5</b>	<b>Fluoreszenzoptischer Nachweis des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in HEK-Zellen</b>	<b>61</b>
5.1	<i>Voltage Clamp</i> - Bedingungen . . . . .	61
5.2	<i>Current Clamp</i> - Bedingungen . . . . .	65
5.3	Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette . . . . .	69
5.4	Zusammenfassung . . . . .	71

<b>6</b>	<b>Wirkung kapazitiver Stimulation auf <math>[Ca^{2+}]_i</math> in Wachstumskegeln</b>	<b>73</b>
6.1	Kapazitive Stimulation erhöht $[Ca^{2+}]_i$ . . . . .	75
6.2	Einfluss der Rampensteilheit . . . . .	78
6.3	Ortsselektivität kapazitiver Stimulation . . . . .	79
6.4	Beteiligung von VDCCs an der Reaktion auf kapazitive Stimulation . . . . .	84
6.5	Zusammenfassung . . . . .	94
<b>7</b>	<b>Wirkung kapazitiver Stimulation auf die Morphologie von Wachstumskegeln</b>	<b>95</b>
7.1	Kapazitive Stimulation führt zu Veränderungen der Morphologie . . . . .	96
7.2	Morphologieänderung durch Aktionspotentiale . . . . .	99
7.3	Morphologieänderung durch kapazitive Kanalöffnung . . . . .	102
7.4	Zusammenfassung . . . . .	105
<b>8</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>107</b>
8.1	Kapazitive Aktivierung von $Ca_v1.2$ in HEK-Zellen . . . . .	107
8.2	Kapazitive Stimulation von Wachstumskegeln: lokale und globale $[Ca^{2+}]_i$ - Signale . . . . .	108
8.3	Morphologieänderung, Kollaps und repulsives Richtungswachstum . . . . .	109
8.4	Galvanotropismus und kapazitive Stimulation . . . . .	111
<b>A</b>	<b>Ergänzungen</b>	<b>115</b>
A.1	Kapazitive Öffnung von $Ca_v1.2$ in HEK-Zellen in physiologischer Messlösung . . . . .	115
A.2	Signalprofil von Wachstumskegeln bei elektroporierender Stimulation . . . . .	117
A.3	Protokolle Molekularbiologie . . . . .	120
A.4	Verwendete Materialien . . . . .	121
A.5	Abkürzungen . . . . .	133
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>147</b>
	<b>Ehrenwörtliche Versicherung und Erklärung</b>	<b>149</b>

# Kapitel 1

## Einführung

### 1.1 Motivation

Die Neurotechnologie verbindet die ionische Welt der Neurone mit der Welt der Mikroelektronik, um eine bidirektionale elektrische Kommunikation zwischen den beiden herzustellen. Die hybriden neuroelektronischen Systeme sind ein vielseitiges Werkzeug für diverse Forschungsfelder:

1. Die Neurowissenschaften nutzen neuronale Netzwerke auf Arrays von Sensoren für die Erforschung komplizierter Hirnleistungen wie Gedächtnis und Lernen.
2. Klinische Anwendungen in der Neuroprothetik werden denkbar, wenn defekte neuronale Informationsweiterleitung über elektronische Stimulation kompensiert werden kann.
3. Die Informationstechnologie könnte von Neuronen-basierten Prozessoren profitieren.

Trotz der Verschiedenheit dieser Anwendungen ist ihnen eines gemeinsam: Ihre Erforschung und Entwicklung ist nur möglich, wenn neuronale Netzwerke systematisch mit definierter Geometrie auf die elektronischen Bauteile aufgebracht werden können. Dafür muss das neuronale Wachstum benutzerdefiniert steuerbar sein. Bislang ist das nicht im nötigen Umfang möglich.

Die Lösung für dieses Problem muss man sich bei der Natur anschauen: Auswachsende Neuriten begegnen *in vivo* chemischen Signalstoffen, die auf sie anziehend (attraktiv) oder abstoßend (repulsiv) wirken und ihre Zielfindung steuern (Chemotropismus). Außerdem spielen endogene elektrische Felder bei der Zielfindung eine Rolle (Galvanotropismus). In beiden Fällen ist der intrazelluläre Botenstoff  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Übersetzung der extrazellulären Signale in die Reaktion des Wachstumskegels beteiligt [74, 34].

Auch das Wachstumsverhalten von Neuronen in Kultur kann über Wachstumsfaktoren und über elektrische Felder beeinflusst werden. Um das Wachstum eines jeden Neurons eines zukünftigen Netzwerkes individuell zu steuern, müsste für jede Zelle eine individuelle Mikroumgebung aus chemischen und/oder elektrischen Wegweisern geschaffen und während der Ausbildung des Netzwerkes immer neu angepasst werden. Diese Herangehensweise ist schwierig und bei einer größeren Anzahl von Zellen bislang nicht durchführbar.

Die Idee der vorliegenden Arbeit war es, über den intrazellulären Botenstoff  $\text{Ca}^{2+}$  das neuronale Wachstum direkt vom mikroelektronischen Bauteil aus zu kontrollieren.

Die intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ist eine Schlüsselgröße bei der Richtungssteuerung des Wachstums. In Wachstumskegeln von Neuronen auf einem isolierten Chip sollte es durch die Methodik der kapazitiven Öffnung spannungsabhängiger Kanäle [122, 102, 103] möglich sein, Calciumkanäle in der Zellmembran vom Chip aus zu öffnen und den intrazellulären Calciumspiegel der Wachstumskegel zu manipulieren, um so in die Wachstumsprozesse einzugreifen.

## 1.2 $Ca^{2+}$ und das Richtungswachstum von Neuriten

Wachstumskegel leiten auswachsende Neuriten zu ihrem Ziel: mit ihren fingerartigen Filopodien “befühlen” sie ihre Umgebung und treffen Wachstumsentscheidungen. Sie können ihre Motilität und ihre Wachstumsrichtung ändern. Motilitätsänderungen werden durch globale Signale ausgelöst, die den ganzen Wachstumskegel gleichmäßig betreffen. Für eine Richtungsänderung müssen lokale Signale auf nur einer Seite des Wachstumskegels vorhanden sein (“asymmetrische” Signale) [34]. Viele globale und lokale Signale überlagern sich zur Mikroumgebung eines Wachstumskegels. Dieser muss die Informationsflut integrieren und zu einer Entscheidung verarbeiten.

Die zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Der intrazelluläre Botenstoff  $Ca^{2+}$  ist in vielen Fällen beteiligt [40, 39, 45, 56].  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder aus den intrazellulären Speichern ins Zytosol führt zu  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen. Sie können lokal oder global sein, je nachdem wie lange und in welcher Region Kanäle geöffnet werden.

Um die Motilität eines Neuriten zu erlauben, muss der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel des Wachstumskegels in einem optimalen Bereich liegen. Bei zu wenig  $Ca^{2+}$  kann er nicht wachsen, bei zu viel  $Ca^{2+}$  stoppt er das Wachstum [55, 11, 13, 48, 39, 56]. Spannungsabhängige Calciumkanäle (*Voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channels*, VDCCs) sind bei der Regulation des globalen  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegels und bei der Ausbildung lokaler  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale beteiligt [49].

Auf eine lokale Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  folgt oft eine Richtungsänderung. Erstaunlicherweise kann der Wachstumskegel zur Seite erhöhter  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte hin oder von ihr weg wachsen [40]. Der  $[Ca^{2+}]_i$  Gradient über den Wachstumskegel löst also die Richtungsänderung aus, doch wie wird entschieden, in welche Richtung die Bewegung erfolgt?

Es wird vermutet, dass mehrere Faktoren eine Rolle spielen: Zunächst sind die Charakteristika des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals selbst, wie räumliche und zeitliche Signalform, Signalamplitude und Signal-Mechanismus (Quelle der  $Ca^{2+}$ -Ionen und Identität der beteiligten Kanäle) entscheidend [34, 86]. Außerdem hat der Zustand des Wachstumskegels zum Zeitpunkt des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals einen Einfluss. Sein globaler  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel, sowie sein Expressions- und Stoffwechsel-Profil, das ihm durch den Kontakt zur Umgebung über Zelladhäsionsmoleküle und durch innere Faktoren wie Alter und Identität des Neurons aufgeprägt wird, sind an der Richtungsentscheidung beteiligt [84, 86].

$Ca^{2+}$ -regulierte Effektorproteine decodieren das  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal mit Hilfe ihrer unterschiedlichen Kinetiken und Affinitäten [34]. Welches Effektorprotein mit welchem  $Ca^{2+}$ -Signal konfrontiert wird, hängt dabei von seiner Position ab: um ein lokales  $Ca^{2+}$ -Signal bei  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch einen einzigen Kanal zu decodieren, darf das Effektormolekül nicht weiter als 50 nm vom Kanal entfernt sein ( $Ca^{2+}$ -Nanodomäne). Für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch mehrere, geclusterte Kanäle gilt ein Abstand von  $< 1 \mu\text{m}$  ( $Ca^{2+}$ -Mikrodomäne) [34].

Um den  $Ca^{2+}$ -Signal-Code zu entziffern, der dem Wachstumskegel die Richtung vor-

gibt, müsste man in der Lage sein, die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen räumlich und zeitlich hochauflösend zu beobachten. Viele kurze, lokale  $Ca^{2+}$ -Transienten sind aber mit den heutigen Fluoreszenzfarbstoffen gar nicht messbar, so dass man oft nur diffuse, langsamere  $Ca^{2+}$ -Signale sieht. Trotzdem wird in den meisten Fällen folgender Zusammenhang gefunden: kleine lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen stehen im Zusammenhang mit repulsivem Wachstum, ebenso wie sehr starke lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen. Mäßige lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen werden bei attraktivem Wachstum beobachtet [139, 45, 40]. In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass dabei die künstliche asymmetrische Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  ausreichend ist, die Richtungsänderungen auszulösen [139, 40].

Aufgrund der Komplexität des Systems und den Schwierigkeiten bei der Visualisierung der Signale sind die genauen molekularen Mechanismen des  $Ca^{2+}$ -vermittelten Verhaltens von Wachstumskegeln noch nicht bekannt. Das von Timothy Gomez und James Zheng kürzlich aufgestellte Modell macht ausschließlich Amplitude und Steigung des  $[Ca^{2+}]_i$ -Gradienten für die Entscheidung verantwortlich [34]. Ein anderes Modell stellt die Quelle der  $Ca^{2+}$ -Ionen (Extrazellulärraum und / oder  $Ca^{2+}$ -Speicher) in den Mittelpunkt [86]. Unabhängig davon, welches der beiden Modelle der realen Situation näher kommt, lässt sich folgendes festhalten:

1. Die Öffnung von VDCCs führt zur Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$
2. Eine globale Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  kann die Motilität eines Wachstumskegels beeinflussen.
3. Eine lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung kann eine Richtungsänderung hervorrufen.

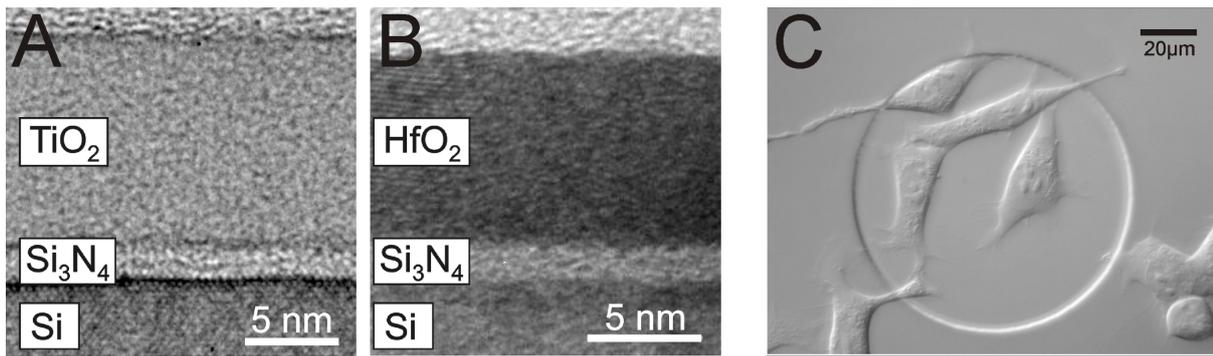
Sollte die kapazitive Öffnung von VDCCs gelingen, würde dies zu  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen führen, so dass die Motilität des Wachstumskegels vom Chip aus beeinflussbar sein sollte. Auch Änderungen der Wachstumsrichtung würden denkbar, wenn VDCCs lokal kapazitiv geöffnet werden könnten.

### 1.3 Extrazelluläre Stimulation mit Halbleiterchips

Stimulation von Neuronen durch extrazelluläre Elektroden ist für die Prothetik von großer Bedeutung. Allerdings ist der genaue Mechanismus der Stimulation auch in den berühmten Beispielen der Cochlea-Implantate [106], der Neuromotorprothesen [44] und der *Deep Brain Stimulation* bei Parkinsonpatienten [33] nicht geklärt.

Grundsätzlich gibt es zwei Typen von Elektroden, die zur extrazellulären Stimulation eingesetzt werden können: Metallelektroden und isolierte Elektroden. Bislang werden in der Prothetik ausschließlich Metallelektroden eingesetzt. Sie injizieren effektiv Strom ins Gewebe, es kann aber Faraday'scher Strom fließen. Die Redoxreaktionen haben Folgen für die Elektrode und die Zellen: die Stabilität der Elektrode ist durch Korrosion beeinträchtigt [7] und die Zellen sind Änderungen von pH [63] und Sauerstoffpartialdruck [5] ausgesetzt, die ihre Vitalität beeinträchtigen [47] und sogar zum Zelltod führen können [72]. Die Langzeitverträglichkeit der Implantate ist daher ein Problem. Zudem ist der genaue Stimulationsmechanismus nicht klar, da eine stimulierende Wirkung der reaktiven Nebenprodukte nicht ausgeschlossen werden kann [5].

Um wohldefinierte elektrische Stimulation auszuüben, müssen isolierte Elektroden eingesetzt werden. Eine Möglichkeit sind Elektroden mit isolierenden Oxidschichten. Bei



**Abbildung 1.1:** Transmissionselektronenmikroskop (TEM)-Aufnahme der Oxidschichten und Foto von HEK-Zellen auf einem Kondensator. TEM Aufnahme der  $\text{TiO}_2$ -Schicht (A) und  $\text{HfO}_2$ -Schicht (B) auf  $\text{p}^+$ -dotiertem Silizium über einer Pufferschicht von Siliziumnitrid. Abbildung verändert übernommen aus [125]. C *Difference Interference Contrast* (DIC)-Bild von HEK293-Zellen auf kreisförmigem Kondensator. Abbildung aus [101].

geeigneter Anwendung lassen sie keinen Faraday'schen Strom zu, sondern erlauben nur kapazitive Ströme. Man spricht daher auch von kapazitiver Stimulation.

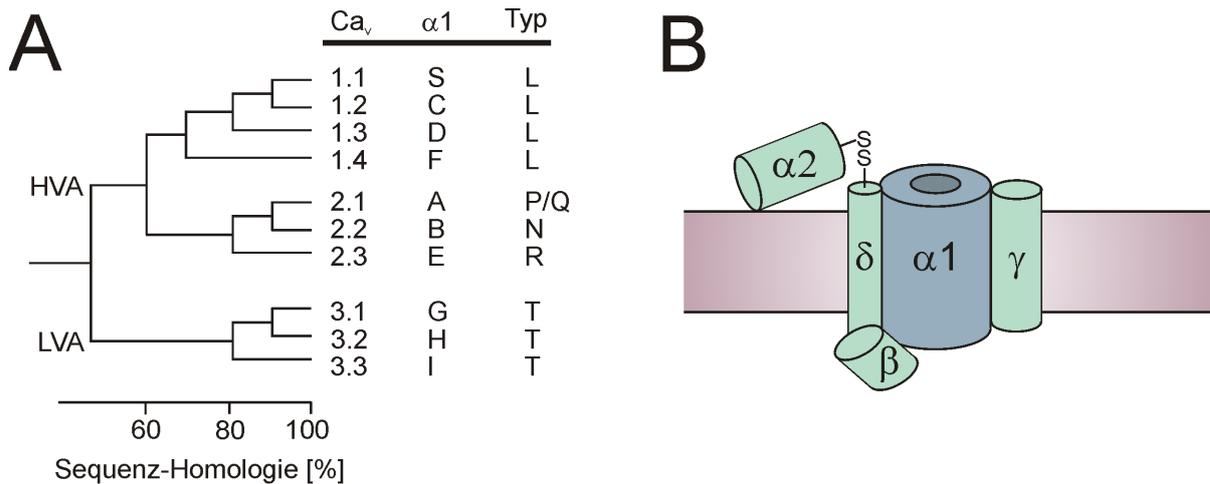
Doch isolierte Elektroden haben einen entscheidenden Nachteil: sie haben meist eine erheblich geringere Kapazität als Metallelektroden. Um möglichst hohe Kapazitätswerte zu erreichen, wurden von Frank Wallrapp Halbleiterchips mit Materialien hergestellt, die eine hohe Dielektrische Konstante haben [124, 125]. Dünne Schichten von  $\text{TiO}_2$  und  $\text{HfO}_2$  isolieren die Halbleiterelektrode (siehe Abb. 1.1 A und Abb. 1.1 B). Die Chips zeigen eine im Vergleich zu herkömmlichen  $\text{SiO}_2$ -Chips stark erhöhte Polarisierbarkeit.

Solche Chips mit kreisförmigen, zweidimensionalen Elektroden (Kondensatoren) kamen in der vorliegenden Arbeit für die Stimulation zum Einsatz. Die Zellen wurden in direkten Kontakt mit der Elektrode gebracht, indem sie auf dem Kondensator kultiviert wurden (siehe Abb. 1.1 C). Kapazitive Stimulation vom Chip aus generiert Spannungen in der Umgebung der Zelle [103, 104] (siehe dazu Kapitel 2). Diese können das Gating von spannungsabhängigen Ionenkanälen bewirken, oder aber, wenn sie sehr groß werden, zur Öffnung unselektiver Poren durch Elektroporation führen. Diese können sich nach mehreren hundert Millisekunden bis Sekunden wieder schließen [99]. Die Zelle ist allerdings mindestens vorübergehend verletzt und die Verträglichkeit der Stimulation für die Zellen ist über größere Zeitspannen nicht sichergestellt. Daher wurde mit Sorgfalt darauf geachtet, dass die Spannungen die Schwelle für Elektroporation nicht überschritten und die Stimulation ausschließlich über die Öffnung von Ionenkanälen erfolgte.

Die extrazelluläre Aktivierung von  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Kanälen ist bereits eingehend untersucht worden [122, 102, 104]. In der vorliegenden Arbeit sollten VDCCs kapazitiv geöffnet werden.

## 1.4 Spannungsabhängige Calciumkanäle in Vertebraten und Invertebraten

Aus Untersuchungen an Vertebraten wurden die VDCCs nach ihren biophysikalischen Eigenschaften, ihrer pharmakologischen Sensitivität und ihrer Sequenz-Homologie klassifiziert (siehe Abb. 1.2 A, Abb. nach [136]). Zunächst trennt man in die Klassen der *Low*



**Abbildung 1.2:** Klassifikation und Untereinheitenkomposition von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Abbildungen nach [136]. **A** Klassifikation der VDCCs, basierend auf ihren biophysikalischen Eigenschaften, ihrer pharmakologischen Sensitivität und ihrer Sequenz-Homologie. Die Kanal-Unterfamilien Ca<sub>v</sub>1 und Ca<sub>v</sub>2 gehören zur Klasse der HVA VDCCs, Ca<sub>v</sub>3 zur Klasse der LVA VDCCs. **B** HVA VDCCs sind Heteromultimere, die sich aus einer porenformenden Untereinheit α<sub>1</sub>, und jeweils einer α<sub>2</sub>δ, β und γ Untereinheit zusammensetzen. Die α<sub>2</sub>δ-Untereinheit besteht aus den zwei Untereinheiten α<sub>2</sub> und δ, die sich von demselben Genprodukt ableiten, proteolytisch in zwei Untereinheiten zerschnitten und anschließend über eine Disulfidbrücke wieder verbunden werden. LVA VDCCs bestehen nur aus einer porenformenden α<sub>1</sub> Untereinheit.

*Voltage Activated* (LVA, Aktivierung ab  $> -70$  mV) und *High Voltage Activated* (HVA, Aktivierung ab  $> -40$  mV) VDCCs [23, 136] (siehe Abb. 1.2 A). LVA Kanäle sind insensitive gegenüber Cd<sup>2+</sup> und werden durch Ni<sup>2+</sup> geblockt, HVA Kanäle sind sensitiv gegenüber Ni<sup>2+</sup>, werden aber durch Cd<sup>2+</sup> geblockt.

HVA VDCCs werden in L-, N-, P-, Q- und R-Typ unterschieden. L-Typ Kanäle sind sensitiv gegenüber Dihydropyridinen wie Nifedipine und Nitrendipine [28], N-Typ Kanäle lassen sich mit dem ω-Conotoxin GVIA blocken [75, 91], P-Typ Kanäle sind sensitiv gegenüber dem Spinnentoxin FTX [71, 70] und dem ω-Agatoxin AgaIVA [78], das in höheren Konzentrationen auch Q-Typ Kanäle blockt [100]. R-Typ Kanäle reagieren auf keine der oben aufgeführten Komponenten [138].

HVA VDCCs sind Heteromultimere, die sich aus einer porenformenden Untereinheit α<sub>1</sub>, und jeweils einer α<sub>2</sub>δ, β und γ Untereinheit zusammensetzen (Abb. 1.2 B). LVA VDCCs bestehen nur aus einer porenformenden α<sub>1</sub> Untereinheit.

Das für VDCCs aus Vertebraten entwickelte Klassifizierungssystem lässt sich nicht vollständig auf die VDCCs von Invertebraten übertragen. Während Kits und Mansvelder 1996 noch eine klassische Einteilung der VDCCs von Mollusken versuchen [62], tauchen inzwischen immer mehr Abweichungen auf: Neurone aus *Lymnaea stagnalis* zeigen HVA-Ströme, die nicht weiter pharmakologisch einem Typ zuzuordnen sind [20, 61, 109]. Selbst die Klassifizierung in LVA (Ni<sup>2+</sup>-sensitiv) und HVA (Cd<sup>2+</sup>-sensitiv) gelingt in Mollusken nicht immer zuverlässig [62, 109].

## 1.5 HEK-Zellen mit rekombinanten L-Typ Calciumkanälen

Die kapazitive Aktivierung von VDCCs wurde zunächst an einem einfachen Modellsystem unter kontrollierten Bedingungen versucht.

HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney*, im Folgenden nur HEK-Zellen) sind aufgrund ihrer geringen endogenen Expression [77] besonders für die Überexpression exogener VDCCs geeignet und wurden dafür bereits intensiv eingesetzt [130, 90, 95]. Ihr Calciumhaushalt ist weniger komplex als der von Neuronen und eingehend untersucht [135, 1, 8]. Sie können lange hohen  $[Ca^{2+}]_i$ -Werten ausgesetzt sein, ohne Schaden zu nehmen. Sie wurden daher für die Studien der kapazitiven Kanalöffnung ausgewählt.

In verschiedenen Modellsystemen wurde die Beteiligung von L-Typ VDCCs an den  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen bei Richtungsentscheidungen von Wachstumskegeln gezeigt [45, 84, 85, 93]. Im Hinblick auf die Experimente mit Wachstumskegeln wurde daher ein L-Typ VDCC für die Kanalstudien ausgewählt. Die Wahl fiel auf  $Ca_v1.2$ , da dieser in den Wachstumskegeln auswachsender Neuriten vorkommt [85]. Seine porenformende Untereinheit ist  $\alpha_{1C}$  (siehe Abb. 1.2 A). Sie beinhaltet den Spannungssensor und die für  $Ca^{2+}$ -abhängige Inaktivierung zuständigen Bereiche. Die Hilfsuntereinheiten interagieren mit  $\alpha_{1C}$  und modulieren Lokalisation, Aktivität und Spannungsabhängigkeit des Kanals [123, 107, 80]. Die Untereinheitenkombination  $\alpha_{1C}$ ,  $\beta_{2a}$  und  $\alpha_2\delta_1$  wurde ausgewählt, da ihre Koexpression zu hohen Gesamtzellströmen führt [64, 105, 80]. Auf Koexpression einer  $\gamma$ -Untereinheit wurde verzichtet, da diese die Gesamtzellströme reduziert [29].

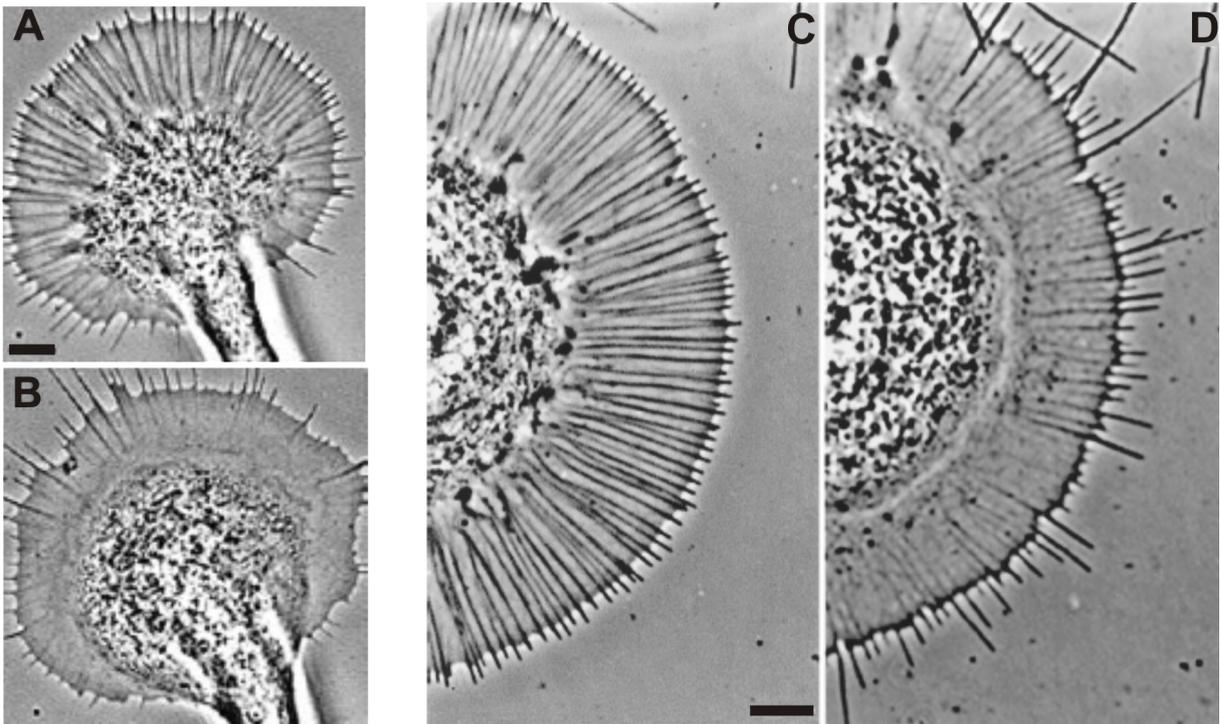
## 1.6 Immotile Wachstumskegel von *Lymnea stagnalis*

Schneckenneurone bilden Wachstumskegel aus, deren Fläche wesentlich größer ist als die von Wirbeltierneuronen [12]. Ihre große Fläche bietet eine gute Kopplung zur Elektrode. Daher waren sie für die vorliegenden Stimulationsstudien besonders gut geeignet. Obwohl die Wachstumskegel der Neuronen aus der Schnecke *Helisoma trivolvis* am besten beschrieben sind [127, 128, 140, 141, 12], wurden hier Neurone aus der Schnecke *Lymnea stagnalis* als Modellsystem gewählt, da die Haltung dieser Schneckenart in der Abteilung etabliert war. Die Neurone aus dem A-Cluster wurden gewählt, da pro Tier etwa 20 Neurone dieses Typs entnommen werden konnten.

Neurone des A-Clusters aus *Lymnea stagnalis* bildeten abhängig vom Kulturmedium zwei verschiedene Typen von Wachstumskegeln aus, wenn sie auf Poly-L-Lysin aufgesetzt wurden. Die beiden Wachstumskegel-Typen sind für Neurone der Schnecke *Helisoma trivolvis* beschrieben [12]:

In Medium mit Wachstumsfaktoren aus den Ganglien der Schnecken wachsen aus dem Soma und dem Axonstumpf Neuriten aus. An der Spitze dieser Neuriten befinden sich motile Wachstumskegel mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$ - 25  $\mu\text{m}$ . Sie zeigen eine ähnliche Morphologie und ähnliche Bewegungsmuster wie Wachstumskegel von Vertebraten. Sie wachsen vorwärts, zeigen Richtungsänderungen oder kollabieren, je nach der Mikroumgebung, der sie ausgesetzt sind [11].

Findet die Kultur derselben Neurone ohne Wachstumsfaktoren statt, wachsen große Wachstumskegel (Durchmesser ca. 50  $\mu\text{m}$ -100  $\mu\text{m}$ ) aus der Spitze des Axonstumpfes heraus [127]. Sie zeigen ähnliche morphologische Eigenschaften und ein ähnliches Zytoskelett



**Abbildung 1.3:** Verlust der Aktinrippen und Verlängerung der verbleibenden Filopodien von immotilen Wachstumskegeln aus Schneckenneuronen bei Applikation von Serotonin (Abb. A und B, übernommen aus [140]) und Hoch KCl (Abb. C und D, übernommen aus [128]). **A** Vor der Behandlung mit Serotonin zeigt die *Differential Interference Contrast* (DIC)-Aufnahme eines *Helisoma* B19 Wachstumskegels auf Poly-L-Lysin viele Aktinrippen (phasendichte Strukturen), die den Lamellipod durchspannen. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ . **B** Nach der Behandlung mit Serotonin zeigt sich ein dramatischer Verlust von Aktinrippen. Die verbleibenden Filopodien sind verlängert. **C** Vor der Behandlung mit Hoch KCl-Lösung eines anderen *Helisoma* Wachstumskegels zeigt er viele Aktinrippen. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ . **D** Auf die Behandlung mit Hoch KCl-Lösung folgt ein Verlust der Aktinrippen und eine Verlängerung der verbleibenden Filopodien. Der Morphologieänderung lag eine  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung zugrunde. Die Depolarisation durch KCl-Applikation führte nach 2 min zu einer maximalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme von  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 130 \text{ nM}$ . Anschließend blieb  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der KCl-Applikation um 60 nM erhöht. [128].

wie die motilen Wachstumskegel, adhären durch ihre große Fläche aber so stark am Substrat, dass sie immotil sind. Trotzdem reagieren sie auf dieselben Wachstumsfaktoren wie die motilen Wachstumskegel durch Umordnung ihres Zytoskeletts [129]. Sie sind ein beliebtes Modellsystem für die Vorgänge bei repulsivem Richtungswachstum: Repulsive Wachstumssignale stoppen das Wachstum eines Neuriten, indem sie den Kollaps des Wachstumskegels herbeiführen, wobei Lamellipod und Filopodien zurückgezogen werden [27]. Da durch die starke Adhäsion der Kollaps selbst verhindert wird, werden die zugrunde liegenden Veränderungen des Zytoskeletts erkennbar. So konnte gezeigt werden, dass diverse repulsive Signalstoffe über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden dieselbe Umordnung des Zytoskeletts herbeiführen [141]. Kombinierte Studien korrelieren diese Umordnung des Zytoskeletts klar mit dem tatsächlichen Wachstumsverhalten von motilen Wachstumskegeln und geben dem Modellsystem immotiler Wachstumskegel seine Relevanz [140, 141].

Viele repulsive Signalstoffe lösen im Wachstumskegel Signalkaskaden aus, an denen

$\text{Ca}^{2+}$ -Influx beteiligt ist, so auch der repulsiv wirkende Neurotransmitter Serotonin [11, 56, 92]. Gleichmäßige Applikation von Serotonin löst in immotilen Wachstumskegeln von *Helisoma trivolvis* eine globale Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aus, auf die eine Umstrukturierung des Zytoskeletts folgt (Abb. 1.3 A und B, verändert übernommen aus [140]). Wird  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ohne Beteiligung eines Signalstoffes durch Öffnung von VDCCs durch Depolarisation mit extrazellulärem KCl global erhöht, so folgt ebenfalls eine Umstrukturierung des Zytoskeletts. Sie zeigt dieselben Charakteristika wie die Reaktion auf den Schreckstoff Serotonin (Abb. 1.3 C und D, verändert übernommen aus [128]). Die deutlichsten Merkmale sind die Verlängerung der Filopodien und der Verlust der Aktinrippen aus dem Lamellipod. Letzterer leitet in motilen Wachstumskegeln den Kollaps ein [141].

Die großen immotilen Wachstumskegel wurden als Modellsystem für die ersten grundlegenden Experimente zur chipgesteuerten Wachstumskontrolle gewählt, da sie alle wichtigen Voraussetzungen bieten:

1. Ihre große Adhäsionsfläche garantiert eine gute Kopplung zur Elektrode.
2. Sie exprimieren VDCCs [48, 49] und können daher auf die kapazitive Stimulation mit Calciumkanalöffnung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom reagieren.
3. Verlängerung der Filopodien und Verlust der Aktinbündel als Zeichen des Kollaps sind leicht den kontrastverstärkten Bildern der Wachstumskegel zu entnehmen.
4. Die Änderung ihrer Morphologie ist direkt übertragbar auf die Änderung der Motilität von kleineren, motilen Wachstumskegeln [141].

Sollte es gelingen, eine Umstrukturierung des Zytoskeletts eines solchen Wachstumskegels über  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch kapazitive Kanalöffnung herbeizuführen, so hätte man den ersten Schritt auf dem Weg zur kapazitiven Kontrolle des Wachstumsverhaltens getan.

## 1.7 Gliederung der vorliegenden Arbeit

Das folgende **Kapitel 2** erklärt das grundlegende Prinzip kapazitiver Kanalöffnung und die Planung der Experimente für beide Modellsysteme.

In **Kapitel 3** werden die in der Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben.

In **Kapitel 4** wird das kapazitive Gating von  $\text{Ca}_v1.2$  in *Voltage Clamp* an HEK-Zellen studiert. Die Stimulation nicht spannungsgeklemmter Zellen wird in *Current Clamp* untersucht. Im Hinblick auf die Stimulation von Wachstumskegeln wird eine periodische Form der Stimulation ausgearbeitet.

In **Kapitel 5** wird die kapazitive Kanalöffnung in HEK-Zellen fluoreszenzoptisch zunächst an HEK-Zellen in *Voltage Clamp*, dann an HEK-Zellen in *Current Clamp* und schließlich an HEK-Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette nachgewiesen.

**Kapitel 6** überträgt die Erkenntnisse aus den beiden vorherigen Kapiteln auf die Stimulation von immotilen Wachstumskegeln von A-Cluster-Neuronen aus *Lymnea stagnalis*. Der Effekt der kapazitiven Stimulation wird dabei fluoreszenzoptisch überwacht, die detektierten Signale interpretiert und versucht, die beteiligten VDCCs pharmakologisch zu identifizieren.

In **Kapitel 7** wird die Wirkung kapazitiver Stimulation auf die Morphologie von Wachstumskegeln vorgestellt und im Vergleich zur Wirkung klassischer Schreckstoffe und anderer Manipulationen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  diskutiert.

In **Kapitel 8** erfolgt eine zusammenfassende Diskussion.



# Kapitel 2

## Prinzip der kapazitiven Stimulation

### 2.1 Zwei-Domänen-Modell

Die elektrische Stimulation erregbarer Zellen ist durch extrazelluläre und intrazelluläre Elektroden möglich. Die Interpretation elektrophysiologischer Experimente beruht bei intrazellulärer Stimulation gemeinhin auf drei Annahmen: (i) das elektrische Potential ist jeweils im Zytoplasma und im Bad konstant, (ii) die Differenz der beiden elektrischen Potentiale - die (Trans)Membranspannung  $V_{TM}$  - ist durch die Spannung zwischen zwei Ag/AgCl-Elektroden in Zytoplasma und Bad gegeben und (iii) der Strom durch die gesamte Membran wird durch die gleiche Membranspannung getrieben.

Im Falle der extrazellulären Stimulation sind diese Annahmen nicht mehr gültig. Der Strom von der Stimulationselektrode zur Badelektrode führt zu einem Potentialgradienten im Elektrolyt, der von der Geometrie der Elektrode und der Zelle, sowie von dem spezifischen Widerstand des Elektrolyten abhängt. Das Zytoplasma bleibt isopotential, doch die Membranspannung hängt von der Position der betrachteten Membrandomäne im extrazellulären Potential ab. Daher wird der Strom durch die verschiedenen Membrandomänen einer Zelle von verschiedenen Membranspannungen bestimmt.

Der Spezialfall der Adhäsion einer Zelle auf einer planaren Elektrode (Kondensator) wird durch das Modell der Zwei-Domänen-Stimulation beschrieben [103, 122, 104]. Abb. 2.1 zeigt eine HEK-Zelle auf einem Kondensator und das Ersatzschaltbild einer solchen Kopplung zwischen Zelle und Chip. An der Rückseite der Kondensators wird die Spannung  $V_S$  angelegt.  $V_S$ , sowie die Spannungen  $V_M$  in der Zelle,  $V_J$  im Spalt und  $V_E$  im Elektrolyt nahe der Zelle werden auf das Potential der Badelektrode bezogen. Die Zellmembran ist in zwei Bereiche unterteilt, die sich in ihrer Membranspannung unterscheiden:

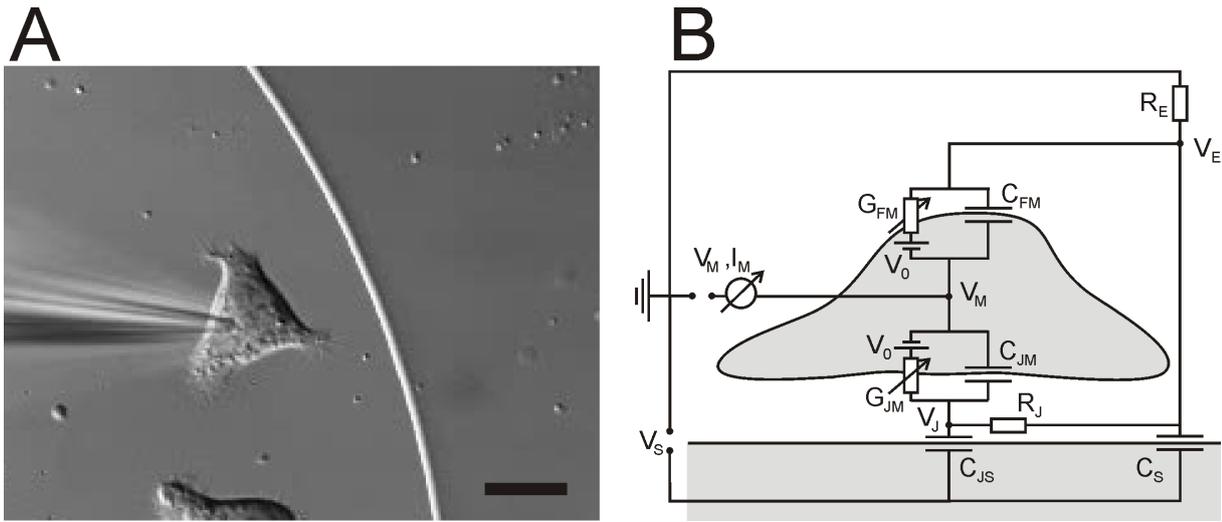
1. Die Transmembranspannung der adhärenierten Membrandomäne (englisch: *junction membrane*, Index "JM"):

$$V_{JM} = V_M - V_J$$

2. Die Transmembranspannung der freien Membrandomäne (Index "FM"):

$$V_{FM} = V_M - V_E$$

Die elektrischen Eigenschaften der Umgebung der Zelle in Spalt und Bad werden in Punkt 2.2 und 2.3 beschrieben.



**Abbildung 2.1:** Zell-Chip-Kopplung einer HEK-Zelle auf einem Kondensator. **A** DIC-Bild einer transient transfizierten HEK-Zelle auf einem Kondensator. Die Zelle ist mit einer Patchpipette kontaktiert. In der Peripherie der Zelle sind Calciumphosphat-Präzipitate zu sehen, die beim Umsetzen der Zellen nach der transienten Transfektion nicht vollständig ausgewaschen werden konnten. Größenbalken, 20  $\mu\text{m}$ . **B** Ersatzschaltbild der Zell-Chip-Kopplung. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu: Zelldurchmesser ca. 20  $\mu\text{m}$ , Spalt zwischen Zelle und Chip ca. 20 nm. Der Kontakt wird durch die Chipkapazitäten  $C_{JS}$  unter der Zelle und  $C_S$  neben der Zelle, die Kapazitäten der adhärten Membran  $C_{JM}$  und der freien Membran  $C_{FM}$ , der Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  der adhärten Membran  $G_{JM}$  und der freien Membran  $G_{FM}$ , sowie durch das Umkehrpotential für  $\text{Ca}^{2+}$   $V_0$  und dem Spaltwiderstand  $R_J$  beschrieben. Bei einer großen Kondensatorfläche und bei Verwendung eines hochohmigen Elektrolyten spielt der Badwiderstand  $R_E$  zwischen der Zelle und der Referenzelektrode eine Rolle. Fallende Spannungsrampen  $V_S$  werden an den Kondensator angelegt, so dass der kapazitive Strom die negativen Spannungen  $V_J$  im Spalt und  $V_E$  im Bad zur Folge hat. Wird die Zelle mit einer Patchpipette kontaktiert, so kann die intrazelluläre Spannung  $V_M$  (*Voltage Clamp*) oder der transmembrane Strom  $I_M$  (*Current Clamp*) geklemmt werden.

## 2.2 Spannungsabfall im Bad

Eine Spannungsänderung  $\Delta V_S$  am Kondensator bewirkt einen kapazitiven Verschiebungsstrom  $i_S$  über das Oxid. Eine stationäre Spannungsrampe  $\Delta V_S/\Delta t$ , die an einem kreisförmigen Kondensator mit dem Radius  $a_S$  und der spezifischen Kapazität  $c_S$  angelegt wird, führt zum Verschiebungsstrom  $i_S = c_S \Delta V_S/\Delta t$ . Unter der Annahme dass die Geometrie des Bades unbegrenzt ist, hat der Verschiebungsstrom im Elektrolyt mit dem spezifischen Widerstand  $\rho_E$  einen Spannungsabfall  $V_E$  zur Folge [104]. In der Mitte des Kondensators hat  $V_E$  den Wert

$$V_E = a_S \cdot \rho_E \cdot c_S \frac{\Delta V_S}{\Delta t}. \quad (2.1)$$

Da der Kondensator im Vergleich zur Zelle sehr groß ist, kann  $V_E$  in der Umgebung der Zelle als räumlich konstant aufgefasst werden und es gilt

$$V_E = R_E \frac{A_S c_S \Delta V_S}{\Delta t}. \quad (2.2)$$

mit  $R_E = \rho_E/\pi a_S$  und  $A_S = a_S^2 \pi$ .

## 2.3 Spannungsabfall im Spalt

Wächst eine Zelle auf dem Kondensator, befindet sich zwischen ihrer adhären Membran und der Chipoberfläche ein schmaler Spalt der Dicke  $d_J$ . Die Kontaktfläche mit den isolierenden Schichten der Lipidmembran und des Oxides bildet einen Kern-Mantel-Leiter [30, 126].

Wird eine Spannungsrampe an den Kondensator angelegt, so muss der Strom  $i_S = c_S \Delta V_S/\Delta t$  unter der Zelle über den Schichtwiderstand  $r_J$  ins Bad abfließen. Das führt zu einem zusätzlichen Spannungsabfall  $V_J - V_E$  im Spalt. Unter einer kreisförmig angenommenen Zelle mit einer Kopplungsfläche  $A_J = a_J^2 \pi$  entsteht ein Spannungsprofil  $V_J(a)$  entlang der Radius Koordinate  $a$  [103, 104]:

$$V_J(a) - V_E = \left(1 - \frac{a^2}{a_J^2}\right) \frac{A_J r_J}{4\pi} c_S \frac{\Delta V_S}{\Delta t} \quad (2.3)$$

mit  $r_J = \rho_E/d_J$ . Für den Mittelwert des Spannungsabfalls  $V_J - V_E$  im Spalt gilt

$$V_J - V_E = R_J \frac{A_J c_S \Delta V_S}{\Delta t} \quad (2.4)$$

mit  $R_J = \rho_E/8\pi d_J$ . Die Abschätzungen des Spannungsabfalls im Spalt erfolgen, sofern nicht anders erwähnt, mit Gleichung 2.4.

## 2.4 Wirkung kapazitiver Stimulation auf Zellen

Eine elektrische Stimulation der Zelle erfolgt, wenn eine extrazelluläre Spannungsänderung die Transmembranspannung der Zelle beeinflusst. Grundsätzlich kann die Veränderung hyperpolarisierend oder depolarisierend sein. Ob die Membran durch die Stimulation depolarisiert oder hyperpolarisiert wird, ist abhängig davon

1. ob mit fallenden ( $\Delta V_S/\Delta t < 0$ ) oder mit steigenden ( $\Delta V_S/\Delta t > 0$ ) Rampen stimuliert wird,
2. ob die intrazelluläre Spannung auf einen konstanten Wert geklemmt ist (*Voltage Clamp*) oder nicht (*Current Clamp* und intakte Zelle) und
3. ob man den freien oder den adhärenierten Teil der Membran betrachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit fallenden Rampen stimuliert.

### 2.4.1 Stimulation einer spannungsgeklemmten Zelle

Eine fallende Spannungsrampe  $\Delta V_S/\Delta t < 0$  am Chip führt zu einem negativen Spannungsabfall im Bad  $\Delta V_E < 0$  und zusätzlich zu einem negativen Spannungsabfall im Spalt  $\Delta(V_J - V_E) < 0$ . Die intrazelluläre Spannung ändert sich nicht, sie ist auf  $V_M$  geklemmt, also gilt  $\Delta V_M = 0$ .

Für die adhärenierte Membran gilt

$$\Delta V_{JM} = \Delta V_M - \Delta V_J = -\Delta V_E - (\Delta V_J - \Delta V_E)$$

und für die freie Membran gilt

$$\Delta V_{FM} = \Delta V_M - \Delta V_E = -\Delta V_E$$

Während die adhärenierte Membran also vom Spannungsabfall im Bad und dem zusätzlichen Spannungsabfall im Spalt depolarisiert wird, ist die freie Membran nur vom Spannungsabfall im Bad betroffen und wird daher weniger stark depolarisiert.

Bei der kapazitiven Stimulation einer spannungsgeklemmten Zelle mit fallenden Rampen wird die gesamte Membran der Zelle depolarisiert. Die adhärenierte Membran ist dabei stets der stärkeren Depolarisation ausgesetzt. Je nachdem, ob die Depolarisation in nur einer oder in beiden Membrandomänen ausreicht um VDCCs zu öffnen, kann prinzipiell die ganze Membran zum Signal beitragen.

### 2.4.2 Stimulation einer nicht spannungsgeklemmten Zelle

Bei einer Zelle in *Current Clamp* oder einer Zelle ohne Kontakt zu einer Patchpipette, ist  $\Delta V_M \neq 0$ . Nach dem 2. Kirchhoffschen Gesetz (Maschenregel) addieren sich alle Teilspannungen einer Masche in einem elektrischen Netzwerk zu Null. Daher gilt:

$$\Delta(V_M - V_E) - \Delta(V_M - V_J) = \Delta(V_J - V_E).$$

Nach dem 1. Kirchhoffschen Gesetz (Knotenregel) ist die Summe der zufließenden Ströme gleich der Summe der abfließenden Ströme. Da die adhärenierte und die freie Membran der Zelle in Reihe geschaltet sind, gilt mit der spezifischen Membrankapazität  $c_M$ , der Kopplungsfläche  $A_J$  und der Fläche der gesamten Zellmembran  $A_M$ :

$$c_M A_J \Delta(V_M - V_J) = -c_M (A_M - A_J) \Delta(V_M - V_E). \quad (2.5)$$

Nach Umformung ergibt sich die Transmembranspannung der adhärenierten Membran:

$$\Delta(V_M - V_J) = - \left( \frac{A_M - A_J}{A_J} \right) \Delta(V_M - V_E). \quad (2.6)$$

Aus der Kombination der beiden Kirchhoffschen Gesetze ergibt sich nach Umformung die Transmembranspannung der freien Membran:

$$\Delta(V_M - V_E) = \frac{A_J}{A_M} \Delta(V_J - V_E). \quad (2.7)$$

Eine Spannungsrampe wirkt sich hier also anders aus: Der Spannungsabfall im Bad beeinflusst weder die Transmembranspannung der adhärenierten, noch die der freien Membran. Beide Membrandomänen sind nur vom zusätzlichen Spannungsabfall im Spalt betroffen. Je nach der Geometrie der Zelle werden die beiden Membrandomänen gleich stark (bei einer sehr flachen Zelle mit  $2A_J = A_M$ ) oder die adhärenierte Membran doppelt so stark depolarisiert wie die freie Membran (bei einer halbkugelförmigen Zelle mit  $3A_J = A_M$ ). In jedem Fall ist die Polarisation entgegengesetzt. Für eine fallende Spannungsrampe bedeutet das stets eine Depolarisation für die adhärenierte und eine Hyperpolarisation für die freie Membran.

Die Spannungsänderung  $\Delta V_M$  während der Rampe ist die Messgröße in *Current Clamp*.  $\Delta V_E$  kann aus Gleichung 2.2 abgeschätzt werden. Mit  $\Delta(V_M - V_E) = \Delta V_M - \Delta V_E$  lässt sich aus diesen beiden Größen mit Hilfe von Gleichung 2.6 die Transmembranspannung der adhärenierten Membran aus einer *Current Clamp*-Messung abschätzen.

## 2.5 Stimulationsrampen zur kapazitiven Öffnung von Kanälen

### 2.5.1 Randbedingungen für das Rampendesign

Um die kapazitive Aktivierung von VDCCs zu erreichen muss die Depolarisation der Membran überschwellig sein. Eine überschwellige Depolarisation öffnet Kanäle umso effektiver, je länger sie aufrechterhalten wird. Nach Gleichungen 2.2 und 2.4 entscheidet das Design der Stimulationsrampe über Amplitude und Dauer der Depolarisation. Beim Rampendesign müssen drei Randbedingungen eingehalten werden:

1. Die Rampensteilheit darf nicht zu hoch gewählt werden, um Elektroporation zu vermeiden.
2. Die Amplitude  $\Delta V_S$  ist auf den Arbeitsbereich der Chips begrenzt. Hier ist der Leckstrom klein und die Oxidschichten verhalten sich wie gute Isolatoren, so dass Elektrochemie an der Elektrolyt/Oxid-Grenzfläche vermieden wird.
3. Die Rampendauer  $\Delta t$  darf nicht wesentlich kürzer sein als die Zeitkonstante der Kanalaktivierung der VDCCs. Je länger  $\Delta t$ , desto effektiver ist die Kanalöffnung.

### 2.5.2 Abschätzung der wirksamen Spannungen für HEK-Zellen

Eine typische HEK-Zelle hat die Fläche  $A_J = 500 \mu\text{m}^2$  und wächst mit einem Abstand  $d_J = 20 \text{ nm}$  (Wiemhöfer, Scheidt, unveröffentlichte Beobachtung) auf dem Chip an. Wird eine physiologische Messlösung eingesetzt, so ist  $\rho_E = 60 \Omega \text{ cm}$ . Die Kapazitäten der Chips sind  $c_{\text{TiO}_2} = 1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für  $\text{TiO}_2$  und  $c_{\text{HfO}_2} = 1.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für  $\text{HfO}_2$  (siehe dazu Punkt 3.1.2), der Arbeitsbereich der Chips ist  $\Delta V = -6 \text{ V}$  für  $\text{TiO}_2$  und  $\Delta V = -7.5 \text{ V}$  für  $\text{HfO}_2$  (siehe dazu Punkt 3.1.2, Werte aus [124]). Eine Rampe der Dauer  $\Delta t = 2 \text{ ms}$  ist länger

als die Zeitkonstante der Kanalöffnung von  $\text{Ca}_v1.2$  [64, 105, 67]. Daraus ergeben sich für beide Chiptypen mit dem Radius  $a_S = 0.25 \text{ mm}$  nach Gleichung 2.2  $V_E = 6.8 \text{ mV}$  und nach Gleichung 2.4  $V_J - V_E = 27 \text{ mV}$ .

Bei einer nicht spannungsgeklemmten Zelle ändert  $\Delta V_E$  nach Gleichungen 2.6 und 2.7 die Transmembranspannungen der Zelle nicht. Nimmt man eine flache Zelle an, gilt  $A_M = 2A_J$ , so dass nach Gleichung 2.7 die freie Membran um  $\Delta V_{FM} = -13.5 \text{ mV}$  hyperpolarisiert und die adhärrierte Membran nach Gleichung 2.6 um  $\Delta V_{JM} = 13.5 \text{ mV}$  depolarisiert wird.

$\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle öffnen bei Transmembranspannungen von etwa  $V_{TM} = -10 \text{ mV}$  [64, 136]. Eine Depolarisation von  $\Delta V_{JM} = 13.5 \text{ mV}$  reicht nicht aus, um ausgehend von einem intrazellulären Ruhepotential von  $V_M = -60 \text{ mV}$  die Schwelle für Kanalöffnung zu erreichen. Da der Arbeitsbereich der Chips bereits voll ausgereizt war und die Rampendauer nicht wesentlich verkürzt werden sollte um effektiv Kanäle zu öffnen, wurden Badelektrolyten mit erhöhtem spezifischen Widerstand eingesetzt ( $\rho_E = 200 \Omega \text{ cm}$ , ECL 2 und 3 bzw.  $\rho_E = 260 \Omega \text{ cm}$ , ECL 4, siehe Anhang A.4.4).

Durch Einsatz der hochohmigen Elektrolyten werden in nicht spannungsgeklemmten, flachen Zellen ( $A_M = 2A_J$ ) Depolarisationen der adhärrierten Membran von  $\Delta V_{JM} = 45 \text{ mV}$  in ECL 2 und 3, bzw.  $\Delta V_{JM} = 58 \text{ mV}$  in ECL 4 erreicht. Diese Depolarisationen sollten ausreichen, um  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle zu öffnen.

Für die Dauer der steigenden Rampen zur Rückstellung der Chipspannung galt  $\Delta t \geq 50 \text{ ms}$ , so dass die durch sie verursachten Änderungen der Transmembranspannungen vernachlässigt werden konnten.

### 2.5.3 Abschätzung der wirksamen Spannungen für Wachstumskegel

In Schneckenneuronen ist die kapazitive Aktivierung von  $\text{Na}^+$ -Kanälen untersucht [103]. Hier waren Rampendauern von  $\Delta t = 10 \text{ ms}$  bis  $\Delta t = 20 \text{ ms}$  nötig, um Kanalöffnung zu erreichen. Resultierend aus diesen Erfahrungswerten sollte auch bei Wachstumskegeln mit möglichst langen Rampendauern stimuliert werden.

Motile Wachstumskegel von Schneckenneuronen haben eine Adhäsionsfläche von etwa  $A_J = 300 \mu\text{m}^2$  [140, 141]. Für einen solchen Wachstumskegel, der in einem Abstand von  $d_J = 20 \text{ nm}$  [103] auf einem  $\text{HfO}_2$ -Chip ( $c_{\text{HfO}_2} = 1.22 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , siehe Punkt 3.1.2) angewachsen ist, ergibt sich für die Rampendauer  $\Delta t = 10 \text{ ms}$  bei maximaler Ausnutzung des Arbeitsbereichs des Chips  $\Delta V = -7.5 \text{ V}$  [124] mit Radius  $a_S = 0.25 \text{ mm}$  in physiologischer Schnecken-Messlösung ( $\rho_E = 165 \Omega \text{ cm}$ , siehe Anhang A.4.2) nach Gleichung 2.2  $V_E = 7.4 \text{ mV}$  und nach Gleichung 2.4  $V_J - V_E = 8.9 \text{ mV}$ .

Nur etwa die Hälfte des Spannungsabfalls  $V_J - V_E$  depolarisiert nach Gleichung 2.6 die adhärrierte Membran eines flachen Wachstumskegels.

Da der Wachstumskegel nicht spannungsgeklemmt wird, ändert  $\Delta V_E$  nach Gleichungen 2.6 und 2.7 die Transmembranspannungen der Zelle nicht. Bei einem flachen Wachstumskegel gilt  $A_M = 2A_J$ , so dass nach Gleichung 2.7 die freie Membran um  $\Delta V_{FM} = -4.5 \text{ mV}$  hyperpolarisiert und die adhärrierte Membran nach Gleichung 2.5 um  $\Delta V_{JM} = 4.5 \text{ mV}$  depolarisiert wird. Die Depolarisation reicht auf keinen Fall aus, HVA VDCCs zu öffnen und auch für die Aktivierung von LVA VDCCs ist die Depolarisation zu gering.

Der Einsatz großflächiger immotiler Wachstumskegel ermöglichte die Stimulation: Die Adhäsionsfläche der immotilen Wachstumskegel ist mit  $A_J = 3000 \mu\text{m}^2$  zehnmal größer

als die der motilen. Für einen solchen Wachstumskegel, der in einem Abstand von  $d_J = 20$  nm [103] auf einem  $\text{HfO}_2$ -Chip ( $c_{\text{HfO}_2} = 1.22 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) angewachsen ist, ergibt sich für die Rampendauer  $\Delta t = 10$  ms bei maximaler Ausnutzung des Arbeitsbereichs des Chips  $\Delta V = -7.5$  V ein Spannungsabfall im Spalt von etwa  $V_J - V_E = 90$  mV. Mit  $A_M = 2A_J$  und Gleichung 2.6 ergibt sich daraus eine Depolarisation der adhärierten Membran um  $\Delta V_{JM} = 45$  mV. Diese Depolarisation reicht aus, um LVA VDCCs in der adhärierten Membran zu öffnen und könnte auch knapp ausreichen um die Aktivierungsschwelle von HVA VDCCs zu überschreiten.

für die Rampendauern der steigenden Rampen zur Rückstellung der Chipspannung galt  $\Delta t \geq 150$  ms, so dass die durch sie verursachten Änderungen der Transmembran-spannungen vernachlässigt werden konnten.



# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Stimulationschips

#### 3.1.1 Herstellung

Die Stimulationschips sind als Elektrolyt/Oxid/Silizium (EOS) - Schichtsystem konfiguriert. Das leitende Substrat aus hoch  $p^+$ -dotiertem Silizium dient als elektrischer Zugang zu einer dünnen Oxidschicht im Bereich der Kondensatorfläche, die die planare Elektrode darstellt. Die übrige Oberfläche des Chips ist durch ein Feldoxid passiviert.

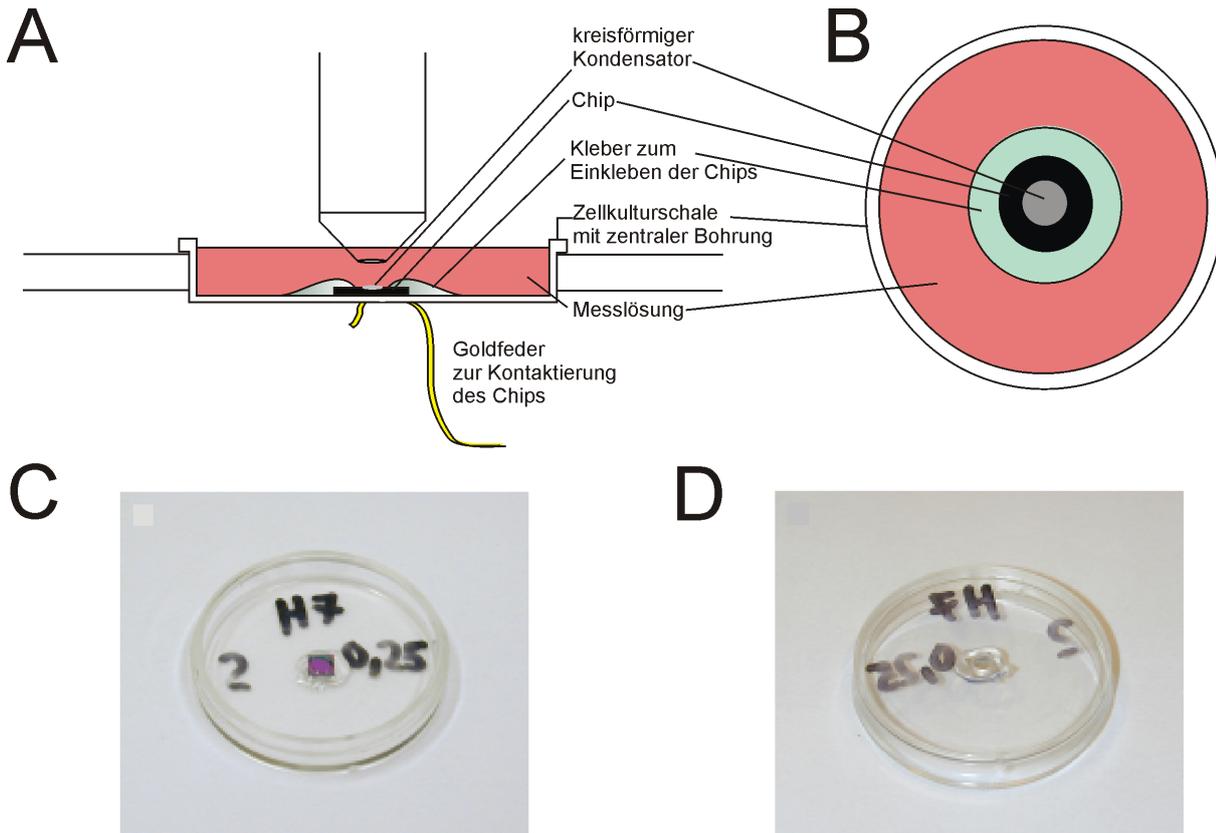
Die Herstellung der Chips wird an anderer Stelle [124] genau beschrieben und hier nur kurz rekapituliert.

Als Substrat dienen Wafer aus hoch  $p^+$ -dotiertem Silizium mit einem spezifischen Widerstand von  $0.006 \Omega \text{ cm}$  bis  $0.01 \Omega \text{ cm}$ . Ein  $1 \mu\text{m}$  dickes  $\text{SiO}_2$  Feldoxid wird durch nasse Oxidation aufgebracht und in einem kreisförmigen Bereich des zukünftigen Kondensators durch einen Ätzschritt vollständig entfernt. Es wurden Kondensatoren der Radien  $0.25 \text{ mm}$ ,  $0.5 \text{ mm}$  und  $1 \text{ mm}$  hergestellt. Eine dünne Pufferschicht  $\text{Si}_3\text{Ni}_4$  wird durch rasche thermische Prozessierung  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $\text{NH}_3$  aufgewachsen. Die Oxide  $\text{HfO}_2$  und  $\text{TiO}_2$  werden mit dem *Atomic Layer Deposition* (ALD)-Verfahren aufgebracht. Abwechselnde Applikation von  $\text{HfCl}_4$  oder  $\text{TiCl}_4$  als Kationen-Precursor und  $\text{H}_2\text{O}$  als Sauerstoff-Precursor ergibt wohldefinierte, atomare Schichten. Die  $\text{Si}_3\text{Ni}_4$  Pufferschicht soll die Bindung einer  $\text{SiO}_2$  Zwischenschicht verhindern und den Gitterübergang zwischen Substrat und Oxid verbessern.

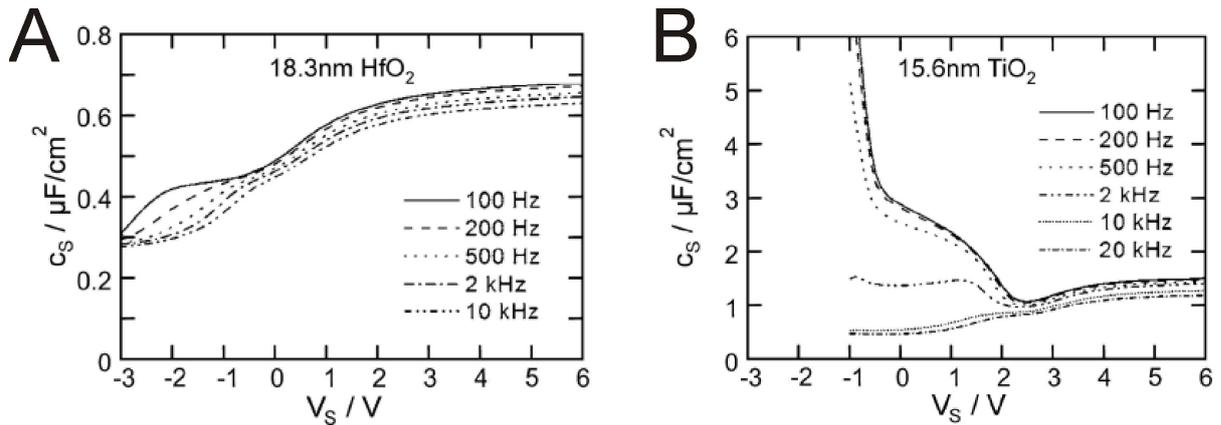
Zur Kontaktierung des Siliziums wird eine Aluminiumschicht auf die Rückseite des Wafers aufgedampft und dieser in quadratische ( $16 \text{ mm}^2$ ) oder achteckige Chips mit jeweils einem runden Kondensator zersägt.

Für die weitere Verwendung der Chips werden sie zunächst für  $5 \text{ min}$  in ein Ultraschallbad mit Aceton gegeben, anschließend zuerst mit Isopropanol und dann mit Millipore-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Für die Zellkultur wird jeder Chip in ein  $3.5 \text{ cm}$  Zellkulturschälchen mit zentraler Aussparung eingeklebt, so dass die rückseitige Kontaktierung der Aluminiumschicht mit einer Goldfeder möglich ist. Abb. 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des Chips im Querschnitt (Abb. 3.1 A) und in der Aufsicht (Abb. 3.1 B), sowie Fotos eines Chips von oben (Abb. 3.1 C) und von unten (Abb. 3.1 D). Der Chip wird während der Messungen mit einer Elektrolytlösung (Extrazelluläre Messlösung, ECL) überschichtet, die mit einer Badelektrode (Ag/AgCl-Elektrode) kontaktiert wird, auf die entsprechend der Tradition in der Elektrophysiologie alle Spannungen bezogen werden.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung und Fotos der Stimulationschips. **A** Schematischer Querschnitt eines Stimulationschips (nicht maßstabsgetreu). Der Chip (z.B. quadratischer Form mit 4 mm Kantenlänge) mit dem zentral eingeklebten kreisförmigen Kondensator (Radius z.B. 250  $\mu\text{m}$ ) ist in ein Zellokulturschälchen (Durchmesser 3.5 cm) mit zentraler Aussparung eingeklebt. Die rückseitige Kontaktierung der Aluminiumschicht erfolgt mit einer Goldfeder. Für Zellkultur bzw. Messungen wird der Chip mit Zellkulturmedium bzw. einer Elektrolytlösung überschichtet. **B** Schematische Aufsicht auf den Chip. **C** Foto eines Chips ohne Messlösung in der Aufsicht. **D** Foto eines umgedrehten Chips. Hier wird die zentrale Bohrung der Zellokulturkanne deutlich.



**Abbildung 3.2:** Spezifische Kapazität der Oxide **A**  $\text{HfO}_2$  (Schichtdicke 18.3 nm) und **B**  $\text{TiO}_2$  (Schichtdicke 15.6 nm). Abbildung verändert übernommen aus [125]. Die spezifische Kapazität ist hier abhängig von der Frequenz gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde nur mit Frequenzen von  $< 100$  Hz stimuliert.

### 3.1.2 Kapazität

Um möglichst hohe Kapazitätswerte zu erreichen, isolieren dünne Schichten aus  $\text{TiO}_2$  und  $\text{HfO}_2$  die Halbleiterelektrode. Diese Materialien haben hohe Dielektrische Konstanten:  $\epsilon_s = 33.9 \pm 1.6$  für  $\text{TiO}_2$  und  $\epsilon_s = 15.4 \pm 0.4$  für  $\text{HfO}_2$ .

Die spezifische Kapazität der beiden Oxide ist in Abb. 3.2 in Abhängigkeit von der angelegten Spannung für verschiedene Frequenzen dargestellt (Abb. aus [124]). In der vorliegenden Arbeit wurde nur mit Frequenzen von  $< 100$  Hz stimuliert. Hier war daher nur die durchgezogene Kurve wichtig. Ausgehend von der Sättigungskapazität bei positiven Spannungen nimmt die Kapazität der beiden Oxide in Richtung negativer Spannungen ab. Innerhalb des Spannungsbereiches von 5 V und  $-2.5$  V verhalten sich  $\text{HfO}_2$ -Chips typisch (siehe Abb. 3.2 A). Im Spannungsbereich von 6 V bis 0 V steigt bei den  $\text{TiO}_2$ -Chips die Kapazität nach kurzem Abfall stark an (siehe Abb. 3.2 B). Es werden Kapazitäten erreicht, die den Sättigungswert um Faktor 2 übersteigen. Ursachen für die komplizierte Spannungsabhängigkeit finden sich in [125]. Die dargestellten Werte gelten für Oxidschichtdicken von 15.6 nm ( $\text{TiO}_2$ ) bzw. 18.3 nm ( $\text{HfO}_2$ ). In der vorliegenden Arbeit kamen  $\text{TiO}_2$ -Chips mit 15.6 nm Schichtdicke und  $\text{HfO}_2$ -Chips mit 9.5 nm Schichtdicke zum Einsatz.

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgten die Abschätzungen mit folgenden Werten für die Sättigungskapazitäten (aus [124]):

- $\text{TiO}_2$  (Wafer H7, H10), 15.6 nm Schichtdicke,  $c = 1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$
- $\text{HfO}_2$  (Wafer G8, G11, G14), 9.5 nm Schichtdicke,  $c = 1.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Die Kapazität der verwendeten Chips ist also bei gleicher Schichtdicke um Faktor 9 bzw. 4 größer als die von  $\text{SiO}_2$  ( $\epsilon_s = 3.9$  [116, 110]).

### 3.1.3 Auswahl

In den meisten Stimulationsexperimenten ohne Fluoreszenzaufnahmen kamen  $\text{TiO}_2$ -Chips mit den Radien 0.25 mm und 0.5 mm zum Einsatz. Sie haben gegenüber  $\text{HfO}_2$ -Chips den Vorteil, dass sie eine höhere Kapazität aufweisen.

Für Stimulationsexperimente mit Fluoreszenzaufnahmen konnten TiO<sub>2</sub>-Chips nicht eingesetzt werden. Die Energie des UV-Lichtes zur Anregung von Fura-2 (340 nm, 360 nm und 380 nm) entsprach mit 3 eV der Bandlücke von TiO<sub>2</sub> (3.05 eV, [124]). Die Folge war Photostrom, der im Bad zu Elektrochemie führte.

Um diese Effekte zu vermeiden, musste bei der Verwendung von UV-Licht auf die HfO<sub>2</sub>-Chips zurückgegriffen werden, deren Bandlücke höher liegt (6 eV). Sie konnten ihre geringere Kapazität mit einem größeren Spannungsbereich teilweise ausgleichen. Es wurden Kondensatoren der Radien 0.25 mm, 0.5 mm für die Experimente mit HEK-Zellen und Kondensatoren der Radien 0.5 mm und 1 mm für die Experimente mit Schneckenneuronen verwendet.

### 3.1.4 Messung des Spannungsabfalls im Bad

Bei spannungsgeklemmten Zellen beeinflusst der Spannungsabfall im Bad  $\Delta V_E$  die Transmembranspannungen der Zelle. Gleichung 2.2 erlaubt eine Abschätzung von  $\Delta V_E$ , die aber nur bei unbegrenzter Geometrie gilt. Diese Annahme ist nur gültig, wenn der Chipradius um eine Dimension kleiner ist als die Höhe des Flüssigkeitsspiegels der Elektrolytlösung. In einigen Experimenten war dies nicht der Fall und die tatsächliche Spannungsänderung  $\Delta V_E$  war bis zu Faktor 2 größer als der theoretische Wert nach Gleichung 2.2. Daher wurde  $\Delta V_E$  nach den Experimenten gemessen. Dazu wurde eine Patchpipette in der Nachbarschaft der Zelle nah an die Chipoberfläche gebracht. Eine Spannungsrampe wurde an den Chip angelegt und die Spannungsänderung im Elektrolyten über die Pipette im *Current Clamp* Modus gemessen. Bei Abweichungen um  $\leq 10\%$  wurde mit dem theoretischen Wert, bei Abweichungen um  $> 10\%$  wurde mit dem Messwert gerechnet.

## 3.2 HEK-Zellen mit rekombinanten L-Typ Calciumkanälen

### 3.2.1 Zellkultur

#### Stabil transfizierte Zellen

Es kamen HEK293-Zellen des Anbieters American Type Culture Collection (ATCC) zum Einsatz, die mit der porenbildenden Untereinheiten  $\alpha_{1C}$  und der Hilfsuntereinheit  $\beta_{2a}$  von Ca<sub>v</sub>1.2 stabil transfiziert waren. Sie wurden uns freundlicher Weise von Herrn Dr. Moosmang (PD Dr. med. Sven Moosmang, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, siehe Anhang A.4.2) mit 10 % fötalem Kälberserum bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) in Zellkulturschalen von 3.5 cm bis 10 cm Durchmesser kultiviert und bei 90 % Konfluenz so gesplittet, dass sie diese Dichte in 4-5 Tagen wieder erreicht hatten. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Der Zusatz von Geneticin (200 µg/ml) und Hygromycin (100 µg/ml) zum Kulturmedium sorgte für andauernden Selektionsdruck. Geneticin diente der Selektion auf die  $\alpha_{1C}$ -, Hygromycin der Selektion auf die  $\beta_{2a}$ -Untereinheit. Vor dem Einsatz in den Experimenten wurden die Zellen stets mit der dritten Untereinheit  $\alpha_{2\delta_1}$  transient transfiziert (Ca<sub>v</sub>1.2-Zellen).

Die Ganzzellströme der stabil mit Ca<sub>v</sub>1.2 transfizierten Zellen nahmen nach etwa 15 Passagen deutlich ab und die Zellen veränderten ihre Morphologie. Zu diesem Zeitpunkt

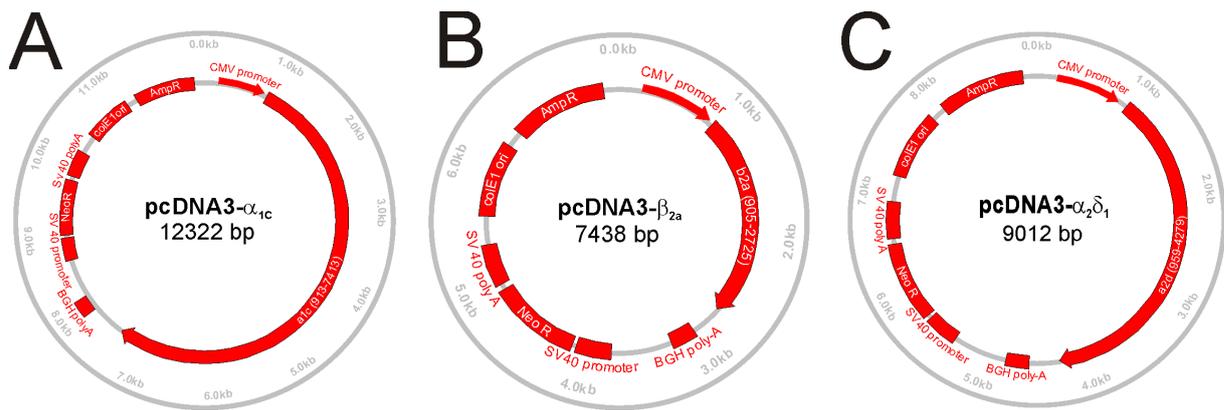


Abbildung 3.3: Vektorkarten von **A** pcDNA3- $\alpha_{1C}$ , **B** pcDNA3- $\beta_{2a}$  und **C** pcDNA3- $\alpha_2\delta_1$ .

wurden sie stets verworfen und neue Zellen wurden aufgetaut.

Elektrophysiologische Screenings der Ganzzellströme zeigten starke Schwankungen in der Kanalexpression zwischen den einzelnen Zellen. Daher bestand der Verdacht, dass die stabil transfizierten Zellen nicht klonalen Ursprungs waren. Um Klone zu isolieren wurden limitierende Verdünnungen ausgesät. Nach 6 bis 8 Wochen waren Klone hochgewachsen, die erneut über elektrophysiologisches Screening der Ganzzellströme auf ihre Kanalexpression getestet wurden. Die Kanalexpression war innerhalb der Klone ähnlich stark ausgeprägt. Die drei Klone mit der stärksten Kanalexpression hatten einen HEK-typischen Phänotyp und zeigten auch das typische Wachstumsverhalten. Sie wurden für die weitere Arbeit ausgewählt, stark amplifiziert und in ausreichender Menge tiefgefroren.

### HEK-Zellen

Zusätzlich kamen nicht stabil transfizierte HEK293-Zellen des Anbieters American Type Culture Collection (ATCC) zum Einsatz. Sie wurden unter denselben Bedingungen kultiviert wie die  $Ca_v1.2$ -Zellen, aber ohne Selektionsdruck durch Antibiotika.

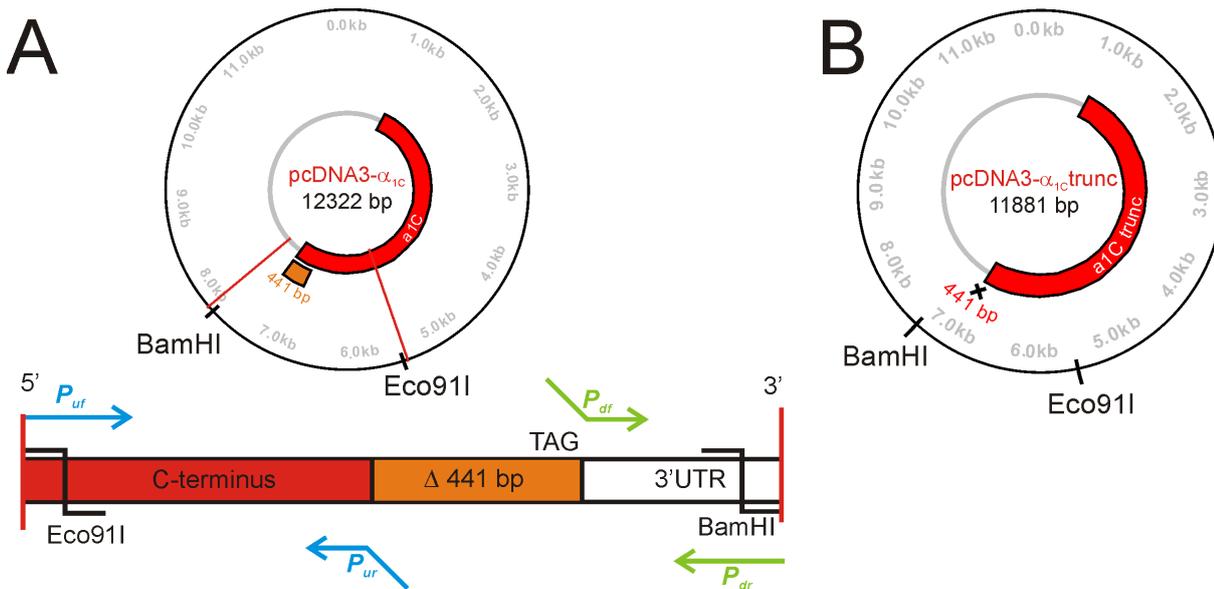
Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut, vor den ersten Messungen etwa eine Woche kultiviert und dann bis zu 15 Passagen lang verwendet. Vor der Messung wurden die HEK-Zellen transient mit Kanaluntereinheiten  $\alpha_{1C}trunc$ , (siehe Punkt 3.2.2)  $\beta_{2a}$  und  $\alpha_2\delta_1$  des VDCC  $Ca_v1.2$  transfiziert (siehe Punkt 3.2.3).

### 3.2.2 Vektoren

Verwendete Materialien wie Primer und Enzyme, sowie molekularbiologische Protokolle und die verwendeten PCR-Programme und -Ansätze sind in Anhang A.4.1 bzw. Anhang A.3 aufgeführt. Zur Gelextraktion, für Mini- und Maxipreps, für die Transformation, das gezielte Einführen von Mutationen und für Schritte der Zwischenklonierungen kamen Kits zum Einsatz (siehe Anhang A.4.1). Soweit nicht anders erwähnt, wurde stets das im Handbuch des Kits vorgegebene Protokoll befolgt.

### Kanaluntereinheiten

Um starke Gesamtzellströme des L-Typ VDCC  $Ca_v1.2$  zu erreichen, wurde die porenformende Untereinheit  $\alpha_{1C}$  zusammen mit den Hilfsuntereinheiten  $\beta_{2a}$  und  $\alpha_2\delta_1$  exprimiert. Die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit besteht aus den zwei Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\delta$ , die sich von demselben



**Abbildung 3.4:** Vektorkarten von pcDNA3- $\alpha_{1C}$  und pcDNA3- $\alpha_{1C} trunc$ . **A** Vektorkarte von pcDNA3- $\alpha_{1C}$ . Darunter ist das C-terminale Ende der kodierenden Sequenz (rot) mit der zu deletierenden Sequenz von 441 bp (orange) linear aufgezeichnet, um die Lage des *upstream* Primerpaars ( $P_{ur}$  und  $P_{ur}$ , blau), sowie des *downstream* Primerpaars ( $P_{dr}$  und  $P_{dr}$ , grün) und der Schnittstellen von Eco91I und BamHI zu verdeutlichen. **B** Vektorkarte des fertigen Konstrukts pcDNA3- $\alpha_{1C} trunc$ .

Genprodukt ableiten, proteolytisch in zwei Untereinheiten zerschnitten und anschließend über eine Disulfidbrücke wieder verbunden werden. Die Vektoren pcDNA3- $\alpha_{1C}$ , pcDNA3- $\beta_{2a}$  und pcDNA3- $\alpha_2\delta_1$  (Abb. 3.3 auf der vorherigen Seite A, B und C, *GeneBank* Nummern:  $\alpha_{1C}$  X55763 [4],  $\beta_{2a}$  X64297 [51],  $\alpha_2\delta_1$  M21948 [2]) wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Moosmang (PD Dr. med. Sven Moosmang, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München) zur Verfügung gestellt. Die für die Kanaluntereinheiten codierenden Sequenzen wurden per Sequenzierung auf ihre Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen (Pubmed Database) geprüft. Die kodierende Sequenz von  $\beta_{2a}$  zeigte vollständige Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen. Die kodierenden Sequenzen von  $\alpha_{1C}$  und  $\alpha_2\delta_1$  wiesen nur stille Mutationen auf.

### C-terminale Verkürzung von $\alpha_{1C}$ durch *Gene sewing*

Um möglichst hohe Ganzzellströme zu erreichen, wurde aus der porenbildenden Untereinheit  $\alpha_{1C}$  (Abb. 3.4 A) eine verkürzte (*truncated*) Version  $\alpha_{1C} trunc$  (Abb. 3.4 B) konstruiert. Kürzung der  $\alpha_{1C}$  Einheit um 147 Aminosäuren am C-terminalen Ende (also um 441 Basenpaare direkt vor dem Stop-Codon) führt zu erhöhten Calciumströmen [31]. Verkürzte Isoformen der porenbildenden  $Ca_v1.2$  Untereinheit kommen in vielen Geweben häufiger vor als die Untereinheit in voller Länge [18, 32, 38, 6]. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in nativen Systemen, exprimieren heterologe Systeme die  $\alpha_{1C}$  Untereinheit allerdings voll [32, 9, 94, 52], es sei denn man kürzt die kodierende Sequenz.

Die erste Strategie, die Kürzung über Einführung zweier Stop-Codons vor den letzten 147 Aminosäuren durch SDM einzuführen schlug aufgrund der Größe der cDNA von  $\alpha_{1C}$  fehl. Daraufhin wurde die etwas komplexere Strategie des “Gen-Nähens” (*Gene Sewing*) gewählt (Abb. 3.5).

Beim Primer Design für das *Gene Sewing* war Folgendes zu beachten: (i) Der *upstream forward* Primer  $P_{uf}$  und der *downstream reverse* Primer  $P_{dr}$  mussten so gewählt werden, dass sie Schnittstellen der Originalsequenz beinhalten. Diese Schnittstellen wurden später nach der Zwischenklonierung in den Vektor pcR2.1 zur Rückligation in pcDNA3- $\alpha_{1C}$  benötigt. BamHI wurde als 5' Schnittstelle gewählt und Eco91I als 3' Schnittstelle. (ii) Der *upstream reverse* Primer  $P_{ur}$  und der *downstream forward* Primer  $P_{df}$  mussten so gewählt werden, dass sie revers komplementär zueinander waren. Sie bildeten die zukünftige Naht der beiden Fragmente. Die Lage der Primer  $P_{uf}$  und  $P_{ur}$  (blau), sowie  $P_{df}$  und  $P_{dr}$  (grün) relativ zum C-terminalen Ende der kodierenden Sequenz (rot) mit der zu deletierenden Sequenz von 441 bp (orange) ist in Abb. 3.4 A gezeigt. Die Primersequenzen sind in Anhang A.4.1 zu finden.

Die Durchführung ist in Abb. 3.5 schematisch dargestellt. Zunächst wurden die DNA-Abschnitte vor (*upstream*, Primerpaar  $P_{uf}$  und  $P_{ur}$ ) und nach (*downstream*, Primerpaar  $P_{df}$  und  $P_{dr}$ ) dem zu entfernenden Stück aus pcDNA3- $\alpha_{1C}$  durch PCR amplifiziert (Schritt 1). Diese beiden Produkte der Amplifikation wurden nach der Gelaufreinigung als *templates* zusammen mit  $P_{uf}$  und  $P_{dr}$  in eine PCR eingesetzt deren Produkt der zusammengehegte gekürzte C-Terminus war (Schritt 2). Die PCR-Ansätze und -Programme sind in Anhang A.3 aufgeführt.

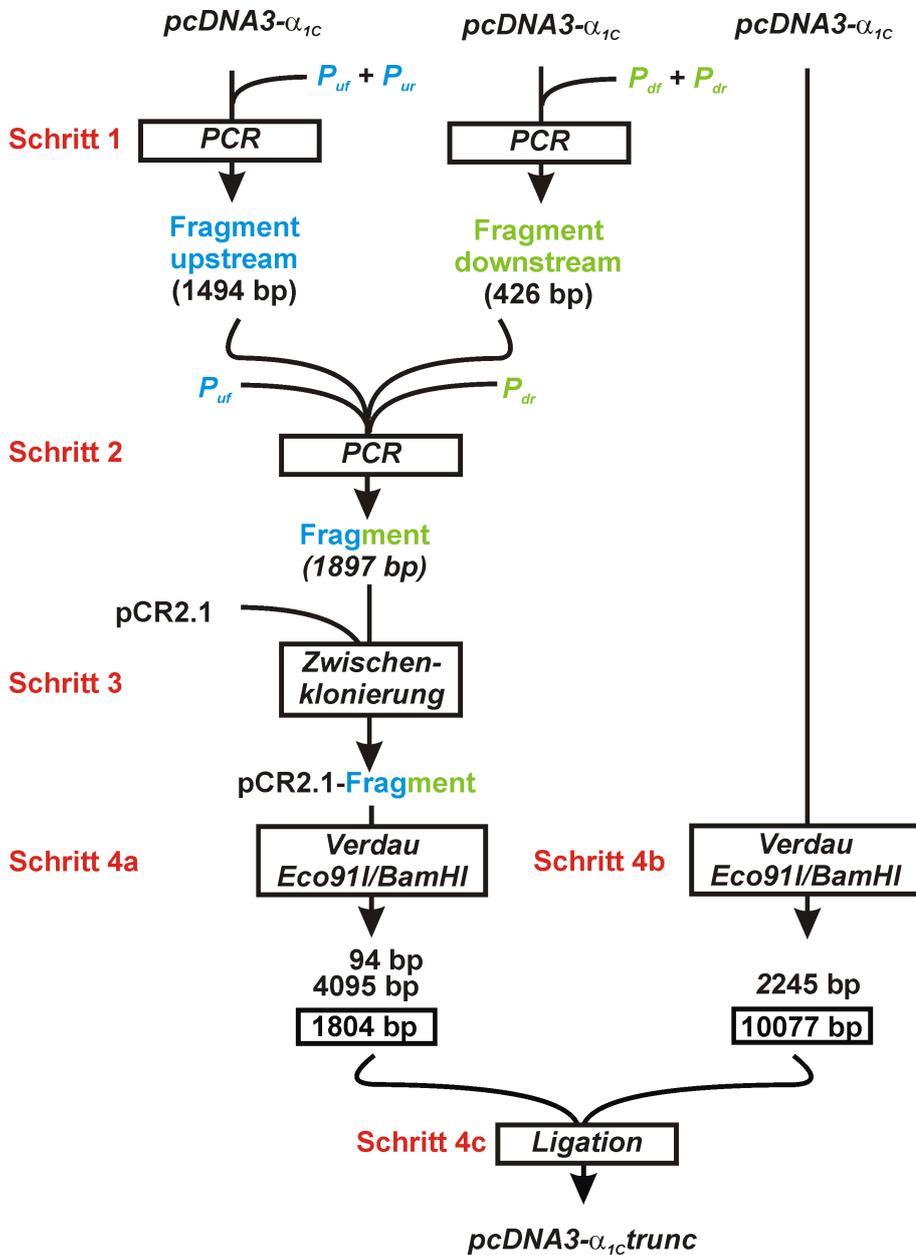
Der neue C-Terminus wurde nach der Gelextraktion ("QIAquick Gel extraction" Kit von Qiagen) zunächst mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen in pcR2.1 zwischenkloniert (Schritt 3), in "One Shot Top10" E.coli Zellen nach dem Protokoll des Herstellers transformiert, amplifiziert (Maxipräp, nach "Qiagen Plasmid Maxi" Kit von Qiagen) und sequenziert. Aus pcR2.1 wurde das Fragment anschließend mit Eco91I und BamHI ausgeschnitten (Schritt 4a, sequenzieller Verdau) und gel-aufgereinigt. pcDNA3- $\alpha_{1C}$  wurde ebenfalls mit Eco91I und BamHI verdaut (Schritt 4b, sequenzieller Verdau) und anschließend gel-aufgereinigt. Der geschnittene Vektor und die kodierende Sequenz des neuen C-Terminus wurden anschließend zu pcDNA3- $\alpha_{1C}trunc$  ligiert (Schritt 4c, Protokoll der Ligation siehe Anhang A.3). Anschließend wurden "One Shot Top10" E.coli Zellen nach dem Protokoll des Herstellers mit pcDNA3- $\alpha_{1C}trunc$  transformiert und der neue Vektor amplifiziert (Maxiprep, nach "Qiagen Plasmid Maxi" Kit von Qiagen).

### Klonierung von $\alpha_2\delta_1$ und $\beta_{2a}$ in den bicistronischen Vektor pIRES

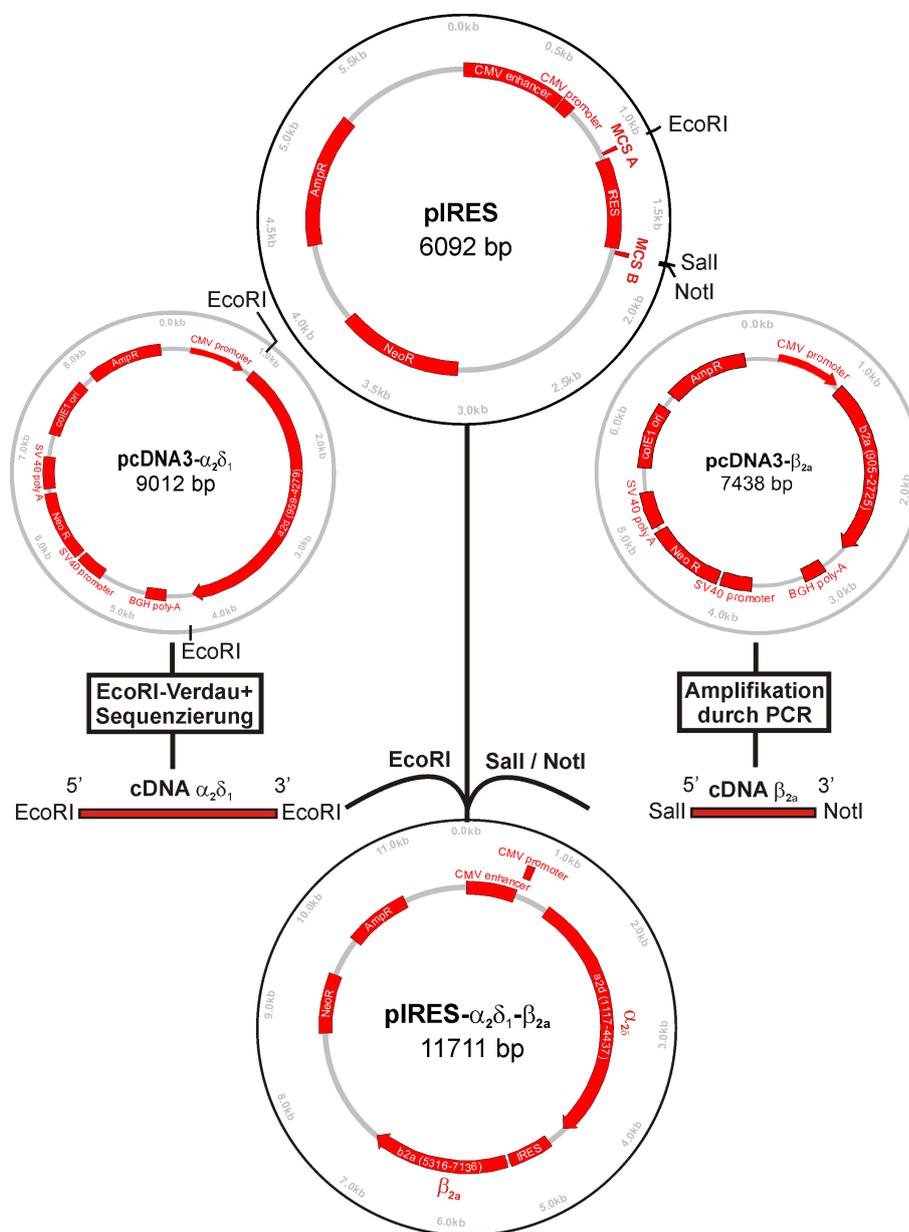
Zur Transfektion von HEK-Zellen mit drei Untereinheiten und einem Reporter wurden  $\alpha_2\delta_1$  und  $\beta_{2a}$  in den bicistronischen Vektor pIRES kloniert (Abb. 3.6).

Aus pcDNA3- $\alpha_2\delta_1$  wurde  $\alpha_2\delta_1$  mit EcoRI ausgeschnitten und in die *Multiple cloning site* (MCS) A von pIRES eingesetzt (linke Seite von Abb. 3.6, Protokoll der Ligation siehe Anhang A.3). Die richtige Orientierung der cDNA wurde über Sequenzierung sichergestellt. Die Untereinheit  $\beta_{2a}$  wurde über PCR amplifiziert (Primer bzw. PCR-Ansatz und -Programm siehe Anhang A.4.1 bzw. A.3). Das Primerpaar war so gewählt, dass eine 5' Sall Schnittstelle, eine Kozak-Sequenz und eine 3' NotI Schnittstelle eingeführt wurden. Das Produkt der Amplifikation wurde nach Gelaufreinigung in die MCS B von pIRES kloniert (rechte Seite von Abb. 3.6). Hierfür wurden das Produkt der Amplifikation und pIRES mit NotI und Sall sequentiell verdaut. Anschließend erfolgte die Gelaufreinigung und Ligation. Die korrekte Sequenz des fertigen Produktes pIRES- $\alpha_2\delta_1$ - $\beta_{2a}$  wurde bei der anschließenden Sequenzierung verifiziert.

Trotz der eigentlich für die Klonierung von Reportern gedachten attenuierten MCS B, führte Koexpression von pIRES- $\alpha_2\delta$ - $\beta_{2a}$  mit  $\alpha_{1C}trunc$  oder  $\alpha_{1C}$  zu ausreichender Kanal-



**Abbildung 3.5:** Klonierstrategie *pcDNA3- $\alpha_{1C}$  trunc*. Die DNA-Fragmente *upstream* bzw. *downstream* des zu entfernenden Stück wurden mit den Primern  $P_{uf}$  und  $P_{ur}$ , bzw.  $P_{df}$  und  $P_{dr}$  aus *pcDNA3- $\alpha_{1C}$*  durch PCR amplifiziert (Schritt 1). Beide Fragmente wurden als *template* zusammen mit  $P_{uf}$  und  $P_{dr}$  in eine PCR eingesetzt, deren Produkt die kodierende Sequenz für den zusammengenähten gekürzten C-Terminus war (Schritt 2). Nach Zwischenklonierung in pCR2.1 (Schritt 3) und Amplifikation in *E. coli* wurde die Sequenz mit *Eco91I* und *BamHI* ausgeschnitten (Schritt 4a) und mit dem ebenfalls *Eco91I/BamHI*-doppelverdauten *pcDNA3- $\alpha_{1C}$*  (Schritt 4b) zu *pcDNA3- $\alpha_{1C}$  trunc* ligiert (Schritt 4c).



**Abbildung 3.6:** Klonierstrategie pIRES- $\alpha_2\delta_1$ - $\beta_{2a}$ . Aus pcDNA3- $\alpha_2\delta_1$  wurde  $\alpha_2\delta_1$  mit EcoRI ausgeschnitten und in die MCS A von pIRES eingesetzt (links). Die Untereinheit  $\beta_{2a}$  wurde mit einem Primerpaar (siehe Anhang A.4.1) durch PCR amplifiziert, das eine 5' Sall Schnittstelle, eine Kozak-Sequenz und eine 3' NotI Schnittstelle einführte. Das Produkt der Amplifikation wurde in die MCS B von pIRES kloniert (rechts).

expression, so dass vom Einsatz des nicht attenuierten Vektors pIRES2 abgesehen wurde.

### 3.2.3 Transfektion

Die HEK-Zellen wurden mit pcDNA3- $\alpha_{1C}trunc$ , pIRES- $\alpha_2\delta_1$ - $\beta_{2a}$  und pEYFP, die Ca<sub>v</sub>1.2-Zellen wurden mit pcDNA3- $\alpha_2\delta_1$  und pEYFP transient transfiziert. Es wurden stets Zellen mit deutlich sichtbarer EYFP-Fluoreszenz für die Messungen ausgewählt. So kamen in allen Messungen Zellen zum Einsatz, die eine porenbildende Untereinheit ( $\alpha_{1C}$  oder  $\alpha_{1C}trunc$ ) und die Hilfsuntereinheiten  $\alpha_2\delta_1$  und  $\beta_{2a}$  exprimierten. Es wurde stets  $\alpha_{1C}$  als porenbildende Untereinheit eingesetzt, wenn nicht ausdrücklich auf den Einsatz von  $\alpha_{1C}trunc$  hingewiesen wird.

Vier bis fünf Tage nach dem Aussäen wurden die Zellen bei 90% Konfluenz mit Trypsin-EDTA (5 min, 37°C) abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und in einer Dichte von 15% bis 25% in 3.5 cm Schalen neu ausgesät. Nach 24 h-48 h, bei einer Dichte von 40% bis 70%, wurden sie nach der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert.

#### Calciumphosphat-Transfektion

Es wurde ein optimiertes Protokoll der Calciumphosphat-Transfektion verfolgt (Angaben für zehn 3.5 cm Schälchen mit jeweils 2 ml Medium):

1. Medium wechseln, 1 h inkubieren bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
2. 25 µg Chloroquin pro Schale zu geben (25 mM Stammlösung in PBS direkt in die Schale verdünnen), 1 min inkubieren bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
3. vorgemischten Transfektionsansatz zugeben (s.u.), 4 h inkubieren bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
4. zweimal mit PBS waschen und neues Medium zugeben, 24 h inkubieren bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Chloroquin hemmt lysosomale Hydrolasen und dadurch den Abbau der zu transfizierenden DNA. Die Effizienz einer Transfektion kann durch Behandlung der Zellen mit Chloroquin erhöht werden. Es ist allerdings bei längerer Einwirkung toxisch und sollte daher nicht länger als 5 h inkubiert werden.

Es wurden stets 25 µg Kanal-cDNA eingesetzt dabei war das Massenverhältnis der verschiedenen Plasmide je nach Zusammensetzung der Untereinheiten wie folgt:

- pcDNA3- $\alpha_{1C}trunc$  : pIRES- $\alpha_2\delta_1$ - $\beta_{2a}$  : pEYFP im Verhältnis 1 : 1 : 0.2
- pcDNA3- $\alpha_2\delta_1$  : pEYFP im Verhältnis 1 : 0.2

Diese DNA-Mischung wurde zunächst gemischt und dann mit den Komponenten für die Calciumphosphatpräzipitation versetzt:

1. + 100 µl CaCl<sub>2</sub>
2. vortexen
3. mit TE auf 1 ml auffüllen

4. 1 ml 2x HeBS Puffer
5. vortexen
6. Mischung 1 min ruhen lassen
7. sofort danach je 200  $\mu$ l Ansatz in jede Schale geben.

Die Stammlösungen für  $\text{CaCl}_2$ , TE-Puffer und HeBS-Puffer sind in Anhang A.4.2 aufgeführt.

Die transfizierten Zellen wurden 24 h nach der Transfektion unter Verwendung von Trypsin-EDTA (5 min, 37 °C) gesplittet und in etwa 10 % bis 20 % Dichte in serumfreiem DMEM auf die beschichteten Chips aufgebracht. Nach weiteren 16 h bis 29 h Inkubation wurden Zellen mit sichtbarer EYFP-Expression für die Messungen ausgewählt.

### 3.2.4 Reinigung und Beschichtung der Stimulationschips

Um die extrazelluläre Öffnung von  $\text{Ca}_v1.2$  zu studieren, mussten die  $\text{Ca}_v1.2$ -Zellen auf Stimulationschips kultiviert werden. Hierfür wurden die Zellkulturschalen mit den eingeklebten Chips (siehe Punkt 3.1.1 auf Seite 19) mit Millipore-Wasser vorgespült. Schale und Chipoberfläche wurden mit Spülmittellösung (ca. 20 °C, 5 % Tickopur R36) und einem öl-freien Reinigungstäbchen mechanisch gründlich gereinigt. Anschließend wurde jeder Chip mit 0.5 l Millipore-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Dann wurden die Chips durch 40 min UV-Licht in der Sterilbank sterilisiert.

HEK-Zellen wachsen nicht auf blanken Glas- oder Siliziumoberflächen. Die Chipoberfläche musste mit dem extrazellulären Matrix (ECM) Protein Fibronectin beschichtet werden, um Zelladhäsion zu ermöglichen. Obwohl HEK-Zellen keine fokalen Adhäsionen ausbilden können [87], adhäreren sie auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen. Die Chips wurden mit einem Tropfen 10  $\mu$ g/ml Fibronectin-Lösung für 2 h bei 37 °C im Inkubator überschichtet (Fibronectin-Stammlösung 1 mg/ml, siehe Anhang A.4.2). Die Schalen wurden anschließend zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml serumfreiem DMEM befüllt. Innerhalb der nächsten 20 min wurden die Zellen aufgebracht.

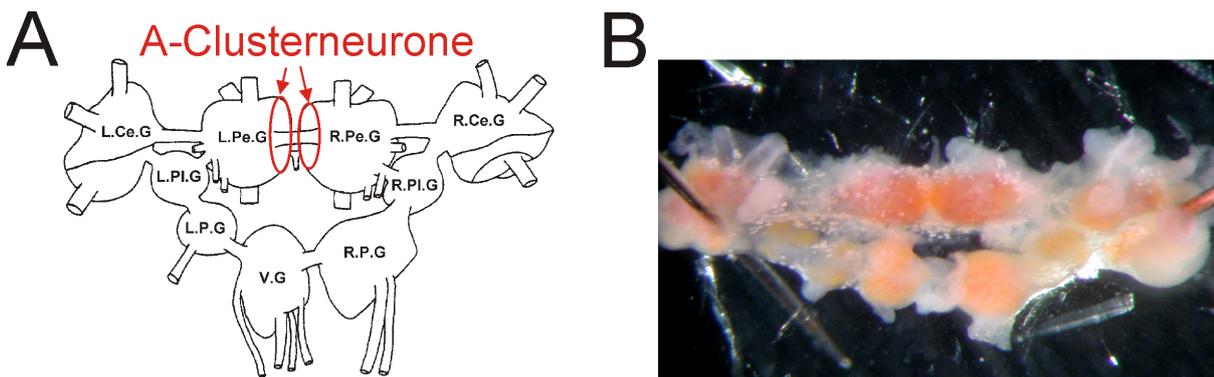
## 3.3 Wachstumskegel von Schneckenneuronen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Neuronen von *Lymnea stagnalis* gearbeitet. Die Tierhaltung war in der Abteilung etabliert [57]. Die Zusammensetzung der für Präparation und Kultivierung benötigten Lösungen sind in Anhang A.4.2 auf Seite 123 zu finden.

### 3.3.1 Präparation von A-Cluster-Neuronen

Die Vorgehensweise folgt der Beschreibung von Syed [115].

Vor Beginn wurde das Präparationsbesteck mit 70%igem Ethanol gereinigt. Alle Arbeiten im Anschluss an die Anästhesie wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank bei ca. 20 °C durchgeführt. Drei bis vier Monate alte Jungtiere (Gehäuselänge 1.5 cm bis 2.5 cm) wurden mit einer Pinzette von ihrem Gehäuse befreit und in 10%-25%iger Listerine-Lösung in Antibiotischer Saline (ABS) für 10 min betäubt.



**Abbildung 3.7:** Dorsale Ansicht des zentralen Nervensystem von *Lymnea stagnalis*. Abbildung aus [137]. **A** Schematische Darstellung der dorsalen Ansicht und Lokalisation der beiden A-Cluster (rot). Nomenklatur der Ganglien: L=links, R=rechts, G=Ganglion, Pe=Pedal, Ce=Cerebral, Pl=Pleural, P=Parietal, V=Visceral, nach [114]. **B** Foto der dorsalen Ansicht nach dem Aufspannen.

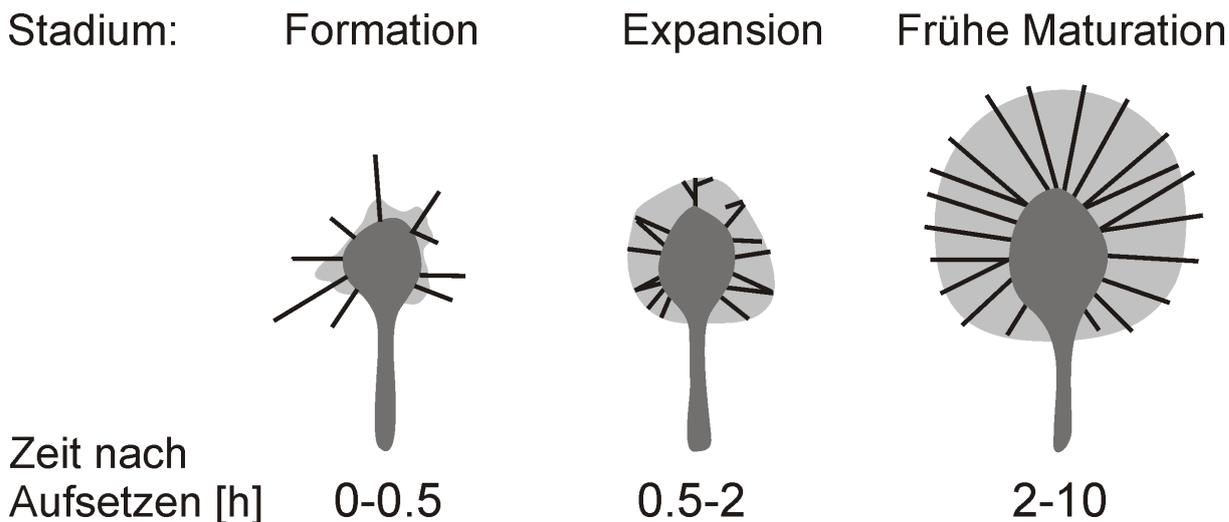
Der Körper wurde in einer Schale mit Sylgardboden festgepinnt, am Rücken geöffnet, der circumpharyngeale Ganglienring wurde freigelegt und die Cerebral-Kommissur durchtrennt. Das Gewebe im Bereich der Pedalganglien wurde im Hinblick auf den späteren Enzymverdau besonders gründlich entfernt. Abschließend wurden alle Nervenstränge bis auf einen am Visceralganlion, der als Angriffspunkt für die Pinzette diente, bündig abgeschnitten und der Ganglionring in eine Schale mit ABS überführt.

Die Ganglienringe wurden mehrmals gewaschen (3x10 min in ABS) und das übrige äußere Gewebe mit Trypsin enzymatisch anverdaut (6 mg Trypsin in 3 ml Definiertem Medium DM, 23 min). Anschließendes Baden in Trypsin-Inhibitor (6 mg Trypsininhibitor in 3 ml DM, 10 min ) stoppte den Verdau. Die Ganglienringe wurden in eine Schale transferiert und mittels Minutien kreuzförmig aufgespannt. Abb. 3.7 zeigt eine schematische Darstellung und ein Foto der dorsalen Ansicht des Gehirns zu diesem Zeitpunkt und beschreibt die Lage der Ganglien.

Nach 10 min wurde das Gewebe, dass die Pedalganglien umspannt, mit sehr feinen, handgeschliffenen Pinzetten vorsichtig aufgerissen. Da viele Zellen des A-Clusters Projektionen in andere Ganglien haben, erleichterte ein kräftiger Kniff mit der Pinzette in die Kommissuren die spätere Entnahme.

Die Entnahme erfolgte mithilfe einer Glaspipette mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 70  $\mu\text{m}$ . Diese war durch einen Schlauch mit einer Hamiltonspritze verbunden. Glaspipette, Schlauch und Spritze wurden luftblasenfrei mit HODM (siehe Anhang A.4.2) befüllt. Die Pipette wurde mit einem mechanischen Mikromanipulator bewegt. Durch Saugen wurde ein Zellkörper aus dem Ganglion in die Pipette gezogen, bis das Axon abriß und das Soma mit seinem Axonstumpf auf den Chip transferiert werden konnte.

Die Neurone wurden in DM so auf HfO<sub>2</sub>-Chips aufgesetzt, dass ihre Somata außerhalb des Kondensators und ihre Axonstümpfe auf dem Kondensator zu liegen kamen (siehe Kapitel 6). So war sichergestellt, dass die Wachstumskegel direkt stimuliert wurden und nicht sekundäre Effekte der Stimulation der Somata im Wachstumskegel gemessen wurden.



**Abbildung 3.8:** Ausbildung von immotilen Wachstumskegeln von Schneckenneuronen (*Helisoma trivolvis*, Abbildung verändert übernommen aus [127]). Die Zeitangaben entstammen eigenen Beobachtungen an Wachstumskegeln von A-Cluster-Neuronen aus *Lymnea stagnalis*. 0 h bis 0.5 h nach dem Aufsetzen bilden sich eine terminale Verdickung am Axonstumpf, aus der einzelne Filopodien und an einigen Stellen ein Lamellipod herauswachsen (Formation). Für 0.5 h bis 5 h wächst der Lamellipod soweit aus, dass er das Ende des Axonstumpfes radial umspannt. Filopodien durchspannen den Lamellipod. Der Lamellipod nimmt weiter an Größe zu (Expansion). Frühestens nach 2 h und spätestens nach 10 h ist das Stadium der Frühen Maturation erreicht: Die maximale Größe des Wachstumskegels ist erreicht. Er wird in die periphere Region des Lamellipodiums und in die zentrale Region des Axonstumpf-Endes unterteilt. Radial angeordnete Aktinbündeln durchspannen die gesamte periphere Dömäne (Aktinrippen), ihre distalen Enden ragen aus dem Lamellipodium heraus und formen die kurzen Filopodien.

### 3.3.2 Kultivierung der Neurone und Ausbildung von Wachstumskegeln

Wie für Neurone der Schnecke *Helisoma trivolvis* beschrieben [12], bildeten Neurone des A-Clusters aus *Lymnea stagnalis* nach dem Aufsetzen auf Poly-L-Lysin und DM aus ihren Axonstümpfen immotile Wachstumskegel in drei Stadien (siehe Abb. 3.8):

1. Formation: Ausbildung einer Schwellung am Ende des Axonstumpfes, Ausbildung von Filopodien und einem Lamellipod
2. Expansion: Größenzunahme des Wachstumskegels als Folge lateraler und zentrifugaler Ausbreitung des Lamellipodiums
3. Frühe Maturation: Keine weitere Größenzunahme, radial orientierte Aktinbündel (sog. Aktinrippen) durchspannen die gesamte Breite des Lamellipods, ihre distalen Enden ragen aus dem Lamellipodium heraus und formen die kurzen Filopodien.

Die morphologischen Charakteristika des Zytoskeletts sind in Abb. 3.8 schematisch dargestellt (Abbildung abgeändert übernommen aus [127]).

Es wurden Wachstumskegel für die Experimente ausgewählt, die 2 h bis 6 h nach dem Aufsetzen die typische Morphologie des Stadiums früher Maturation zeigten. Es wurde mit Wachstumskegeln mit einem Radius zwischen 25  $\mu\text{m}$  und 50  $\mu\text{m}$  gearbeitet. Die Messungen fanden in ABS statt (siehe Anhang A.4.2).

### 3.3.3 Reinigung und Beschichtung der Stimulationschips

Die Reinigung der in Zellkulturschalen eingeklebten Stimulationschips wurde analog zu dem in Punkt 3.2.4 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Einziger Unterschied war, dass die Spülmittellösung hier auf ca. 60 °C vorgewärmt wurde.

Die gereinigten Chips wurden mit einem Tropfen Poly-L-Lysin (PLL) Stammlösung (siehe Anhang A.4.2) überschichtet und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Chip 1x mit 4 ml Aqua ad gewaschen, dann 1x mit 4 ml ABS und schließlich 1x mit 4 ml Aqua ad. Anschließend wurden die Chips mindestens drei Tage und höchstens vier Wochen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Erst direkt vor dem Aufsetzen der Neurone wurden sie mit je 3 ml DM überschichtet.

Für die Stammlösung wurden 25 mg PLL (Molekulargewicht 70000-150000) in 25 ml Tris/HCl (pH 8.4) gelöst und sterilfiltriert. Die Stammlösung wurde bei 4 °C vorzugsweise sofort, maximal aber bis zu 2 Wochen verwendet.

## 3.4 Patch Clamp-Messungen an HEK-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden *Patch Clamp*-Experimente an  $Ca_v1.2$ -Zellen durchgeführt [83, 46, 37].

Um die elektrische Kontrolle über eine ganze Zelle (*whole cell*) zu erhalten, wurde mit einer Pipette ein elektrischer Zugang zum Zellinneren hergestellt. Die Glaspipetten wurden mit einem Puller in drei Schritten aus Borosilikat-Glaskapillaren gezogen und anschließend feuerpoliert. Die Pipettenwiderstände lagen zwischen 1.8 M $\Omega$  bis 2.3 M $\Omega$ . Die Kapazität der Pipetten lag bei ca. 8 pF bis 10 pF. Die Pipetten wurden mit einem Elektrolyten (Intrazellulärlösung, ICL) befüllt und in einen Elektrodenhalter montiert, der mittels eines chlorierten Silberdrahtes elektrischen Kontakt zur Pipettenlösung herstellte und eine Kontrolle des Drucks in der Pipette ermöglichte. Unter leichtem Überdruck wurde die Pipette der Zelle angenähert, bis sich die Membran durch den Lösungsstrom leicht einwölbte. Bei Lösen des Überdruckes oder leichtem Unterdruck schmiegte sich die Membran an die Innenwand der Pipettenöffnung an, wodurch der elektrische Zugangswiderstand zwischen Pipetteninnerem und Bad stark und sprunghaft anstieg. Der Abdichtwiderstand (engl: *seal*) in diesem sog. *cell attached* Modus betrug bis zu mehreren Gigaohm und reduziert das Hintergrundrauschen soweit, dass Membranströme im pA-Bereich aufgelöst werden können. Die Messungen wurden bei typischen Abdichtwiderständen von 1.8 G $\Omega$  bis 10 G $\Omega$  durchgeführt.

Um aus dem *cell attached* Modus Zugang zum Zellinneren zu erreichen ohne dass der Abdichtwiderstand sinkt, wird die Membran in der Pipette durch kurzen, kräftigen Unterdruck aufgerissen. Der Zugangswiderstand wird vom Pipettenwiderstand dominiert und beträgt nur wenige Megaohm. Durch Diffusion kommt es zu einem Austausch der mobilen Bestandteile des Zytosols gegen die ICL, die somit nach wenigen Minuten die Ionenzusammensetzung in der Zelle bestimmt.

Über die Elektrode in der Pipette wird entweder die intrazelluläre Spannung  $V_M$  kontrolliert und der Strom über die Zellmembran  $I_M$  gemessen (*Voltage Clamp*), oder  $I_M$  wird kontrolliert und  $V_M$  gemessen (*Current Clamp*).

Im *Voltage Clamp*-Modus können spannungsabhängige Membraneigenschaften wie die Dynamik von Ionenkanälen untersucht werden. Der intrazellulären Spannung wird ein bestimmter Verlauf aufgezwungen und der resultierende Membranstrom gemessen.

Im *Current Clamp* wird ein definierter Strom durch die Pipette in die Zelle injiziert und die Antwort der intrazellulären Spannung gemessen. In den hier durchgeführten Messungen war der injizierte Strom stets gleich Null und die ungestörte Reaktion der Zelle auf die extrazelluläre Stimulation wurde beobachtet. Für Messungen in *Current Clamp* wurden die Zellen zunächst im *Voltage Clamp*-Modus kontaktiert. Dann wurde am Verstärker in *Current Clamp* umgeschaltet.

Je nach Zielsetzung der Experimente kamen unterschiedliche Lösungspaare mit verschiedenen, aufeinander abgestimmten Intrazellulärlösungen (ICLs) und Extrazellulärlösungen (ECLs) zum Einsatz (molare Zusammensetzung der Lösungen siehe Anhang A.4.4).

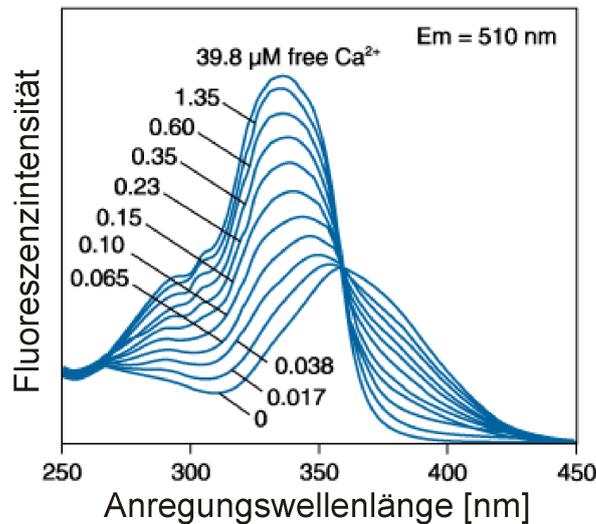
1. Lösungspaar 1 wurde eingesetzt, um die Kanaleigenschaften von  $\text{Ca}_v1.2$  in *Voltage Clamp* zu untersuchen. Es handelt sich um  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -freie Lösungen mit dem  $\text{Ca}_v1.2$  permeablen Ladungsträger  $\text{Ba}^{2+}$  in hoher Konzentration. Sie wurden bereits mehrfach für Kanalstudien von L-Typ VDCCs in HEK293-Zellen verwendet [64, 66].  $\text{K}^+$  ist durch  $\text{Cs}^+$  ersetzt,  $\text{Na}^+$  durch das basische Amin N-Methyl-D-glucamin (NMDG), das in wässriger Lösung zum Teil positiv geladen ist. Die Calciumkonzentration von ICL 1 ist mit EGTA gepuffert und mit  $\text{Ba}^{2+}$  als Ladungsträger wird die calciumabhängige Inaktivierung von  $\text{Ca}_v1.2$  verhindert.
2. Lösungspaar 2 war Lösungspaar 1 nachempfunden, lediglich in ECL 2 war das Kation NMDG durch Glucose ersetzt, um die Leitfähigkeit von ECL 1 für die extrazelluläre Stimulation herabzusetzen. ICL 2 war gleich ICL 1.
3. In Lösungspaar 3 war der Ladungsträger in ECL 3 nun nicht mehr  $\text{Ba}^{2+}$ , sondern  $\text{Ca}^{2+}$  in derselben hohen Konzentration. ICL 3 war wie ICL 1.
4. Lösungspaar 4 war eine  $\text{Cs}^+$ -freie Variante von Lösungspaar 3. ICL 4a enthielt  $\text{CaCl}_2$  und EGTA. Sie wurde für rein elektrophysiologische Messungen eingesetzt. ICL 4b enthielt weder  $\text{CaCl}_2$  noch EGTA, sondern nur Fura-2 Pentapotassiumsalz als einzigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer und kam in den simultanen elektrophysiologischen und fluoreszenzoptischen Aufnahmen zum Einsatz.

## 3.5 Fluoreszenzmikroskopie mit Fura-2

Der Calciumindikator Fura-2 [35] bindet  $\text{Ca}^{2+}$  mit einer einfachen Stöchiometrie von 1:1. Im Vergleich zu seinem Vorgänger quin2 hat Fura-2 vier wesentliche Vorteile: (i) eine höhere Quantenausbeute, (ii) eine etwa um Faktor 2 geringere Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ , (iii) eine 4mal bessere Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  über  $\text{Mg}^{2+}$  und (iv) eine Verschiebung des Fluoreszenz-Anregungsspektrums bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung hin zu niedrigeren Wellenlängen (siehe Abb. 3.9 auf der nächsten Seite).

Diese Verbesserungen haben wichtige Folgen:

1. Die höhere Quantenausbeute ermöglicht schon bei geringen Farbstoffkonzentrationen Messungen mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis.
2. Die geringere Affinität führt zu einer größeren Dissoziationskonstante, die mit etwa 200 nM im Bereich der typischen zytosolischen Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  liegt. So kann  $[\text{Ca}^{2+}]_i \leq 1 \mu\text{M}$  gemessen werden, darüber ist eine quantitative Bestimmung nicht mehr möglich.



**Abbildung 3.9:** Anregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen freien Calciumkonzentrationen. Abbildung verändert übernommen von Molecular Probes.

3. Messungen des intrazellulären sekundären Botenstoffes  $\text{Ca}^{2+}$  sind mit wesentlich weniger Störungen durch  $\text{Mg}^{2+}$  möglich.
4. Durch die Verschiebung des Anregungsspektrums bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung ist der Quotient zweier Fluoreszenzintensitäten unabhängig von der Farbstoffkonzentration ein direktes Maß für  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Diese Eigenschaft ermöglicht ratiometrische Messungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Messung bei zwei Anregungswellenlängen.

Bei der Verwendung von Fura-2 (wie auch bei allen anderen calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen) ist zu beachten, dass sie sich in der Zelle wie von außen eingebrachte (exogene) Calcium-Puffer verhalten, die das endogenen Puffersystem stören und das Calciumsignal durch ihre Anwesenheit verändern.

Bei der Fluoreszenzmessung können je nach Konzentration des Farbstoffes zwei extreme Situationen unterschieden werden [82, 81]:

### 3.5.1 Hohe Farbstoffkonzentration: Messung von $I_{\text{Ca}^{2+}}$

Bei sehr hoher Farbstoffkonzentration überwiegt der exogene Farbstoff die endogenen Calciumpuffer und das eingeströmte  $\text{Ca}^{2+}$  wird vollständig vom ihm abgefangen. Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist festgelegt und der Calciuminflux  $I_{\text{Ca}^{2+}}$  in das Zytosol wird gemessen. Quantitative Aussagen sind über Messungen bei nur einer calciumsensitiven Wellenlänge (*single wavelength*) möglich, da die einfließende Ladungsmenge proportional zur absoluten Änderung der Fluoreszenz ist. Ist der Proportionalitätsfaktor für einen Versuchsaufbau einmal bestimmt, reicht eine fluoreszenzoptische Messung bei Anregung mit einer Wellenlänge, um den transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx  $I_{\text{Ca}^{2+}}$  in das Zytosol zu bestimmen.

Fluoreszenzoptische Messungen von  $I_{\text{Ca}^{2+}}$  erfolgten in der vorliegenden Arbeit an  $\text{Ca}_v1.2$ -Zellen. Um den Proportionalitätsfaktor zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzänderung  $\Delta F$  bei Anregung mit einer Wellenlänge simultan mit der elektrophysiologischen Messung des transmembranen Stroms  $I_M$  im *Voltage Clamp*-Modus durchgeführt. Der

Quotient aus  $\Delta F$  und dem Integral über den Strom  $\int I_M dt$  lieferte den Proportionalitätsfaktor  $f$ :

$$f = \frac{\Delta F}{\Delta Q} = \frac{\Delta F}{\int I_M dt} \quad (3.1)$$

Mit Hilfe von  $f$  konnte die eingeströmte Ladungsmenge nur durch Messung der Fluoreszenzänderung bestimmt werden.

Bei der Bestimmung und Anwendung des Proportionalitätsfaktors wurden nur Messungen berücksichtigt, bei denen die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}}$  niedrig war. War  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}}$  bereits zu Beginn hoch, kam der Farbstoff in den Sättigungsbereich und  $\frac{\Delta F}{\Delta Q} = f$  war nicht mehr konstant (siehe dazu auch Punkt 5.1). Um  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}}$  abzuschätzen, wurden trotz der hohen Farbstoffkonzentration ratiometrische Messungen wie unten beschrieben durchgeführt. Zu den Ausschlusskriterien für gewertete Experimente siehe Punkt 5.1.

### 3.5.2 Geringe Farbstoffkonzentration: Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Bei sehr geringer Farbstoffkonzentration kann ein ungestörtes Calciumsignal gemessen werden. Unter diesen Bedingungen sind quantitative Aussagen über die freie intrazelluläre Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über die von Grynkiewicz beschriebene ratiometrische Messung mit Messungen bei zwei Anregungswellenlängen (*dual wavelength*) möglich [35].

Bei den Stimulationsexperimenten an Wachstumskegeln von Schneckenneuronen wurden geringere Farbstoffkonzentrationen gewählt, um das endogene Puffersystem der Zelle nicht zu stören und morphologische Veränderungen als Folge der extrazellulären Stimulation beobachten zu können. Unter der Annahme, dass der Farbstoff das endogene Puffersystem nicht wesentlich stört, können die gemessenen Calciumsignale mit Hilfe der ratiometrischen Methode nach Grynkiewicz in Änderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  umgerechnet werden.

Durch die Verschiebung des Anregungsspektrums ist die Messung der Emissionsintensitäten  $F_1$  und  $F_2$  bei zwei Anregungswellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  prinzipiell ausreichend, um  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unabhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration zu berechnen [35]. Aus zwei Wellenlängen und zwei Farbstoffspezies ergeben sich vier Proportionalitätsfaktoren:  $S_{f1}$  für den freien Farbstoff, gemessen bei der Wellenlänge  $\lambda_1$ ,  $S_{f2}$  für den freien Farbstoff bei  $\lambda_2$  und  $S_{b1}$  bzw.  $S_{b2}$  für den gebundenen Farbstoff bei Wellenlänge  $\lambda_1$  bzw.  $\lambda_2$ . Mit den Quotienten  $S_{f1}/S_{f2} = R_{\text{min}}$  und  $S_{b1}/S_{b2} = R_{\text{max}}$  formulierten Grynkiewicz et al. folgende Gleichung:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D[(R - R_{\text{min}})/(R_{\text{max}} - R)]S_{f2}/S_{b2} \quad (3.2)$$

$R$  ist der Quotient der gemessenen Fluoreszenzintensitäten  $F_1/F_2$  nach Abzug des Hintergrundes durch Autofluoreszenz,  $K_D$  ist die Dissoziationskonstante und die Werte  $R_{\text{min}}$  und  $R_{\text{max}}$  sind die Extrema, die der Quotient bei  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$  mM bzw. sättigendem  $[\text{Ca}^{2+}]_i \gg 1$  mM erreicht.

Die beiden Wellenlängen  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  können prinzipiell frei gewählt werden. Am sinnvollsten ist es allerdings, entweder  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  an gegenüberliegenden Punkten des Spektrums zu wählen und so die spektrale Sensitivität des Farbstoffs voll auszunutzen, oder aber eine der Wellenlängen an dem Punkt zu wählen, wo sich die beiden Spektren kreuzen (isosbestischer Punkt,  $\lambda = 360$  nm). Hier ist die Fluoreszenzintensität nicht von  $\text{Ca}^{2+}$ ,

sondern nur von der absoluten Farbstoffbeladung abhängig und es gilt  $S_{f_2} = S_{b_2}$ , so dass sich Gleichung 3.2 auf der vorherigen Seite vereinfacht zu:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D[(R - R_{min})/(R_{max} - R)] \quad (3.3)$$

Es wurden  $\lambda_1 = 360$  nm und  $\lambda_2 = 380$  nm gewählt, so dass Gleichung 3.3 galt. So war stets eine Kontrolle über die Farbstoffbeladung der Zelle möglich. Außerdem war es so prinzipiell möglich, Austritt von Farbstoff durch unspezifische Poren nach Elektroporation durch eine der Bleichung überlagerte Abnahme der Fluoreszenzintensität zu detektieren.

Die Werte für  $R_{min}$  und  $R_{max}$  wurden über eine Kalibrierung bestimmt: Fura-2 beladene Zellen wurden durch Inkubation mit der Calciumionophore Ionomycin für  $Ca^{2+}$  permeabel gemacht und mit ECLs der extremen Konzentrationen  $[Ca^{2+}]_e^{min} = 0$  mM (HEK: ECL 6, Wachstumskegel: ECL8, siehe Anhang A.4.4) und  $[Ca^{2+}]_e^{max} = 20$  mM (HEK: ECL 7, Wachstumskegel: ECL 9, siehe Anhang A.4.4) umspült.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde so durch die Konzentrationen  $[Ca^{2+}]_e^{min} = 0$  mM bzw.  $[Ca^{2+}]_e^{max} = 20$  mM bestimmt. Vorversuche zeigten, dass bei HEK-Zellen mit  $5 \mu\text{M}$  Ionomycin innerhalb von wenigen Minuten  $R_{max}$  erreicht war, unabhängig vom Zusatz der  $Na^+$ -Ionophore Monensin und des  $H^+/K^+$ -Antiporters Nigericin in ECL 7 (die Gifte zerstören den  $Na^+$ -Gradienten und hemmen so den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Antiport). Bei Wachstumskegeln wurde  $R_{max}$  unabhängig vom Einsatz von Monensin und Nigericin erst nach etwa 30 min erreicht. Bei den Wachstumskegeln von Schnecken wurden die Werte  $R_{min} = 0.7$  und  $R_{max} = 2.4$  bestimmt, bei HEK293-Zellen war  $R_{min} = 0.9$  und  $R_{max} = 2.0$ .

Für die Schnecke *Helisoma trivolvis* sind Literaturwerte für die Dissoziationskonstante veröffentlicht ( $K_D = 214$  nM [11]). Da sich die Werte nicht sehr stark vom Standardwert  $K_D = 224$  nM aus [35] unterschieden, wurde letzterer verwendet.

Als Hintergrund-Werte konnten die mittleren Fluoreszenzintensitäten der zellfreien Kondensatoroberfläche abgezogen werden, da weder die Autofluoreszenz der Wachstumskegel, noch die der HEK-Zellen unter den Messbedingungen signifikant war.

### 3.5.3 Beladung von HEK-Zellen

In simultanen fluoreszenzoptischen und elektrophysiologischen Messungen wurden die Zellen über die Patchpitte unter Verwendung von ICL 4b (siehe Anhang A.4.4) mit  $0.5$  mM Fura-2 beladen. Erfahrungswerte von Neher et al. rechtfertigen die Annahme, dass der exogene Farbstoff in einer Konzentration von  $0.5$  mM die endogenen Puffer überwiegt [82].

Fura-2 wurde als Stammlösung in Aqua ad aufbewahrt und auf Bedarf zu einer 2x Stammlösung ICL 4b dazu pipettiert. Die ICL wurde anschließend über Zentrifugen-Sterilfilter (Ultrafree-MC, Millipore) erneut filtriert und von hinten in die Patchpipette gefüllt. Die vorderste Spitze der Patchpipette wurde mit ICL 4b ohne Fura-2 befüllt.

Nach dem Durchbrechen der Membran erfolgte die Dialyse des Zytosol mit ICL 4b und der Beladungszustand der Zelle wurde über die Fluoreszenzemission von Fura-2 bei  $360$  nm Anregung verfolgt. Nach  $3$  min bis  $5$  min erreichte die Fluoreszenzintensität ihr Maximum, die mobilen Komponenten des Zytosols waren vollständig ausgespült und durch ICL 4b ersetzt. Die intrazelluläre Farbstoffkonzentration wurde als gleich der Farbstoffkonzentration in ICL 4b angenommen.

In Abwesenheit einer Pipette erfolgte die Beladung der Zelle mit hohen Farbstoffkonzentrationen mit Hilfe des membranpermeablen Acetomethylester-Derivats von Fura-2 (Fura-2 AM):

Die Zellen wurden in serumfreiem Medium für 1 h mit  $2\ \mu\text{M}$  Fura-2 AM inkubiert ( $37\ ^\circ\text{C}$ ). In dieser Zeit lagerten sich die Acetomethylester-Reste in die Zellmembran ein und ihre polaren Kopfgruppe wurden über Flippasen auf die Zellinnenseite transportiert. Unspezifische Esterasen hydrolysierten den Ester zu Essigsäure und Formaldehyd und der calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoff wurde freigesetzt. Um eine vollständige Esterase-Reaktion zu gewährleisten, wurde der Farbstoff nach der Inkubation durch zweimaliges Waschen mit PBS ganz entfernt und die Zellen in serumfreiem Medium für 45 min bis 2 h zurück in den Inkubator gestellt.

Die so beladenen Zellen zeigten eine gleichmäßige Farbstoffverteilung und die intrazelluläre Farbstoffkonzentration wurde über die Fluoreszenzemission bei 360 nm abgeschätzt. Unter Berücksichtigung der individuellen Dicke der Zellen waren die Werte in derselben Größenordnung wie nach der Beladung mit einer definierten Farbstoffkonzentration von  $0.5\ \text{mM}$  durch Dialyse mit ICL 4b. Daher wurde davon ausgegangen, dass auch bei diesen Zellen der exogene Puffer die endogenen Puffer überwog.

Bei der Beladung mit Fura-2 AM zu hohen Farbstoffkonzentrationen gab es Risiken:

1. Kompartimentalisierung
2. toxische Ansammlungen der Hydrolyse-Nebenprodukte Essigsäure und Formaldehyd
3. calciuminsensitiver Fluoreszenzhintergrund durch nicht abgespaltene Kopfgruppen

Eine Kompartimentalisierung des Farbstoffes wurde unter unseren Bedingungen nicht beobachtet. Eine toxische Ansammlung der Hydrolyse-Nebenprodukte konnte nicht ausgeschlossen werden, innerhalb der Zeit zwischen Beladung und Messung waren aber keine morphologischen Veränderungen der Zellen zu beobachten. Calciuminsensitiver Fluoreszenzhintergrund kann ratiometrische Messungen verfälschen, spielte für Messungen von  $I_{\text{Ca}^{2+}}$  bei einer Wellenlänge aber keine Rolle.

#### 3.5.4 Beladung der Wachstumskegel von *Lymnea stagnalis*

A-Cluster-Neurone von *Lymnea stagnalis* wurden präpariert wie unter Punkt 3.3 beschrieben. Nach dem Aufsetzen auf PLL in DM wurde 2 h lang die Formation und Expansion der großen, immotilen Wachstumskegel abgewartet (siehe Abb. 3.8). Anschließend wurden die Zellen mit  $5\ \mu\text{M}$  Fura-2 AM 2 h bei RT im Dunkeln beladen. Danach erfolgte ein vorsichtiger Mediumwechsel von DM mit  $5\ \mu\text{M}$  Fura-2 AM zu ABS. Hierbei durfte der Flüssigkeitsspiegel über dem Chip nicht abreißen, da die großen Zellkörper der Neurone sonst abrissen. Daher erfolgte der Mediumwechsel durch Durchspülen des Chips mit etwa 10fachem Volumen ABS (20 ml bis 30 ml) für 10 min im Dunkeln. Schließlich wurden die Neurone weitere 45 min bis 6 h im Dunkeln inkubiert, bis sie für die Messungen eingesetzt wurden. So war die vollständige Abspaltung der Fura-2 Kopfgruppen sichergestellt.

Bei diesem Beladungsprotokoll kam es teilweise zur Bildung von Farbstoffkristallen, die auf der Chipoberfläche adhärten und nicht abgewaschen werden konnten. Sie sind in einigen DIC-Aufnahmen der Wachstumskegel zu sehen.

Die Beladung der Neurone nach diesem Protokoll führte zu im Vergleich zu Punkt 3.5.3 geringen Farbstoffkonzentrationen. Die Beladung mit Farbstoff hatte keinen Einfluss auf die Bildung der Wachstumskegel. Daraus wurde geschlossen, dass das endogene Puffersystem noch soweit intakt war und die physiologischen Prozesse stattfinden konnten.

Beladung mit membranpermeablem Fura-2 AM kann zu calciumsensitiver Hintergrundfluoreszenz führen, die die Messungen verfälscht [143]. Inwieweit das auch in unserem Fall zutrifft, wurde nicht weiter untersucht. Daher lieferte die ratiometrischen Fluoreszenzmessungen an Wachstumskegeln nur eine Abschätzung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Es bestand nicht der Anspruch, die Absolutwerte von  $[Ca^{2+}]_i$  genau zu bestimmen. Direkte Vergleiche der Calciumsignale verschiedener Wachstumskegel waren dennoch möglich, da durch die ratiometrische Messmethode Effekte von inhomogener Farbstoffbeladung, passivem Leckausstrom, aktivem Abtransport und Bleichung des Farbstoffs, sowie unterschiedlichen Dicken der Wachstumskegel keine Rolle spielten.

### 3.5.5 Datenaufnahme und Datenauswertung

Die Belichtungszeit für die Fluoreszenzaufnahmen lag zwischen 50 ms und 200 ms, die Aufnahmefrequenz lag zwischen 4 Hz und 5 Hz.

Aus den Fluoreszenzbildern der Zellen bzw. Wachstumskegel wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten innerhalb rechteckiger *Regions of interest* (ROIs) ermittelt. Die ROIs bei HEK-Zellen wurden so gewählt, dass sie einen möglichst großen Teil der Zellen überdeckten, ohne dabei in den zellfreien Hintergrund hineinzuragen. Bei Wachstumskegeln wurde die ROI um die gesamte zentrale Domäne gespannt, ohne dabei Bereiche des Axons oder zellfreien Hintergrund mit einzuschließen. Um ein Signalprofil über den Wachstumskegel messen zu können (siehe Punkt 6.3.2), musste die Auswertung in mehreren kleinen ROIs erfolgen, die in einer Linie über den Wachstumskegel angeordnet wurden.

Für die Messungen bei Anregung mit einer Wellenlänge bei HEK-Zellen wurde zunächst mit zehn Bildaufnahmen die mittlere Fluoreszenzintensität vor der Stimulation  $F_0$  ermittelt. Für jede Bildaufnahme mit der Fluoreszenzintensität  $F$  wurde dann die Änderung der Fluoreszenzintensität  $\Delta F = F - F_0$  ermittelt und auf  $F_0$  normiert. Das Vorzeichen wurde invertiert. Ein Anstieg des Signals  $-\Delta F/F_0[\%]$  spiegelte einen  $Ca^{2+}$ -Influx wider.

Für die ratiometrischen Messungen wurden stets Bilderpaare aufgenommen: ein Bild bei 380 nm (Index 380) und ein Bild bei 360 nm (Index 360) Anregungswellenlänge. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Zelle bzw. des Wachstumskegels ( $F$ ) und der zellfreien Chipoberfläche ( $bg$  für *background*) wurden aus den Bildern ermittelt und das Verhältnis  $R = (F_{380} - bg_{380})/(F_{360} - bg_{360})$  für jedes Bilderpaar gebildet und mit dem Standardwert  $K_D = 224\text{ nM}$  [35], den in der Kalibrierung ermittelten Werten für  $R_{min}$  und  $R_{max}$  (siehe Punkt 3.5.2) und Gleichung 3.3 in  $[Ca^{2+}]_i$  umgerechnet. Die ermittelten  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte waren als Abschätzung zu betrachten, da Artefakte durch calciumsensitiven Fluoreszenzhintergrund nach der Beladung mit Fura-2 AM (siehe Punkt 3.5.4) und Fehler durch die Verwendung eines Standard-Literaturwertes für  $K_D$  nicht ausgeschlossen werden konnten.  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  wurden bei stabilem  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel  $[Ca^{2+}]_{i, basal}$  vor der Stimulation über  $\Delta[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i, basal}$  gebildet. Bei fallendem  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel wurde der  $[Ca^{2+}]_i$ -Wert jedes Bilderpaars auf den Einzelwert direkt vor der Stimulation bezogen.

## 3.6 Messaufbau

Abb. 3.10 zeigt eine schematische Darstellung des Messaufbaus. Die Komponenten für Elektrophysiologie und Fluoreszenzmessungen waren um ein invertiertes Mikroskop (BX

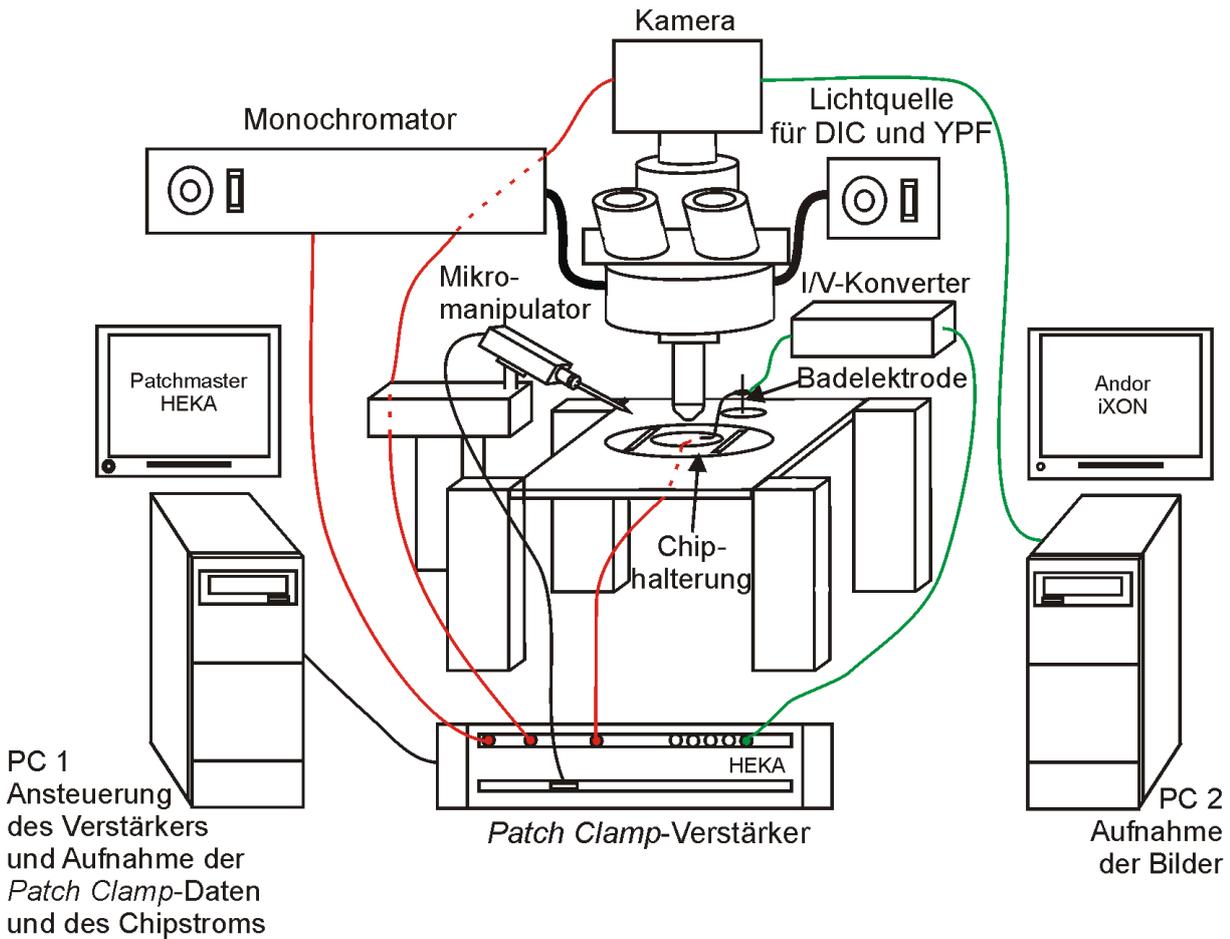
50 WI, Olympus) mit einem 40-fachem Immersionsobjektiv (LUM Plan Fl, 40x / 0.80 W, Olympus) aufgebaut. Die Zellkulturschale mit dem eingeklebten Chip wurde über eine spezielle Vorrichtung auf dem Objektivträger eingespannt (Chiphalterung). Der Elektrolyt wurde mit einer geerdeten Badelektrode kontaktiert. Der Strom floss über einen I/V-Konverter (Analog Devices AD6235) mit einem  $50\ \Omega$  Widerstand. Der Spannungsabfall über den Widerstand wurde verstärkt und mit einem Analog-Eingang des *Patch Clamp*-Verstärkers verbunden, so dass der Strom zwischen Chip und Badelektrode gemessen werden konnte.

Die Zelle konnte mit einer Messpipette kontaktiert werden, die mit einem Mikromanipulator zu positionieren war. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten mit Hilfe des *Patch Clamp*-Verstärkers EPC 10 von HEKA, der mit der HEKA-Software "Patchmaster" angesteuert wurde.

Der Farbstoff wurde mit UV-Licht von einem Monochromator (Spectralytics GmbH, Aalen) angeregt. Das Anregungslicht wurde über einen Lichtleiter auf eine Linse geleitet, die es kreisförmig mit  $120\ \mu\text{m}$  Durchmesser auf der Chipoberfläche fokussierte. Dabei pasierte es einen Fura-2-Filterwürfel mit Strahlenteiler (400 DCXRUV, AF Analysentechnik, Tübingen) und Bandpassfilter (HC-BP 510 / 84, AF Analysentechnik, Tübingen), über den das emittierte Licht in eine Andor iXon EMCCD Kamera (DV885JCS-VP, BFi OPTILAS GmbH, Puchheim) gelangte.

Neben dem Fura-2-Filterwürfel war ein GFP-Filterwürfel angebracht, um Zellen mit deutlich sichtbarer pEYFP-Expression für die Messungen auswählen zu können. Belichtet wurde hierfür mit einer weiteren Lichtquelle (Olympus TH3). Diese kam zusammen mit der *Differential Interference Contrast* (DIC)-Einheit aus Polarisator (U-PO), Analytator (U-AN360) und Wollaston-Prisma (U-DICT, alle von Olympus) auch für die DIC-Aufnahmen der Zellen und Wachstumskegel zum Einsatz.

Zur Synchronisation der Belichtung, der Chipstimulation, der Bildaufnahmen (Fluoreszenz und DIC) und der elektrophysiologischen Messungen wurden der Monochromator, die Andor iXon Kamera und der Chip über analoge Ausgänge des *Patch Clamp*-Verstärkers EPC10 angesteuert (PC 1). Die Aquisition der *Patch Clamp*-Daten und des Chipstroms erfolgte über analoge Eingänge des EPC 10 Verstärkers. Alle Ein- und Ausgänge wurden dabei mit  $50\ \text{kHz}$  abgetastet und die Datenaufnahme mit der Patchmaster-Software verwaltet. Die Aufnahme der Kamerabilder wurde von PC 2 übernommen, die Auswertung erfolgte mit der Kamera-Software Andor iXon.



**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung des Messaufbaus und seiner Komponenten. Die analogen Ausgänge des *Patch Clamp*-Verstärkers zur Ansteuerung der Komponenten sind in rot eingezeichnet, die analogen Eingänge zur Datenaufnahme in grün, Verbindungen zur Ansteuerung und Datenaufnahme sind schwarz. Die Lichtleiter zwischen Monochromator und Mikroskop bzw. der Lichtquelle für DIC-Aufnahmen sind in fett schwarz eingezeichnet.

# Kapitel 4

## Kapazitive Öffnung von $\text{Ca}_v1.2$ in HEK-Zellen

Um die kapazitive Stimulation von  $\text{Ca}_v1.2$ -Zellen durchzuführen, wurden diese auf den Kondensatoren von Halbleiterchips kultiviert. Es wurden fallende Spannungsrampen an den Kondensator angelegt um negative Spannungen in Bad und Spalt zu erzeugen und die Zellmembran zu depolarisieren (siehe Punkt 2). Die Messungen fanden in einer hochohmigen Messlösung statt, um die kleine Kopplungsfläche der HEK-Zellen zu kompensieren (siehe Punkt 2.5.2). Ein ergänzendes Experiment zur kapazitiven Stimulation von HEK-Zellen in physiologischer Messlösung ist in Anhang A.1 gezeigt.

Der Einsatz von hochohmigen Messlösungen ist ungewöhnlich. Daher wurde zunächst überprüft, ob die spannungsabhängigen Eigenschaften des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals in der hochohmigen Lösung Unterschiede zur Literatur aufwiesen.

Das kapazitive Gating der Kanäle wurde in *Voltage Clamp* studiert. Die Zelle wurde mit einer Patchpipette kontaktiert, die Membranspannung wurde konstant gehalten und der Effekt der Stimulationsrampe auf den Membranstrom gemessen. Neben kapazitiven Strömen, die durch die Spannungsänderung am Chip und die passive Umladung der Zellmembran induziert wurden, detektierte die Patchpipette den Ionenstrom durch  $\text{Ca}_v1.2$ .

Die Stimulation nicht spannungsgeklemmter Zellen wurde in *Current Clamp* untersucht. Hier ist die kapazitive Kanalöffnung schwieriger zu erreichen als in *Voltage Clamp* (siehe Punkt 2). Es wurde kein Pipettenstrom injiziert, um die Situation einer intakten Zelle nachzustellen. Kanalöffnung war erkennbar, wenn das eingeströmte  $\text{Ca}^{2+}$  das intrazelluläre Potential anhub.

### 4.1 Elektrophysiologie von $\text{Ca}_v1.2$

HEK-Zellen, die die Kanaluntereinheiten  $\alpha_{1C}$ ,  $\beta_{2a}$  und  $\alpha_2\delta_1$  exprimierten (im Folgenden:  $\text{Ca}_v1.2$ -Zellen) wurden im *whole cell* Modus typischen *Voltage Clamp* Protokollen unterzogen und der Kanal über seine Strom-Spannungs (I/V-) Kennlinie charakterisiert.

Der Stromfluss durch die porenbildende Untereinheit  $\alpha_{1C}$  wird durch Interaktion mit den Untereinheiten moduliert. Verschiedene Publikationen [64, 105] befassen sich mit der Kanalcharakterisierung von  $\text{Ca}_v1.2$  in HEK-Zellen. Für den Vergleich mit den publizierten Kanaleigenschaften wurde  $\text{Ca}_v1.2$  unter den Bedingungen von [64] charakterisiert. In [64] wurde u.a. die hier transifizierte Untereinheitenkomposition studiert.  $\text{Ba}^{2+}$  wurde statt  $\text{Ca}^{2+}$  als Ladungsträger eingesetzt,  $\text{K}^+$  war in der ICL ersetzt durch  $\text{Cs}^+$  und  $\text{Na}^+$  war in

der ECL ersetzt durch NMDG<sup>+</sup> (Lösungspaar 1, siehe Anhang A.4.4). Das Haltepotential war  $V_M = -80$  mV

Die Permeabilität von  $Ca_v1.2$  für  $Ba^{2+}$  ist etwa um Faktor 2.5 höher als für  $Ca^{2+}$  [50, 134]. Die Verwendung von  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger führte daher unabhängig von der Kanalexpression der Zellen zu erhöhten Ganzzellströmen. Außerdem fehlte  $Ca^{2+}$ -abhängige Inaktivierung.

Anschließend wurden zwei Bedingungen abgeändert, um später den Nachweis kapazitiver Kanalöffnung zu erleichtern: Erstens wurde NaCl anstatt durch NMDG<sup>+</sup> durch Glucose ersetzt, um den spezifischen Widerstand der Messlösung zu erhöhen. Zweitens wurde die Haltespannung mit  $V_M = -40$  mV nahe der Schwelle für Kanalöffnung gewählt, um die kapazitive Öffnung von  $Ca_v1.2$  zu erleichtern. L-Typ VDCCs sind dafür bekannt, unempfindlich gegenüber erhöhten Haltespannung zu sein. Bei Haltepotentialen bis zu  $-20$  mV ist noch die Hälfte der Kanäle für die Öffnung verfügbar [136].

Es wurde untersucht, inwieweit die spannungsabhängigen Charakteristika von  $Ca_v1.2$  unter diesen Bedingungen verändert waren und diskutiert, ob diese Veränderungen den Nachweis kapazitiver Öffnung von  $Ca_v1.2$  begünstigen könnten.

## EXPERIMENT 1: LITERATURBEDINGUNGEN

Abb. 4.1 A zeigt eine typische Gruppe von Strömen  $I_M$ , die bei eine Serie von Depolarisationspulsen im *Voltage Clamp*-Modus unter Literaturbedingungen gemessen wurden. Alle gemessenen Zellen ( $n = 6$ ) zeigten die beschriebenen Eigenschaften. Ausgehend von der Haltespannung  $V_M = -80$  mV wurde intrazellulär über die Patchpipette depolarisiert. Es wurden Spannungsstufen von 50 ms Dauer und um 10 mV zunehmender Stufenhöhe angelegt. Die Zelle wurde so auf Spannungen zwischen  $-60$  mV und 100 mV depolarisiert. Die Ionenströme wurden durch Subtraktion der Leckströme über ein P/4-Protokoll [3] korrigiert.

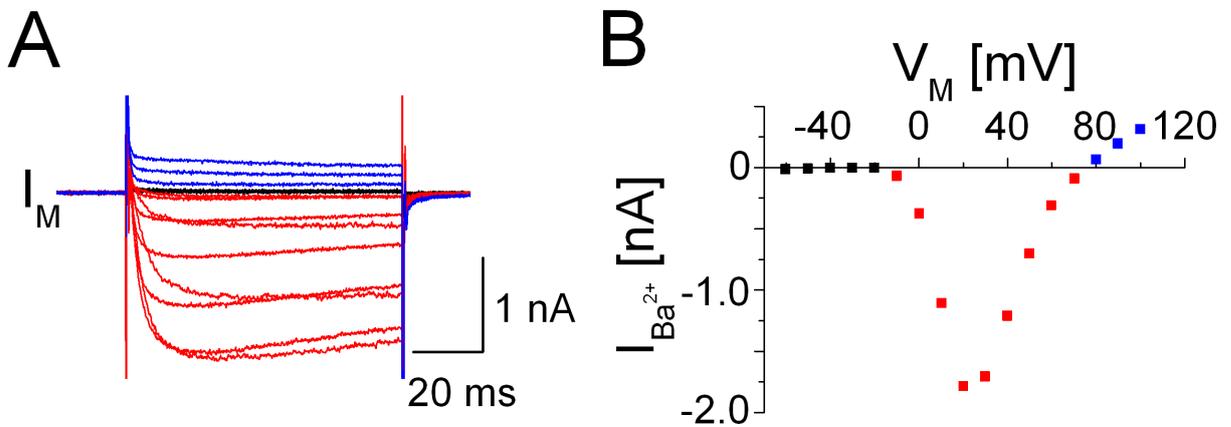
Depolarisationen von  $-60$  mV bis  $-20$  mV waren unterschwellig und hatten keine Kanalöffnung zur Folge (schwarz). Ab Depolarisationsspannungen von  $-10$  mV wurden Einwärtsströme gemessen (rot), die bei steigender Depolarisation zunahmen, dann bei 20 mV ein Minimum durchliefen und bei weiter steigenden Spannungen wieder abnahmen. Bei Spannungen von  $> 75$  mV wurde ein Auswärtsstrom gemessen (blau).

Die Ströme nach Repolarisation auf das Haltepotential (*tail currents*) nahmen bei steigenden Depolarisationsspannungen zu, blieben aber insgesamt sehr klein.

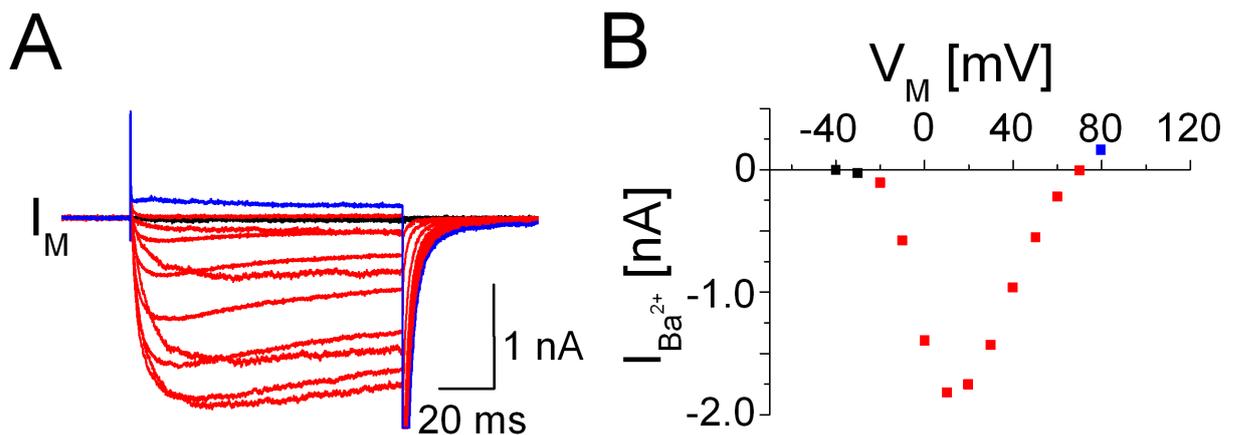
Die Stromextrema während der einzelnen Pulse wurden gegen die Depolarisationsspannung aufgetragen. Das Ergebniss war die Strom-Spannungs- (I/V-) Kennlinie von  $Ca_v1.2$  (Abb. 4.1 B). Die Farbkodierung für keine (schwarz), negative (rot) und positive (blau) Nettoströme wurde hier beibehalten. Die Kennlinie hat ihr Minimum bei  $-10$  mV und ihren Schnittpunkt mit der x-Achse bei einer Spannung von  $V_M = 75$  mV.

## EXPERIMENT 2: HOCHOHMIGE LÖSUNG

Abb. 4.2 zeigt eine typische Gruppe von Strömen  $I_M$ , die bei eine Serie von Depolarisationspulsen  $V_M$  im *Voltage Clamp*-Modus in hochohmiger Lösung gemessen wurden. Alle gemessenen Zellen ( $n = 5$ ) zeigten die beschriebenen Eigenschaften. Ausgehend von der Haltespannung  $V_M = -40$  mV wurden depolarisierende Spannungsstufen von 100 ms Dauer und um 10 mV zunehmender Stufenhöhe angelegt. Die Zelle wurde so auf Span-



**Abbildung 4.1:** Elektrophysiologie von  $Ca_v1.2$  unter Literaturbedingungen mit  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger. **A** Ganzzellstrom bei intrazellulärer Depolarisation. Ausgehend von der Haltespannung  $V_M = -80$  mV wurden Spannungsstufen von 50 ms Dauer und um 10 mV zunehmender Stufenhöhe angelegt. Die Zelle wurde so auf Spannungen zwischen  $-60$  mV und 100 mV depolarisiert. Schwarz: Unterschwellige Depolarisation, kein Strom. Rot: Überschwellige Depolarisation, Netto-Einstrom. Blau: Depolarisation über das Umkehrpotential für den Gesamtstrom, Netto-Ausstrom. **B** Strom-Spannungs-Kurve.



**Abbildung 4.2:** Elektrophysiologie von  $Ca_v1.2$  in hochohmiger Lösung mit  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger. **A** Ganzzellstrom bei intrazellulärer Depolarisation. Ausgehend von der Haltespannung  $V_M = -40$  mV wurden depolarisierende Spannungsstufen von 100 ms Dauer und um 10 mV zunehmender Stufenhöhe angelegt. Die Zelle wurde so auf Spannungen zwischen  $-40$  mV und 80 mV depolarisiert. Schwarz: Unterschwellige Depolarisation, kein Strom. Rot: Überschwellige Depolarisation, Netto-Einstrom. Blau: Depolarisation über das Umkehrpotential für den Gesamtstrom, Netto-Ausstrom. **B** Strom-Spannungs-Kurve.

nungen zwischen  $-40$  mV und  $80$  mV depolarisiert. Die Ionenströme wurden wieder durch Subtraktion der Leckströme über ein P/4-Protokoll korrigiert.

Bei  $-40$  mV waren die Kanäle geschlossen. Die Depolarisation auf  $-30$  mV war unter-schwellig und hatte keine Kanalöffnung zur Folge (schwarz). Ab Depolarisationsspannungen von  $-20$  mV wurden Einwärtsströme gemessen (rot), die bei steigender Depolarisation zunächst immer weiter zunahm, dann bei etwa  $10$  mV ein Minimum durchliefen und bei noch höheren Spannungen wieder abnahmen. Bei Spannungen von  $> 70$  mV wurde ein Auswärtsstrom gemessen.

Die Amplitude der *tail currents* nahm bei steigenden Depolarisationsspannungen zu. Insgesamt waren die *tail currents* größer und dauerten länger an, als unter Literaturbedingungen. Bei Depolarisation auf  $V_M = 80$  mV waren die Kanäle erst nach etwa  $50$  ms wieder geschlossen.

Die Stromminima während der einzelnen Pulse wurden wieder gegen die Depolarisationsspannung aufgetragen, um die I/V-Kennlinie von  $Ca_v1.2$  zu bilden (Abb. 4.2 B). Die Kennlinie hatte ihr Minimum bei  $-10$  mV und ihren Schnittpunkt mit der x-Achse bei  $V_M = 70$  mV.

## DISKUSSION

### Theorie

Der Zusammenhang zwischen der Ionenstromdichte  $i^i$  über die Membran, der spezifischen Leitfähigkeit  $g^i$  der Membran und der Transmembranspannung  $V_{TM}$  für eine Ionensorte kann über folgende Gleichung beschrieben werden, wenn die Membran nur für eine Ionensorte permeabel ist:

$$i^i = g^i(V_{TM} - V_0^i) \quad (4.1)$$

$V_0$  ist das Umkehrpotential für das Ion. Es ist gegeben durch das negative Nernst-Potential mit der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration ( $c_{in}^i$  bzw.  $c_{ex}^i$ ), der Faraday-Konstante  $F$ , der Gaskonstante  $R$  und der Temperatur  $T$ :

$$-V_0^i = \frac{RT}{z_e F} \ln \frac{c_{in}^i}{c_{ex}^i} \quad (4.2)$$

Nach Gleichung 4.1 kann der Ionenstrom also je nach Lage des Umkehrpotentials und anliegender Transmembranspannung entlang des Konzentrationsgradienten oder entgegengesetzt fließen.

### Experiment 1: Literaturbedingungen

Bei Depolarisation zu überschwelligem Spannungen  $\geq -10$  mV wurden die Kanäle aktiviert. Die Aktivierung wurde mit steigender Spannung schneller. Die Kanäle inaktivierten kaum.

Bei steigender Depolarisationsspannung wurden mehr Kanäle aktiviert, die Triebkraft für  $Ba^{2+}$  wurde jedoch kleiner, so dass der Ionen-Einstrom zunächst zunahm, dann aber ein Minimum durchlief und wieder abnahm. Ab  $V_M = 75$  mV wurde ein Netto-Auswärtsstrom gemessen.

Nach Gleichungen 4.1 und 4.2 war für die intrazelluläre und extrazelluläre  $Ba^{2+}$ -Konzentration  $c_{in} = 100$  nM und  $c_{ex} = 20$  mM ein Umkehrpotential von  $V_M = 163$  mV zu erwarten. Tatsächlich zeigte die Messung aber ein Umkehrpotential von  $V_M = 75$  mV.

Ursache hierfür war die Selektivität des Kanals: die Selektivität für  $Ba^{2+}$  gegenüber  $Cs^+$  liegt in der Größenordnung von 5000 [142], so dass im Spannungsbereich von  $-10$  mV bis  $50$  mV ausschließlich  $Ba^{2+}$  floss. Bei höheren Spannungen trug  $Cs^+$ -Strom zum Netto-Strom bei [142] und der  $Ba^{2+}$ -Influx wurde von einem  $Cs^+$ -Efflux überlagert. Zunächst hoben die beiden Ströme sich gegenseitig auf (kein Nettostrom), bei noch stärkeren Depolarisationen überwog der  $Cs^+$ -Strom, der Nettostrom wurde positiv, obwohl  $Ba^{2+}$  weiter einströmte.

Nach Repolarisation wurden nur sehr kleine *tail currents* gemessen. Die Kanäle deaktivierten bei der Haltespannung von  $-80$  mV innerhalb weniger Millisekunden. Die Triebkraft nach der Repolarisation war konstant und die Amplitude der *tail currents* nahm mit stärkerer Depolarisation immer weiter zu, da immer mehr Kanäle geöffnet wurden.

Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung der Kanäle, sowie Lage und Form der I/V-Kennlinie war in guter Übereinstimmung mit der Literatur [64, 105, 67].

### Experiment 2: Hochohmige Lösung

$Ca_v1.2$  zeigte in hochohmiger Messlösung sein typisches spannungsabhängiges Verhalten. Die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung, sowie die Form der I/V-Kennlinie waren mit den Literaturbedingungen vergleichbar. Der Schnittpunkt der I/V-Kennlinie mit der x-Achse lag bei  $70$  mV. Dies entsprach den Erwartungen, da die  $Ba^{2+}$ - und  $Cs^+$ -Konzentrationen in ECL bzw. ICL beibehalten worden waren.

Folgende Kanaleigenschaften waren hingegen verändert:

1. Die Schwelle für Kanalöffnung war leicht in hyperpolarisierende Richtung verschoben, ein kleiner Anteil der Kanäle öffnete schon bei  $-20$  mV.
2. Die Deaktivierung der Kanäle verlief bei dem Haltepotential von  $-40$  mV deutlich langsamer als bei  $-80$  mV. Abb. 4.2 A zeigt deutliche *tail currents* nach Repolarisation, die bei steigender Depolarisation größer wurden. Bei Depolarisationen  $> 10$  mV erreichten sie höhere Werte als der Strom während der Depolarisation, da kurz nach dem Depolarisationspuls die Kanäle noch offen waren und die Triebkraft hoch war.

Beide Punkte waren für den Nachweis der kapazitiven Stimulation günstig: durch die niedrigere Schwelle für Kanalöffnung würden geringere Depolarisationen ausreichen, um Kanalöffnung zu erreichen und durch die verstärkten *tail currents* würde die kapazitiven Öffnung von  $Ca_v1.2$  nach der Stimulationsrampe leichter nachzuweisen sein.

## 4.2 Kapazitive Öffnung von $Ca_v1.2$ in *Voltage Clamp*

Zunächst wurde das kapazitive Gating der  $Ca_v1.2$ -Kanäle mit  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger studiert. Die Leitfähigkeit des Kanals für  $Ba^{2+}$  ist im Vergleich zu  $Ca^{2+}$  um etwa Faktor 2.5 erhöht und es findet keine  $Ca^{2+}$ -abhängige Inaktivierung von  $Ca_v1.2$  statt [50, 134, 67]. Beides erleichtert den Nachweis der kapazitiven Kanalöffnung.

### 4.2.1 Kapazitive Gating-Kurve mit $Ba^{2+}$ als Ladungsträger

Der erste Nachweis kapazitiver Öffnung von  $Ca_v1.2$  wurde auf  $TiO_2$  Chips im *Voltage Clamp*-Modus durchgeführt. Durch eine fallende Spannungsrampe am Kondensator wird

eine negativer Spannungsabfall  $\Delta V_E$  im Badelektrolyt und ein negativer Spannungsabfall  $\Delta(V_J - V_E)$  im Spalt zwischen Zelle und Kondensator erzeugt (siehe Punkt 2).  $\Delta V_E$  depolarisiert die freie und  $\Delta V_J$  die adhärierte Membran.

Mit der Pipette kann der Strom über die Membran während eine solchen Stimulationsrampe gemessen werden. Wenn die Depolarisation Kanäle öffnet, so hat der gemessene Strom zwei Komponenten:

1. Kapazitive Ströme, die durch die Spannungsänderung am Chip und die passive Umladung der Zellmembran entstehen.
2. Ionenstrom durch  $Ca_v1.2$ .

Der Ionenstrom kann von den kapazitiven Effekten getrennt werden, indem eine Kontrollmessung aufgenommen wird: Nach dem eigentlichen Stimulationsexperiment wird die Stimulationsrampe unter Bedingungen appliziert, die keine Kanalöffnung zulassen. Diese Aufnahme der rein kapazitiven Ströme kann dann verwendet werden, um die Stimulationsmessung zu korrigieren. Die Subtraktion des Pipettenstroms aus der Kontrollmessung vom Strom der Stimulationsmessung liefert den Netto-Ionenstrom über die Membran [103].

Um die Kanalöffnung im Kontrollexperiment zu verhindern gibt es zwei Möglichkeiten:

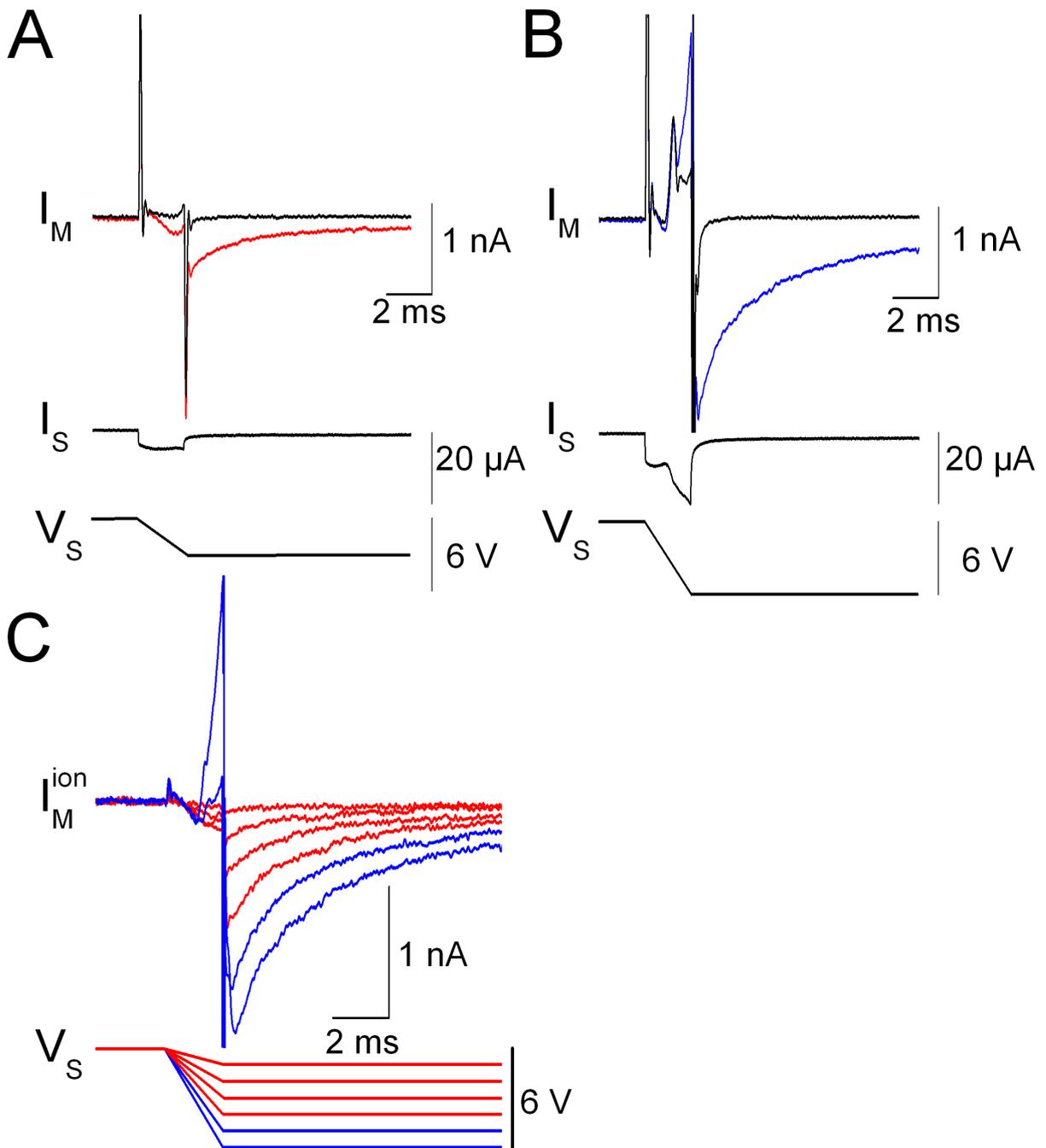
1. ein Kanalantagonist kann eingesetzt werden, um die Kanäle zu blocken oder
2. die Membranspannung kann auf stark negative Werte geklemmt werden, so dass die Schwelle für die Kanalöffnung nicht erreicht wird.

Die Änderung der Haltespannung ermöglicht einfach und schnell den Wechsel zwischen echtem Stimulationsexperiment und Kontrollmessung ohne das zeitraubende Ein- und Ausspülen eines Antagonisten. Daher wurden die Kontrollmessungen bei sehr niedrigen Haltespannungen von  $V_M = -160$  mV aufgenommen.

## EXPERIMENT

Eine  $Ca_v1.2$ -Zelle wurde auf dem Kondensator eines  $TiO_2$ -Stimulationschips kultiviert, mit einer Patchpipette kontaktiert und ihre Membranspannung konstant gehalten (Lösungspaar 2, siehe Anhang A.4.4). Es wurde bei  $V_M = -20$  mV Haltespannung (Stimulationsexperiment) und bei  $V_M = -160$  mV Haltespannung (Kontrollexperiment) gemessen.

Abb. 4.3 zeigt das Gating von  $Ca_v1.2$  bei kapazitiver Stimulation durch fallende Chiprampen. In Abb. 4.3 A ist der Ablauf eines Stimulationsexperiments (rot) und des dazugehörigen Kontrollexperiments (schwarz) dargestellt. Ausgehend von  $V_S = 6$  V wurde die Chipspannung in 2 ms auf  $V_S = 3$  V gefahren (Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -3$  V/2 ms). Die Spannungsrampe hatte den Strom  $I_S$  im Bad zur Folge.  $I_S$  wurde gemessen und ist in Abb. 4.3 A dargestellt.  $I_S$  war während der Rampe nahezu konstant. Der Pipettenstrom  $I_M$  wurde zuerst bei  $V_M = -20$  mV gemessen (Stimulationsexperiment,  $I_M^{stim}$ , rot) und anschließend bei  $V_M = -160$  mV (Kontrollexperiment,  $I_M^{con}$ , schwarz).  $I_M^{stim}$  (rot) und  $I_M^{con}$  (schwarz) zeigten die gleichen kapazitiven Transienten zu Beginn und am Ende der Rampe. Während der Rampe war  $I_M^{con}$  nahe Null,  $I_M^{stim}$  zeigte einen negativen Strom. Nach der Rampe war  $I_M^{con}$  gleich Null und  $I_M^{stim}$  zeigte einen negativen Strom, der mit einer Zeitkonstante von wenigen Millisekunden abnahm.



**Abbildung 4.3:** Extrazelluläres Gating von  $Ca_v1.2$  durch kapazitive Stimulation mit  $TiO_2$ -Chips und mit  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger. **A** Strom  $I_M$  über die Membran bei Stimulation mit einer Spannungsrampe  $\Delta V_S/\Delta t = -3\text{ V}/2\text{ ms}$  bei zwei verschiedenen Haltespannungen (Stimulationsexperiment:  $V_M = -20\text{ mV}$ , rot; Kontrolleexperiment:  $V_M = -160\text{ mV}$ , schwarz). Die Spannungsrampe hatte den Strom  $I_S$  im Bad zur Folge. **B** Strom  $I_M$  über die Membran bei Stimulation mit einer Spannungsrampe  $\Delta V_S/\Delta t = -6\text{ V}/2\text{ ms}$  bei zwei verschiedenen Haltespannungen (Stimulationsexperiment:  $V_M = -20\text{ mV}$ , blau; Kontrolleexperiment:  $V_M = -160\text{ mV}$ , schwarz). Die Spannungsrampe hatte den Strom  $I_S$  im Bad zur Folge. **C** Extrazelluläre Gatingkurve von  $Ca_v1.2$ . Aufgetragen ist der Netto-Ionenstrom  $I_M^{ion}$ . Ioneneinstrom während der Rampe ist in roter Farbe, Ionenausstrom während der Rampe in blauer Farbe dargestellt.

In Abb. 4.3 B wurde dieselbe Zelle mit doppelter Rampensteilheit stimuliert. Ausgehend von  $V_S = 6\text{ V}$  wurde die Chipspannung in 2 ms auf  $V_S = 0\text{ V}$  gefahren (Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -6\text{ V}/2\text{ ms}$ ) und  $I_S$  gemessen.  $I_S$  war während der Rampendauer nicht konstant. Der Pipettenstrom  $I_M$  wurde bei  $V_M = -20\text{ mV}$  (Stimulationsexperiment,  $I_M^{stim}$ , blau) und bei  $V_M = -160\text{ mV}$  (Kontrollexperiment,  $I_M^{con}$ , schwarz) gemessen. Kapazitiven Transienten zu Beginn und Ende der Rampe traten in  $I_M^{stim}$  (blau) und  $I_M^{con}$  (schwarz) auf. Weder  $I_M^{stim}$  noch  $I_M^{con}$  waren während der Rampe konstant.  $I_M^{stim}$  wich von  $I_M^{con}$  ab: nach einer geringen Abweichung nach unten während der ersten Hälfte der Rampe, zeigte sich während der zweiten Hälfte eine deutliche Abweichung nach oben. Nach der Rampe war  $I_M^{con}$  binnen 1 ms wieder auf Null, während  $I_M^{stim}$  einen negativen Strom zeigte, dessen Amplitude größer war als bei Stimulation mit der halben Rampensteilheit in Abb. 4.3 A. Die Zeitkonstante des Stromabfalls von  $I_M^{stim}$  nach der Rampe war gleich für beide Rampensteilheiten.

Für Abb. 4.3 C wurden analog zu den Messungen in Abb. 4.3 A und B je ein Stimulations- und ein Kontrollexperiment bei sechs verschiedenen Rampensteilheiten durchgeführt.  $I_M^{stim}$  wurde mit  $I_M^{con}$  korrigiert und der Netto-Ionenstrom über die Membran  $I_M^{ion} = I_M^{stim} - I_M^{con}$  wurde mit den zugehörigen Spannungsrampen  $V_S$  dargestellt. Während der Rampe führten die vier Rampensteilheiten  $\Delta V_S/\Delta t = -1\text{ V}/2\text{ ms}$ ,  $-2\text{ V}/2\text{ ms}$ ,  $-3\text{ V}/2\text{ ms}$  und  $-4\text{ V}/2\text{ ms}$  zu einem Netto-Einstrom (rot). Die Rampensteilheiten  $-5\text{ V}/2\text{ ms}$  und  $-6\text{ V}/2\text{ ms}$  zeigten in der ersten Hälfte der Rampe zunächst einen Netto-Einstrom, dann aber einen Netto-Ausstrom (blau). Nach der Rampe führte Stimulation mit allen Rampensteilheiten zu Netto-Ioneneinstrom, der mit steigender Rampensteilheit immer weiter zunahm. 20 ms nach der Rampe hatte der Netto-Ionenstrom in allen Fällen auf Null abgenommen (nicht gezeigt).

## DISKUSSION

### Kapazitive Ströme

Kapazitive Pipettenströme sind passive Reaktionen auf die Stimulation und treten ohne Beteiligung von Kanälen auf. Ihre Ursache ist stets ein nicht konstanter Strom  $I_S$ . Wann immer  $I_S$  sich ändert, führt dies zu einem kapazitiven Strom in der Pipette. Nach  $I_S = A_S c_S (\Delta V_S/\Delta t)$  ist  $I_S$  konstant, wenn Chipkapazität und Rampensteilheit konstant sind. Es gibt zwei Ursachen für kapazitive Signale:

1. Zu Beginn und am Ende einer jeden Rampe ändert sich die Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t$ . Die Folge sind schnelle kapazitive Transienten, die immer zu Beginn und Ende der Rampe auftreten (Abb. 4.3 A). Ihre Amplitude nimmt mit der Rampensteilheit zu, ihre Zeitkonstante bleibt unverändert. Die Amplituden der Transienten wurden in Abb. 4.3 A und B aus Platzgründen nicht voll abgebildet und wirken daher gleich groß.
2. Während der Rampe ist die Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t$  konstant. Die Spannungsabhängigkeit der Chipkapazität hat bei höheren Rampensteilheiten nicht konstantem Strom  $I_S$  zur Folge, der kapazitive Ströme in der Pipette erzeugt: Im Spannungsbereich zwischen 6 V und 3 V ist die Kapazität der TiO<sub>2</sub>-Chips weitgehend konstant, doch bei kleineren Spannungen zeigt die Kapazität eine starke Spannungsabhängigkeit (siehe Punkt 3.1.2). Daher war in Abb. 4.3 A  $I_S$  während der Rampe konstant. In Abb. 4.3 B spielt die Spannungsabhängigkeit der Kapazität eine Rolle. Daher

war  $I_S$  nicht konstant und während der Rampe wurde ein kapazitiver Strom über die Membran gemessen.

### Ionische Ströme

Ströme, die im Stimulationsexperiment auftreten, aber nicht im dazugehörigen Kontroll-experiment, sind Ionenströme über die Membran [103]. Subtraktion der Kontrollmessung vom Stimulationsexperiment lieferte den Netto-Ionenstrom (Abb. 4.3 C).

Als Ursache der transmembranen Ionenströme nach der Stimulation kommen grundsätzlich zwei Leitfähigkeiten in Frage:

1. Öffnung von  $Ca_v1.2$
2. Generierung von unspezifischen Poren durch Elektroporation

Wäre Elektroporation die Ursache für die Ionenströme, so müsste nach der Rampe ein mindestens über hunderte von Millisekunden anhaltender Strom über die Membran zu messen sein [99, 124]. Nach der typischen Kanal-Deaktivierung wurde aber kein Strom mehr gemessen. Daher kam Elektroporation als Mechanismus nicht in Frage.

Der tatsächliche Wert der kritischen Membranspannung  $V_{cr}$ , ab der Elektroporation eintritt ist umstritten. Für die meisten Zellmembranen wurde  $V_{cr} > 500$  mV bestimmt [41, 59, 120, 144, 121], es gibt allerdings auch Studien, die schon bei Transmembranspannungen ab 200 mV Elektroporation beobachten [117]. Solch niedrige Werte sind sonst nur für Vesikel aus künstlichen Lipidschichten beschrieben [118]. Eine Studie der Elektroporation durch kapazitive Stimulation ließ kritische Werte von  $V_{cr} \geq 500$  mV erwarten [124].

### Abschätzung der Spannungen in Bad und Spalt

Mit Hilfe der Gleichungen 2.2 und 2.4 lassen sich die Werte für  $V_E$  und  $V_J$  abschätzen. Die Abschätzungen und die daraus resultierenden Transmembranspannungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Parameter für die Abschätzung waren  $a_S = 0.25$  mm,  $\rho_E = 200$   $\Omega$  cm,  $A_J = 500$   $\mu\text{m}^2$  und  $d_J = 20$  nm. Die Spannungsabhängigkeit der Kapazität von  $\text{TiO}_2$ -Chips (siehe Abb. 3.2) wurde bei der Abschätzung berücksichtigt: für Rampensteilheiten bis  $-4$  V/2 ms wurde mit  $c_S = 1.5$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , für  $-5$  V/2 ms mit  $c_S = 2.5$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  und für  $-6$  V/2 ms mit  $c_S = 3$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  gerechnet. Die Transmembranspannungen der adhärenierten Membran  $V_{JM}$  und freien  $V_{FM}$  Membran sind während der Rampe  $V_{JM} = V_M - V_J$  bzw.  $V_{FM} = V_M - V_E$  (siehe Punkt 2).

Nach Gleichung 4.1 gilt  $i_{JM} = g_{JM}(V_M - V_J - V_0)$  für den Strom über die adhärenierte Membran und  $i_{FM} = g_{FM}(V_M - V_E - V_0)$  für den Strom über die freie Membran.  $V_0$  ist hier die Umkehrspannung für den Strom über die Membran ( $\approx 70$  mV, siehe Punkt 4.1). Aus den Transmembranspannungen lässt sich so abschätzen, ob ein Ioneneinstrom ( $< 0$ ) oder ein Ionenausstrom ( $> 0$ ) über die jeweilige Membrandomäne zu erwarten war. Die letzte Spalte in Tabelle 4.1 gibt Auskunft darüber, ob der gemessene Gesamtstrom  $I_M^{Netto}$  kurz vor Ende der Rampe negativ oder positiv war.

Nach der Abschätzung war die schwache Depolarisation der freien Membran bei allen Spannungsrampen ausreichend, um Kanäle zu öffnen. Die Depolarisation blieb dabei stets unterhalb des Umkehrpotentials, der Ionenstrom durch die freie Membran war stets  $< 0$ . Die adhärenierte Membran war höheren Depolarisationen ausgesetzt. Ab einer Rampensteilheit von  $-5$  V/2 ms galt  $V_{JM} > V_0$ , so dass ein Netto-Ionenausstrom über die adhärenierte Membran zu erwarten war.

$\Delta V_S/\Delta t$	$V_E$ [mV]	$V_{FM}$ [mV]	$I_{FM}$	$V_J$ [mV]	$V_{JM}$ [mV]	$I_{JM}$	Messung: $I_M^{Netto}$
-1 V/2 ms	-4	-16	< 0	-19	-1	< 0	< 0
-2 V/2 ms	-8	-12	< 0	-38	+18	< 0	< 0
-3 V/2 ms	-11	-9	< 0	-56	+36	< 0	< 0
-4 V/2 ms	-15	-5	< 0	-75	+55	< 0	< 0
-5 V/2 ms	-25	+5	< 0	-155	+135	> 0	> 0
-6 V/2 ms	-45	+25	< 0	-224	+204	> 0	> 0

**Tabelle 4.1:** Abschätzung der Spannungen in Spalt ( $V_J$ ) und Bad ( $V_E$ ), der Transmembranspannungen von adhärirter ( $V_{JM}$ ) und freier ( $V_{FM}$ ) Membran und der Richtung der resultierenden Ionenströme  $I_{JM}$  und  $I_{FM}$  über die jeweiligen Membrandomänen (Ionen-Einstrom:  $I < 0$ , Ionen-Ausstrom:  $I > 0$ ) für die verschiedenen Rampensteilheiten  $\Delta V_S/\Delta t$ . Die Richtung des gemessenen Gesamtstromes  $I_M^{Netto}$  ist der letzten Spalte angezeigt. Die Abschätzungen erfolgten mit Hilfe der Gleichungen 2.2, 2.4,  $V_{JM} = V_M - V_J$  und  $V_{FM} = V_M - V_E$ . Die Parameter waren  $a_S = 0.25$  mm,  $\rho_E = 200$   $\Omega$  cm,  $A_J = 500$   $\mu\text{m}^2$  und  $d_J = 20$  nm. Für Rampensteilheiten bis  $-4$  V/2 ms wurde mit  $c_S = 1.5$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , für  $-5$  V/2 ms mit  $c_S = 2.5$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  und für  $-6$  V/2 ms mit  $c_S = 3$   $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  gerechnet.

Die Messung zeigte ab  $-5$  V/2 ms einen Netto-Ionenausstrom. Der Netto-Ionenausstrom über die adhärirte Membran überwog also den Netto-Ioneneinstrom durch die freie Membran. Die adhärirte Membran trug stärker zum Signal bei als die freie Membran, da sie deutlich stärker depolarisiert wurde.

Bei den Rampensteilheiten  $-5$  V/2 ms und  $-6$  V/2 ms sagt die Abschätzung einen Ionenausstrom durch die adhärirte Membran voraus. Abb. 4.4 C zeigt dass erst während der zweiten Hälfte der Rampe ein Ausstrom gemessen wurde. Während der ersten Hälfte der Rampe trat zunächst ein Einstrom auf. Die Ursache hierfür war die Spannungsabhängigkeit der Chipkapazität: Nach Abb. 3.2 ist die Chipkapazität bei Spannungen zwischen 6 V und 3 V nur etwa halb so groß, wie bei Spannungen im Bereich zwischen 3 V und 0 V. Die oben abgeschätzten Werte wurden daher erst in der zweiten Hälfte der Rampe erreicht.

Nach der Rampe war die Triebkraft für Ba<sup>2+</sup> konstant. Die Amplitude der *tail currents* nahm mit der Rampensteilheit zu, da die Leitfähigkeit für Ba<sup>2+</sup> bei steigender Depolarisation während der Rampe zunahm.

## 4.2.2 Kapazitive Kanalöffnung mit Ca<sup>2+</sup> als Ladungsträger

Der Einsatz von Ca<sup>2+</sup> als Ladungsträger hat geringere Ganzzellströme und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Inaktivierung zur Folge. Mit Ca<sup>2+</sup> als Ladungsträger wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt:

1. Die spannungsabhängigen Kanaleigenschaften mit Ladungsträger Ca<sup>2+</sup> wurden im ersten Experiment zunächst bei intrazellulärer Stimulation untersucht. Danach wurde geprüft, ob die kapazitive Kanalöffnung auf TiO<sub>2</sub>-Chips auch mit Ca<sup>2+</sup> nachweisbar war. Die Experimente fanden mit Cs<sup>+</sup> in ICL und ECL statt (Lösungspaar 3, siehe Anhang A.4.4). Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung war nur nach der Rampe während der *tail currents* messbar.
2. Im zweiten Experiment wurde versucht, den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom während der *tail currents* nach kapazitiver Kanalöffnung mit gentechnischen und pharmakologischen

Mitteln zu verstärken. Außerdem wurden die Messbedingungen im Hinblick auf die nachfolgenden fluoreszenzoptischen Messungen verändert (s.u.) und die Haltespannung herabgesetzt.

Kürzung der  $\alpha_{1C}$  Einheit um 147 Aminosäuren am C-terminalen Ende (also um 441 Basenpaare direkt vor dem Stop-Codon) führt zu erhöhten Ganzzellströmen [31]. Für das zweite Experiment wurde eine solche verkürzte Version der porenbildenden Untereinheit ( $\alpha_{1C}trunc$ , siehe Punkt 3.2.2) eingesetzt, um den Strom zu vergrößern.

Außerdem wurde der spezifische L-Typ VDCC-Agonist FPL64176 (FPL) eingesetzt [76, 65]. Er verstärkt den Ganzzellstrom und verlangsamt die Deaktivierung der Kanäle wesentlich, deutlich größere *tail currents* sind die Folge. Außerdem verschiebt er die Schwelle für Kanalöffnung in hyperpolarisierende Richtung und erleichtert so die kapazitive Öffnung. Allerdings hat FPL auch eine nachteilige Wirkung: die Aktivierung der Kanäle ist deutlich verlangsamt, so dass während der kurzen Stimulationsrampe weniger Kanäle öffnen. Daher musste überprüft werden, ob die positiven Effekte die negativen überwogen.

Über den Einsatz von FPL sollte außerdem ein weiterer störender Effekt kompensiert werden: Während der *whole cell* Messungen nahmen die  $Ca^{2+}$ -Ströme deutlich ab. Ursache war der typische *rundown* von L-Typ VDCCs [54]. Diese Situation würde sich bei den fluoreszenzoptischen Aufnahmen noch verschärfen, da vor Beginn der Aufnahme die Zelle mit Fura-2 über die Pipette beladen werden musste. Das Zytosol würde also bereits ausgewaschen sein, wenn die Messung startete. ATP konnte nicht eingesetzt werden, da ATP  $Ca^{2+}$  bindet und für die geplanten simultanen *Patch Clamp*- und Fluoreszenzmessungen jeder weitere exogene Puffer außer Fura-2 vermieden werden sollte. Daher sollte diesem Problem mit dem Einsatz von FPL entgegengewirkt werden.

Im zweiten Experiment lag das Augenmerk auf den *tail currents* nach der Rampe. Hier war  $I_S$  gleich Null, so dass keine kapazitiven Ströme störten. Daher wurde auf Kontrollmessungen bei stark negativem Haltepotential verzichtet. Um nachzuweisen, dass es sich bei den gemessenen Ionenströmen um  $Ca^{2+}$ -Strom über  $Ca_v1.2$  handelte, wurde der L-Typ VDCC-Blocker Nifedipine (NIF) eingesetzt.

Außerdem wurden im zweiten Experiment  $HfO_2$ -Chips verwendet, da nur sie später den Einsatz von UV-Licht zur Fluoreszenzanregung des Farbstoffes ohne photoelektrische Folgeprozesse ermöglichten (siehe Punkt 3.1.3). Um die kleinere Chipkapazität zu kompensieren, wurde mit etwas steileren Rampen stimuliert.

Vorbereitend für die Fluoreszenzmessungen mussten ECL und ICL  $Cs^+$ -frei sein, da  $Ca^{2+}$  der einzige Ladungsträger für den  $Ca_v1.2$ -Strom sein musste. Daher kam für das zweite Experiment Lösungspaar 4 mit ICL 4a zum Einsatz (siehe Anhang A.4.4). Der spezifische Widerstand der ECL war mit  $\rho_E = 260 \Omega \text{ cm}$  um Faktor 1.3 höher als im ersten Experiment.

## EXPERIMENT 1: INTRAZELLULÄRE UND KAPAZITIVE KANALÖFFNUNG ( $TiO_2$ -CHIP, $Cs^+$ IN ICL UND ECL)

Eine  $Ca_v1.2$ -Zelle wurde auf einem  $TiO_2$ -Kondensator kultiviert, mit einer Patchpipette kontaktiert und im *Voltage Clamp*-Modus auf konstantem intrazellulären Potential gehalten. Die verwendete ECL 3 enthielt statt  $BaCl_2$  nun  $CaCl_2$  in hoher Konzentration (siehe Anhang A.4.4), alle anderen Messbedingungen waren wie in Punkt 4.2.1.

Abb. 4.4 A zeigt die intrazelluläre Stimulation der Zelle.  $I_M$  wurde bei einer Serie von Depolarisationspulsen  $V_M$  gemessen und über ein P/4-Protokoll korrigiert. Ausgehend von der Haltespannung  $V_M = -40$  mV wurden depolarisierende Spannungsstufen von 100 ms Dauer und um 10 mV zunehmender Stufenhöhe angelegt. Die Zelle wurde so auf Spannungen zwischen  $-40$  mV und 80 mV depolarisiert.

Die Extrema während der einzelnen Depolarisationspulse wurden gegen die Depolarisationsspannung aufgetragen. Abb. 4.4 B zeigt die I/V-Kennlinie von  $Ca_v1.2$ . Das Minimum der Kennlinie lag bei 10 mV, der Schnittpunkt mit der x-Achse bei  $-75$  mV.

Anschließend wurde mit Rampen verschiedener Steilheiten stimuliert, jeweils ausgehend von  $V_S = 6$  V ( $\Delta V/\Delta t = -1$  V/2 ms,  $-2$  V/2 ms,  $-3$  V/2 ms,  $-4$  V/2 ms,  $-5$  V/2 ms und  $-6$  V/2 ms). In Abb. 4.4 C ist der Netto-Ionenstrom  $I_M^{ion}$  und die die Chiprampen  $V_S$  gezeigt.  $I_M^{ion}$  wurde wie unter Punkt 4.2.1 erklärt ermittelt:  $I_M^{ion} = I_M^{stim} - I_M^{con}$  ( $I_M^{stim}$  ist die Messgröße im Stimulationsexperiment bei Haltepotential  $V_M = -20$  mV,  $I_M^{con}$  ist die Messgröße im Kontrollexperiment bei Haltepotential  $V_M = -160$  mV).

Während der Rampe war bei keiner Rampensteilheit ein Netto-Ionenstrom zu messen. Nach der Rampe zeigte der Netto-Ionenstrom einen mit steigender Rampensteilheit zunehmenden *tail current*.

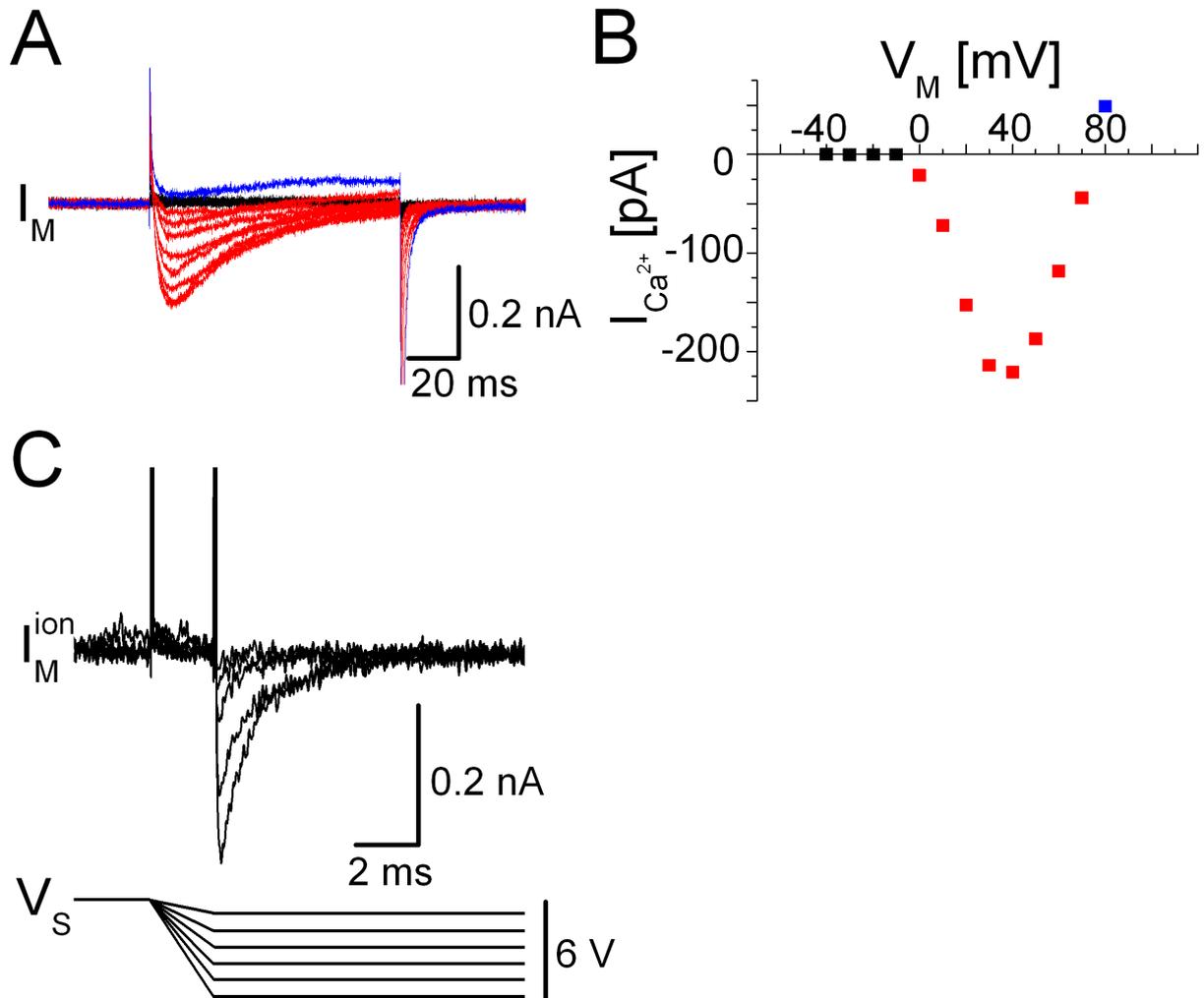
## EXPERIMENT 2: FPL UND NIF BEI INTRAZELLULÄRER UND KAPAZITIVER KANALÖFFNUNG (HfO<sub>2</sub>-CHIP, Cs<sup>+</sup>-FREIE LÖSUNGEN)

Eine Zelle, die die porenformende Untereinheit  $\alpha_{1C}trunc$  und die beiden Hilfsuntereinheiten  $\beta_{2a}$  und  $\alpha_2\delta_1$  exprimiert, wurde auf einem HfO<sub>2</sub>-Chip kultiviert und mit einer Patchpipette kontaktiert.

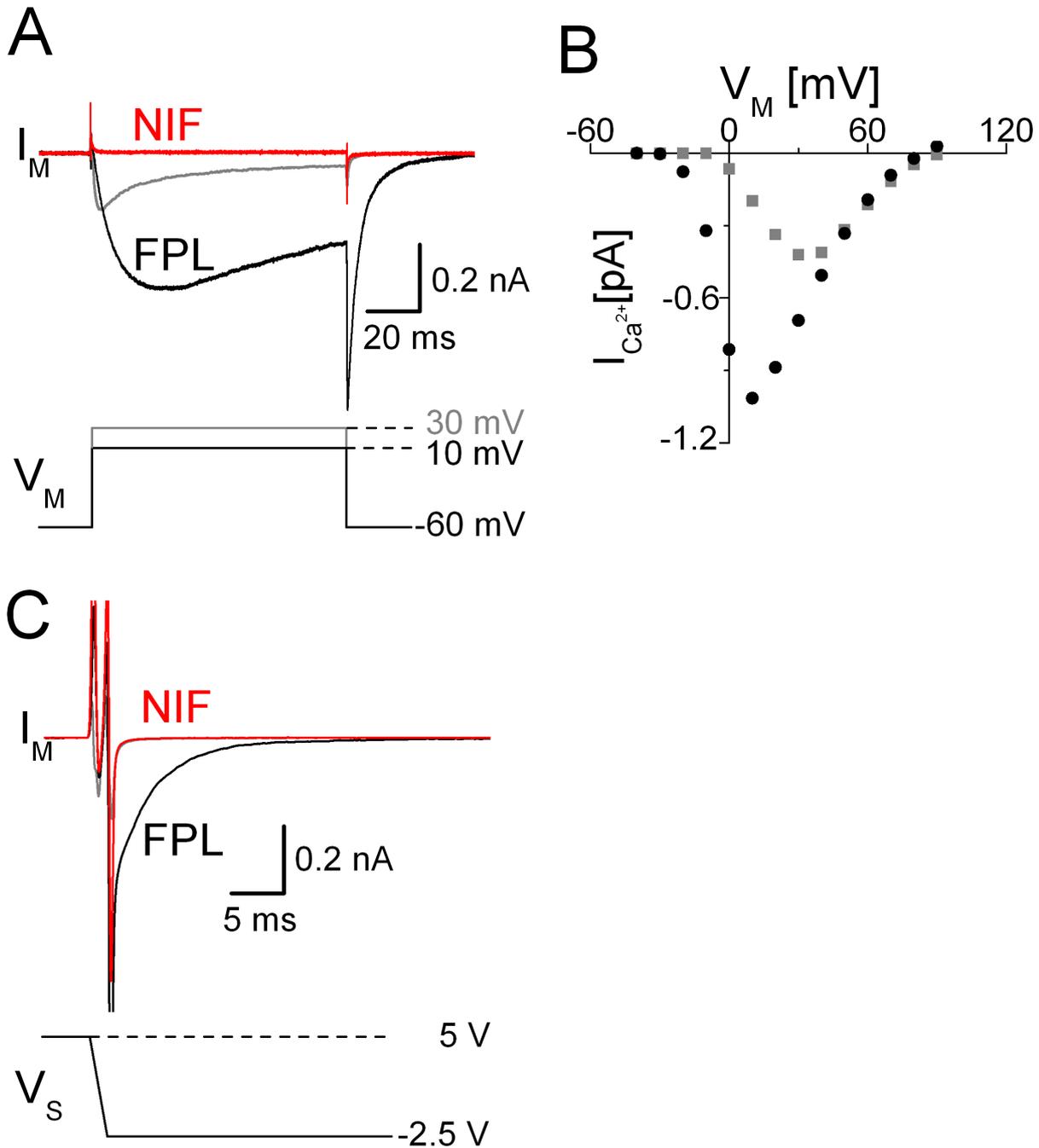
Im *Voltage Clamp*-Modus wurde sie zunächst intrazellulär depolarisiert und  $I_M$  aufgezeichnet, um den Effekt von FPL und NIF auf den Ganzzellstrom der Zelle zu testen (siehe Abb. 4.5 A). Vor Zugabe von FPL war das Stromminimum  $-421$  pA. Zugabe von FPL ( $2 \mu\text{M}$ , schwarze Kurve) sorgte für eine drastische Erhöhung des Ganzzellstroms auf  $-1015$  pA. Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung des Stroms waren verlangsamt. Nach Zugabe von NIF ( $10 \mu\text{M}$ , rote Kurve) waren die Ströme verschwunden.

Abb. 4.5 B zeigt die I/V-Kennlinien vor und nach Zugabe von FPL. Ohne FPL lag die Schwelle für Kanalöffnung bei  $V_M = 0$  mV, das Stromminimum lag bei  $V_M = 30$  mV. FPL verschob die Schwelle zur Kanalöffnung, sowie die Lage des Stromminimums in hyperpolarisierende Richtung zu  $V_M = -20$  mV bzw.  $V_M = 10$  mV.

Dieselbe Zelle wurde neben der intrazellulären Depolarisation auch kapazitiv jeweils vor und nach Zugabe von FPL bzw. NIT stimuliert. Die Messung ist in Abb. 4.5 C gezeigt. Bei einem Haltepotential von  $V_M = -60$  mV erfolgte die Stimulation mit einer fallenden Rampe der Steilheit  $-7.5$  V/1.5 ms. Chip Spannung  $V_S$  und Membranstrom  $I_M$  vor, während und nach der Rampe ohne FPL (grau), mit FPL (schwarz) und nach anschließender Zugabe von NIF (rot) sind dargestellt. Ohne Einsatz eines Kanalgiftes war der *tail current* nach der Rampe verschwindend klein. Nach Zugabe von FPL wurde ein deutlicher *tail current* gemessen, der nach zusätzlicher Zugabe von NIF verschwand.



**Abbildung 4.4:** Intrazelluläres und extrazelluläres Gating von  $Ca_v1.2$  mit  $Ca^{2+}$  als Ladungsträger. **A** Ganzzellstrom  $I_M$  bei intrazellulärer Depolarisation. Ausgehend von der Haltespannung  $V_M = -40$  mV wurden depolarisierende Spannungsstufen von 100 ms Dauer und um 10 mV zunehmender Stufenhöhe angelegt. Die Zelle wurde so auf Spannungen zwischen  $-40$  mV und 80 mV depolarisiert. Schwarz: Unterschwellige Depolarisation, kein Strom. Rot: Überschwellige Depolarisation, Netto-Einstrom. Blau: Depolarisation über das Umkehrpotential für den Gesamtstrom, Netto-Ausstrom. **B** Strom-Spannungs-Kurve bei intrazellulärer Stimulation. **C** Extrazelluläres Gating von  $Ca_v1.2$  durch kapazitive Stimulation mit  $TiO_2$ -Chip und  $Ca^{2+}$  als Ladungsträger. Aufgetragen ist der Netto-Ionenstrom  $I_M^{ion}$  und die Chipspannung  $V_S$ .



**Abbildung 4.5:** Wirkung von FPL und NIF auf  $Ca^{2+}$ -Strom durch  $Ca_v1.2$  bei intrazellulärer und kapazitiver Stimulation. **A** Ganzzellströme  $I_M$  bei intrazellulärer Depolarisation mit dem gezeigten Spannungsprotokoll  $V_M$ . Vor Zugabe von FPL wurde auf  $V_M = 30$  mV depolarisiert, danach auf  $V_M = 10$  mV. Grau: Strom durch  $Ca^{2+}$ -Strom durch  $Ca_v1.2$ . Schwarz:  $Ca^{2+}$ -Strom nach Zugabe von FPL ( $2 \mu M$ ). Rot:  $Ca^{2+}$ -Strom nach Zugabe von NIF ( $10 \mu M$ ). **B** Strom-Spannungskurve vor (grau) und nach (schwarz) Zugaben von NIF. **C** Kapazitive Aktivierung von  $Ca_v1.2$  mit  $Ca^{2+}$  als Ladungsträger auf  $HfO_2$ -Chips. Die Rampensteilheit war  $-7.5$  V/1.5 ms. Chipspannung  $V_S$  und Membranstrom  $I_M$  vor, während und nach der Rampe ohne FPL (grau), mit FPL (schwarz) und nach anschließender Zugabe von NIF (rot) sind dargestellt.

## DISKUSSION

### Experiment 1: Intrazelluläre und kapazitive Kanalöffnung (TiO<sub>2</sub>-Chip, Cs<sup>+</sup> in ICL und ECL)

Die Zellen zeigten einen typischen Ca<sup>2+</sup>-Strom mit mehreren wichtigen Unterschieden zum Ba<sup>2+</sup>-Strom:

1. Der Ganzzellstrom der Zellen war typischerweise um mehr als Faktor 2 geringer.
2. Ca<sup>2+</sup>-abhängige Inaktivierung der Kanäle fand trotz der starken Ca<sup>2+</sup>-Pufferung der ICL (siehe Anhang A.4.4) statt.
3. Die *tail currents* waren wegen der geringen Ganzzellströme und Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Inaktivierung klein.
4. Die Schwelle für Kanalöffnung und das Minimum der I/V-Kurve waren beim Ca<sup>2+</sup>-Strom um etwa 10 mV zu höheren Spannungen verschoben.

Der Nachweis der kapazitiven Kanalöffnung war unter Verwendung von Ca<sup>2+</sup> als Ladungsträger daher erschwert.

Bei kapazitiver Stimulation waren für die einzelnen Rampensteilheiten ähnliche Spannungen in Bad und Spalt zu erwarten wie in Tabelle 4.1 angegeben, da der spezifische Widerstand der ECL mit Ca<sup>2+</sup> gleich der mit Ba<sup>2+</sup> war.

Die *tail currents* nach Beendigung der Rampe zeigten die Kanalöffnung (Abb. 4.4). Die Ladungsmenge, die einströmte, war allerdings viel geringer als noch mit Ba<sup>2+</sup>. Bei allen sechs Rampensteilheiten war der Strom während der Rampe unter der Nachweisgrenze. Ioneneinstrom fand nur in geringem Maße und nur nach der Rampe während der *tail currents* statt. Ein Schwerpunkt der folgenden Arbeit musste also auf der Verstärkung der *tail currents* liegen.

### Experiment 2: FPL und NIF bei intrazellulärer und kapazitiver Kanalöffnung (HfO<sub>2</sub>-Chip, Cs<sup>+</sup>-freie Lösungen)

Das intrazelluläre Depolarisationsprotokoll bestätigte den in der Literatur beschriebenen Effekt von FPL und NIF auf L-Typ VDCCs [76, 65]. FPL verschob die Schwelle für Kanalöffnung, sowie die Lage des Stromminimums in hyperpolarisierende Richtung und verstärkte den Strom stark. Aktivierung, Deaktivierung und Inaktivierung waren mit FPL verlangsamt.

Die extrazelluläre Stimulation erfolgte hier ausgehend vom Haltepotential  $-60$  mV. Sie hatte ohne FPL keinen sichtbaren *tail current* zur Folge, der Einsatz von  $\alpha_1C_{trunc}$  war also nicht zielführend.

Der Einsatz von FPL zeigte sich allerdings als besonders effektiv: Nach Zugabe von FPL führte die Rampe zu einem deutlichen *tail current*. Das Integral über den *tail current* lieferte die eingeströmte Ladungsmenge  $\Delta Q = I_{Ca^{2+}} dt = -5.1$  pC. Bei der intrazellulären Stimulation mit FPL war das Integral des *tail currents*  $-11$  pC. Die Spannungsrampe öffnete trotz ihrer kurzen Dauer einen wesentlichen Anteil der Kanäle. Ursache dafür war die starke Depolarisation der adhärierten Membran:

Für eine typische HEK-Zelle ( $A_J = 500 \mu\text{m}^2$ ,  $d_J = 20$  nm) auf einem HfO<sub>2</sub>-Chip ( $c_S = 1.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $a_s = 0.05$  cm) in ECL 4 ( $\rho_E = 260 \Omega \text{ cm}$ , siehe Anhang A.4.4) generiert

eine Spannungsrampe  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ V}/1.5 \text{ ms}$  nach Gleichung 2.2  $V_E = -78 \text{ mV}$  und nach Gleichung 2.4  $V_J = -233 \text{ mV}$ . Bei einem Haltepotential von  $V_M = -60 \text{ mV}$  führt das zu den Transmembranspannungen  $V_{FM} = -18 \text{ mV}$  bzw.  $V_{JM} = 173 \text{ mV}$  für die freie, bzw. die adhärrierte Membran.

Die Depolarisation der freien Membran war vergleichbar mit der in Anwesenheit von FPL angelegten intrazellulären Depolarisation (siehe Abb. 4.5 A). Bei der sehr kurzen Rampendauer öffnen hier aufgrund der langsamen Aktivierung in Anwesenheit von FPL kaum Kanäle. Die sehr starke Depolarisation der adhärrierten Membran hat eine beschleunigte Aktivierung zur Folge, so dass der kurze Stimulus der Rampe hier zu deutlicher Kanalaktivierung führt.

Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass die Deaktivierung nach intra- und extrazellulärer Stimulation nicht derselben exponentialen Kinetik folgte. Die Ursache hierfür war nicht klar. Trotz der relativ hohen eingesetzten Rampensteilheit konnte die Ursache dafür nicht eine Beteiligung unselektiver Poren als Folge von Elektroporation sein, da der Strom nach Zugabe von NIF vollständig verschwand.

### 4.3 Kapazitive Öffnung von $Ca_v1.2$ in *Current Clamp*

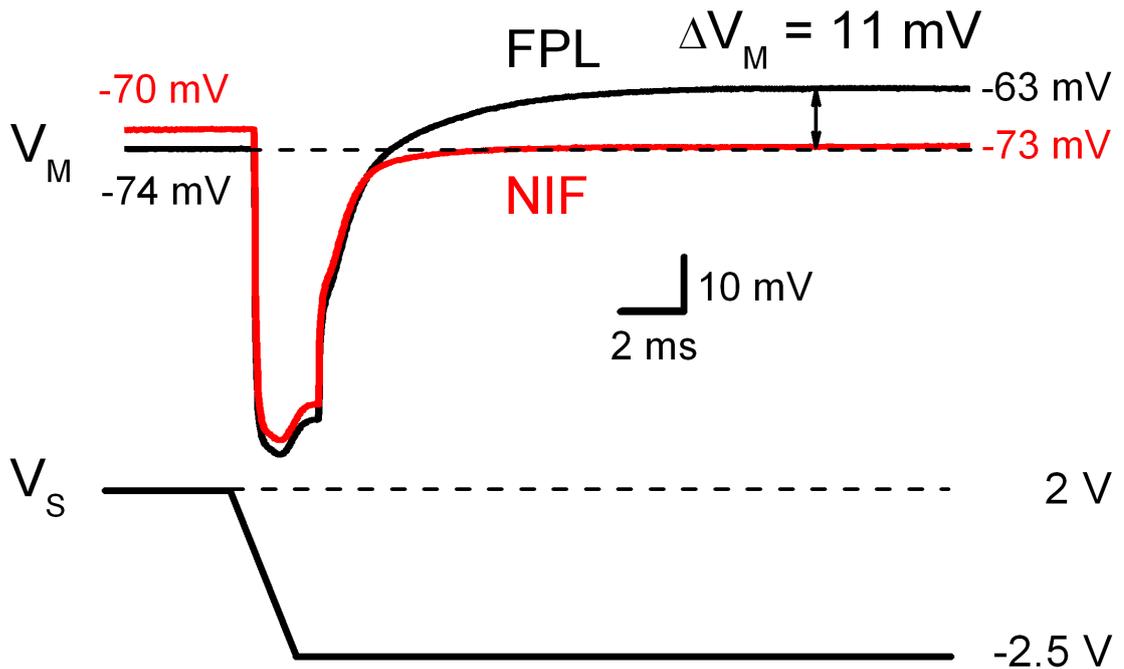
Der *Voltage Clamp*-Messmodus spiegelt nicht die reale Situation einer intakten Zelle wieder (siehe Punkt 2): Bei geklemmtem Membranpotential werden beide Membrandomänen depolarisiert.  $V_E$  (siehe Gleichung 2.2) wirkt auf die freie,  $V_J$  (siehe Gleichung 2.4) auf die adhärrierte Membran und beide Domänen können prinzipiell zum Ionenstrom beitragen.

Bei einer nicht spannungsgeklemmten Zelle wird nur die adhärrierte Membran depolarisiert und nur sie trägt zum Ionenstrom bei. Abhängig von der Geometrie der Zelle wirkt ein Bruchteil des Spannungsabfalls ( $V_J - V_E$ ) auf die adhärrierte Membran. Das ist weit weniger als bei derselben Zelle in *Voltage Clamp*. Es ist daher schwieriger, in nicht spannungsgeklemmten Zellen kapazitive Kanalöffnung zu erreichen.

Im *Current Clamp*-Modus wurde die Situation einer intakten Zelle nachgestellt, indem der injizierte Pipettenstrom gleich Null gehalten wurde. Unter diesen Bedingungen wurde die Wirkung kapazitiver Stimulation auf das intrazelluläre Membranpotential beobachtet. In Experiment 1 wurde mit einer einzelnen Spannungsrampe kapazitiv stimuliert, im zweiten Experiment wurde dieselbe Zelle repetitiv mit fünf Rampen stimuliert. Kanalöffnung wurde erkennbar, wenn das eingeströmte  $Ca^{2+}$  das intrazelluläre Potential anhub.

#### EXPERIMENT 1

Eine  $Ca_v1.2$ -Zelle wurde auf einem  $HfO_2$ -Chip kultiviert. Abb. 4.6 zeigt den Effekt einer Spannungsrampe der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -4.5 \text{ V}/2 \text{ ms}$  auf die intrazelluläre Spannung  $V_M$  ausgehend von einem Membranpotential von  $V_M = -74 \text{ mV}$  mit FPL und  $V_M = -74 \text{ mV}$  nach Zugabe von NIF. Erst wurde in Anwesenheit von FPL (schwarze Kurve) stimuliert, anschließend nach Zugabe von NIF (rote Kurve). Während der Rampe fiel die intrazelluläre Spannung ohne und mit NIF um  $\Delta V_M = -57 \text{ mV}$  ab. Nach der Rampe wurde das intrazelluläre Potential mit FPL um  $\Delta V_M = 11 \text{ mV}$  angehoben, während nach Zugabe von NIF kein Anstieg der intrazellulären Spannung mehr beobachtet wurde.



**Abbildung 4.6:** Kapazitive Aktivierung von  $Ca_v1.2$  in *Current Clamp*. Reaktion der intrazellulären Spannung  $V_M$  auf eine Spannungsrampe der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -4.5$  V/2 ms mit FPL (schwarz) und mit NIF (rot).

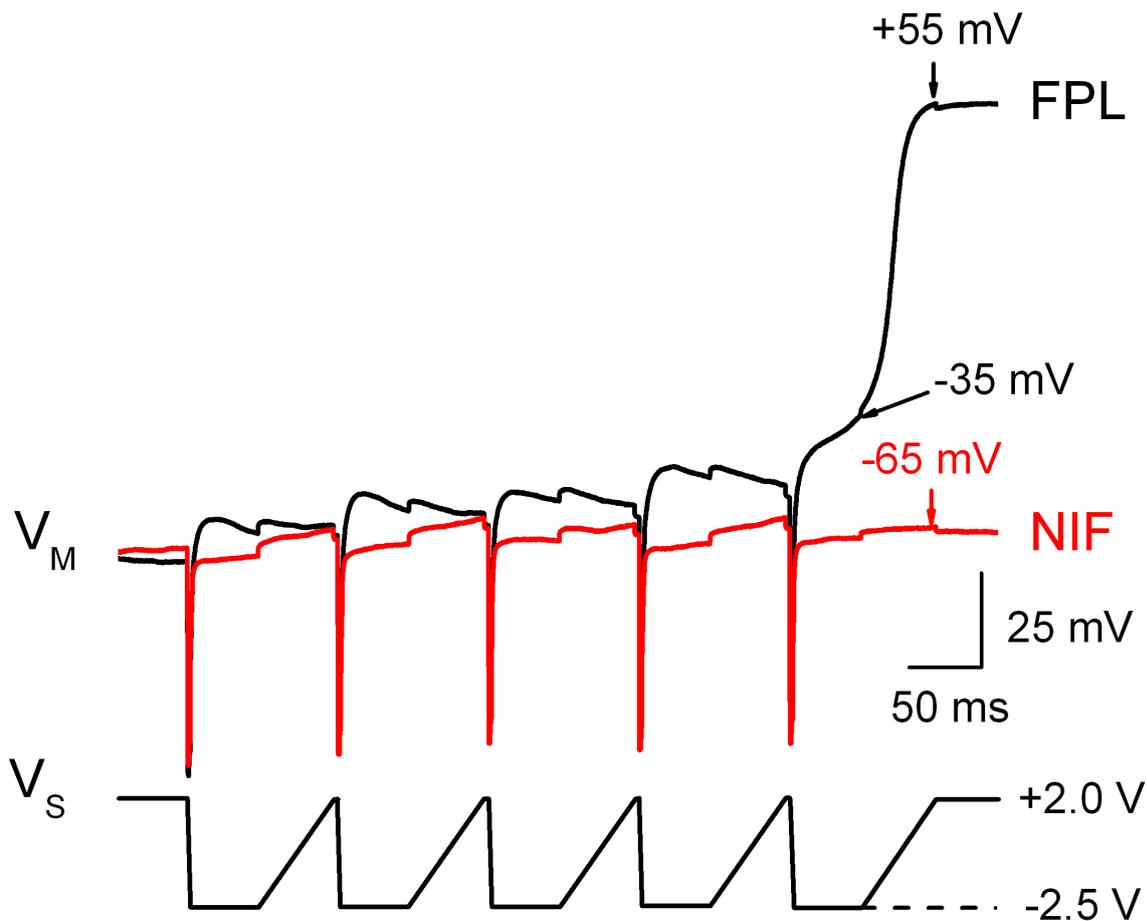
## EXPERIMENT 2

Abb. 4.7 zeigt den Effekt von fünf Spannungsrampen auf die intrazelluläre Spannung  $V_M$  der Zelle aus Experiment 1, ausgehend von einem Membranpotential von  $V_M = -74$  mV in Anwesenheit von FPL (schwarze Kurve) und  $V_M = -70$  mV nach Zugabe von NIF (rote Kurve). Eine Rampe erfolgte alle 100 ms und die Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -4.5$  V/2 ms. Während der fallenden Rampen wurde  $\Delta V_M = -57$  mV gemessen. Während der langsam steigenden Rampen zur Rückstellung der Chipspannung wurde  $\Delta V_M = 2$  mV gemessen. Die Werte waren mit FPL und mit NIF jeweils gleich. Nach jeder Rampe zeigte sich mit FPL eine Depolarisation von etwa  $\Delta V_M = 10$  mV, die teilweise relaxierte, bis die nächste Stimulationsrampe erfolgte. Dieser Effekt wurde durch NIF unterdrückt. Die nach 100 ms verbleibenden Spannungsänderungen akkumulierten und nach der fünften Rampe wurde eine plötzliche, starke Depolarisation gemessen.

## DISKUSSION

### Experiment 1: Einfache Stimulation in *Current Clamp*

Die Pipette detektierte während der Rampen einen Spannungsabfall über die freie Membran  $\Delta V_M = -57$  mV. Nach Gleichung 2.2 lässt sich der Spannungsabfall im Bad abschätzen:  $\Delta V_E = -38$  mV ( $c_S = 1.2$   $\mu$ F/cm<sup>2</sup>,  $a_s = 0.05$  cm,  $\rho_E = 260$   $\Omega$  cm). Daraus lässt sich die Transmembranspannung der freien Membran  $\Delta(V_M - V_E) = \Delta V_{FM} = -19$  mV berechnen (siehe dazu Punkt 2). Mit Hilfe der Gleichung 2.6 lässt sich daraus der Spannungsabfall im Spalt und die Änderung der Transmembranspannung der adhären Membran  $\Delta V_{JM} = \Delta(V_M - V_J)$  abschätzen: Bei einer halbkugelförmigen Zelle mit  $3A_J = A_M$  (Zellen im Kontakt mit einer Patchpipette waren durch die Dialyse mit ICL nicht flach



**Abbildung 4.7:** Repetitive Stimulation von  $Ca_v1.2$  in *Current Clamp*. Reaktion der intrazellulären Spannung  $V_M$  auf repetitive Stimulation mit 5 Spannungsrampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -4.5 \text{ V}/2 \text{ ms}$  mit FPL (schwarz) und mit NIF (rot).

sondern eher halbkugelförmig) wurde die adhärenierte Membran durch den Spannungsabfall  $V_J - V_E = -57 \text{ mV}$  um  $\Delta(V_M - V_J) = \Delta V_{JM} = -2 \cdot \Delta(V_M - V_E) = 38 \text{ mV}$  depolarisiert.

Die Abschätzung des Spannungsabfalls im Spalt nach Gleichung 2.4 ergibt bei einer Rampensteilheit von  $\Delta V_S/\Delta t = -4.5 \text{ V}/2 \text{ ms}$   $V_J - V_E = -70 \text{ mV}$  ( $A_J = 500 \mu\text{m}^2$ ,  $d_J = 20 \text{ nm}$ ) und stimmt gut mit der Abschätzung aus dem Messwert überein.

Die Depolarisation war wesentlich geringer als noch unter *Voltage Clamp*-Bedingungen. Eine Ursache dafür war die geringere Rampensteilheit. Doch auch bei gleicher Rampensteilheit wird die adhärenierte Membran in *Current Clamp* im Vergleich zu *Voltage Clamp* schwächer depolarisiert (siehe dazu auch Punkt 2). Die freie Membran wird nicht depolarisiert, sondern hyperpolarisiert. Ihre Kanäle tragen daher nicht zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom bei.

Die geringe Depolarisation der adhärenierten Membran reichte aus, um kapazitive Kanalöffnung zu erreichen: Die Zunahme der intrazellulären Spannung nach der Rampe  $\Delta V_M = 10 \text{ mV}$  mit FPL wurde durch NIF unterdrückt und war daher eine Folge der kapazitiven Öffnung von  $Ca_v1.2$  in der adhärenierten Membran. Die eingeströmte Ladungsmenge ist

$$\Delta Q = c_M A_M \Delta V_M \quad (4.3)$$

Mit der spezifischen Membrankapazität  $c_M = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und der Membranfläche  $A_M =$

$3A_{JM} = 1500 \mu\text{m}^2$  ergibt sich  $\Delta Q = 0.15 \text{ pC}$  eingeströmte Ladungsmenge pro Rampe. Das ist um etwa Faktor 30 weniger als im *Voltage Clamp*-Fall ( $\Delta Q = 5.1 \text{ pC}$  pro Rampe, siehe Punkt 4.2.2, Experiment 2).

Um die geringe Menge eingeströmter Ladung zu kompensieren, wurde repetitiv stimuliert.

### Experiment 2: Repetitive Stimulation

Abb. 4.7 zeigt, dass der Effekt der kapazitiven Stimulation auf das intrazelluläre Potential bei repetitiver Stimulation akkumulierbar war. Das Membranpotential konnte so schrittweise höher getrieben werden, bis der Schwellwert für die Öffnung der  $Ca_v1.2$ -Kanäle erreicht war. Durch den Einsatz von FPL lag diese Schwelle bei etwa  $-30 \text{ mV}$ . Bei Übertreten der Schwelle trat die Selbsterregung der Zelle wie bei einem Aktionspotential ein. Die Folge war ein starker  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die gesamte Zellmembran, der die Zelle auf ein intrazelluläres Potential von  $\Delta V_M = 55 \text{ mV}$  trieb.

Ob die Erhöhung der intrazellulären Spannung nach einer Rampe mit der bei der nächsten Rampe akkumulierbar war, hing von der Frequenz der repetitiven Stimulation ab. Lagen die Rampen zu weit auseinander, erholte sich das Membranpotential vor dem nächsten Stimulus, so dass zwar  $Ca^{2+}$ -Einstrom stattfand, das Membranpotential aber nicht schrittweise nach oben getrieben wurde. Bei den meisten Zellen führten Reizfrequenzen von 5 Hz bis 10 Hz zur Akkumulation der Potentialerhöhungen.

Nach den oben gezeigten Ergebnissen kamen zwei Ursachen für  $Ca^{2+}$ -Einstrom vor:

1.  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung durch Rampen.
2.  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach selbsterregter Kanalöffnung nach Erreichen der Schwelle.

Im Folgenden wurde bei Reaktionen nicht spannungsgeklemmter Zellen auf repetitive Stimulation zwischen diesen beiden Mechanismen unterschieden.

## 4.4 Zusammenfassung

Aus den oben gezeigten Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Die kapazitive Öffnung von  $Ca_v1.2$  in HEK-Zellen ist in hochohmiger Messlösung möglich.
2. In *Voltage Clamp* ist die adhärierte Membran deutlich größeren Transmembranspannungen ausgesetzt als die freie Membran. Daher dominiert die adhärierte Membran das Signal.
3. Das kapazitive Gating während der Stimulationsrampe konnte mit  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger auf  $TiO_2$ -Chips ohne pharmakologische Hilfsmittel gemessen werden.
4.  $Ca^{2+}$ -Strom nach kapazitiver Öffnung von  $Ca_v1.2$  konnte auf  $TiO_2$ -Chips anhand der *tail currents* ohne FPL nachgewiesen werden, der Strom während der Rampe war aber unter der Nachweisgrenze.
5. Kapazitive Aktivierung von  $Ca_v1.2$  auf  $HfO_2$ -Chips führte durch den Einsatz des Agonisten FPL zu starkem  $Ca^{2+}$ -Einstrom während der *tail currents*.
6. In *Current Clamp* führte kapazitive Kanalöffnung mit FPL zur messbaren Erhöhung des intrazellulären Potentials.
7. Repetitive Stimulation konnte in *Current Clamp* zu selbsterregter Kanalöffnung führen.

# Kapitel 5

## Fluoreszenzoptischer Nachweis des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in HEK-Zellen

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung sollte nun fluoreszenzoptisch mit Fura-2 nachgewiesen werden. Fura-2 wurde in hoher intrazellulärer Konzentration eingesetzt. So war die Messung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge ausreichend um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch kapazitive Kanalöffnung zu ermitteln (siehe Punkt 3.5.1). Daher kam in allen Experimenten Lösungspaar 4 mit ICL 4b zum Einsatz (siehe Anhang A.4.4).

Simultane *Voltage Clamp*- und Fluoreszenzmessungen lieferten den Proportionalitätsfaktor  $f$  zwischen Fluoreszenzänderung und eingeströmter Ladungsmenge.  $f$  wurde für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach intrazellulärer und nach kapazitiver Stimulation bestimmt.  $f$  bei intrazellulärer Stimulation sollte mit  $f$  bei kapazitiver Stimulation übereinstimmen, wenn bei beiden Stimulationstypen die Fluoreszenzänderung ausschließlich durch transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgte.

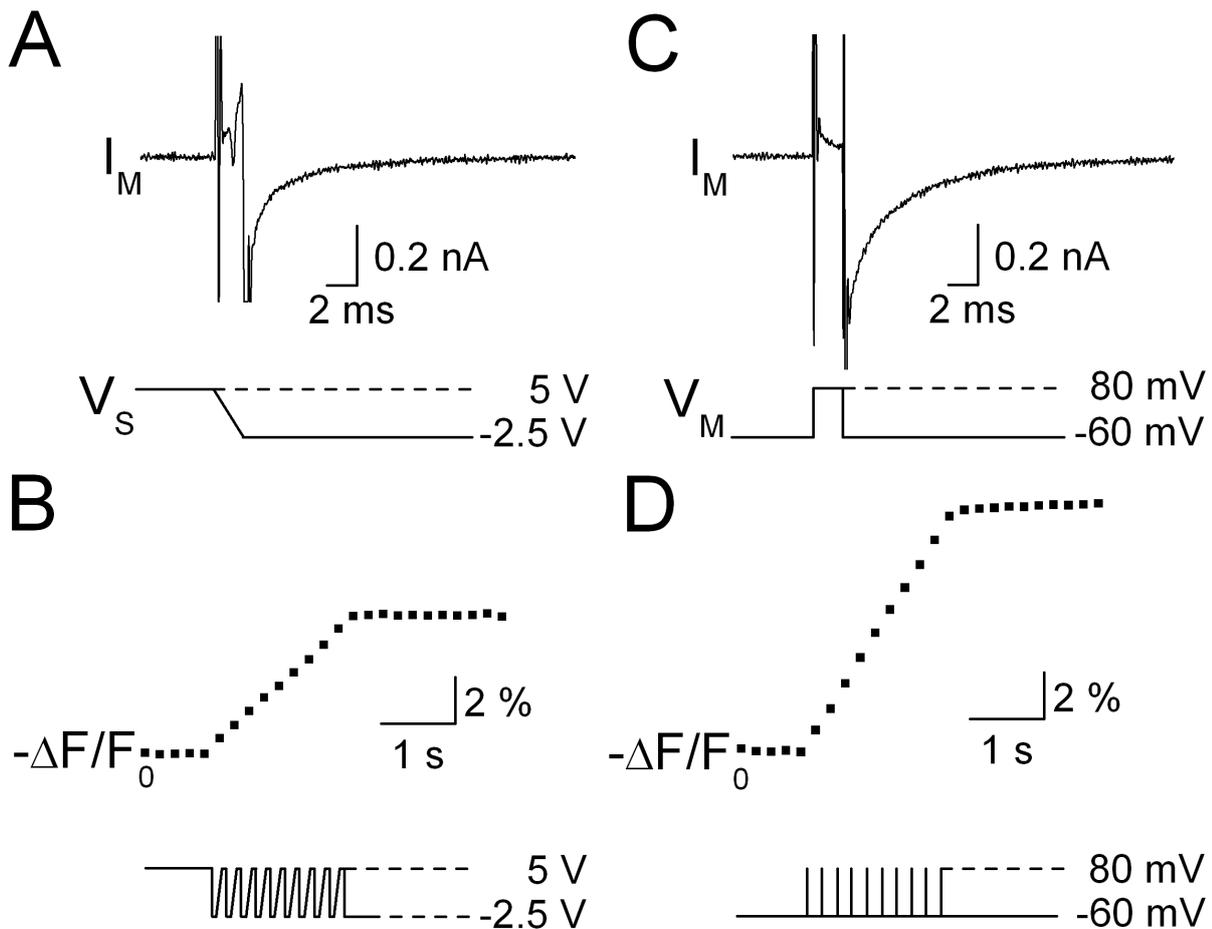
Der Faktor wurde anschließend eingesetzt, um die kapazitive Kanalöffnung in nicht spannungsgeklemmten Zellen nachzuweisen. Dafür wurde zunächst eine simultane *Current Clamp*- und Fura-2-Messung durchgeführt, bevor dann der Effekt kapazitiver Stimulation auf intakte Zellen rein fluoreszenzoptisch gemessen wurde.

### 5.1 *Voltage Clamp*- Bedingungen

Bei sehr hoher Farbstoffkonzentration überwiegt der exogene die endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer und die Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge ist proportional zur eingeströmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge mit dem Proportionalitätsfaktor  $f$  (siehe Punkt 3.5.1). Um den Faktor  $f$  zu bestimmen, mussten zunächst fluoreszenzoptische Messungen simultan mit elektrophysiologischen Messungen durchgeführt werden, wobei  $\text{Ca}^{2+}$  der einzige Ladungsträger war, so dass galt  $I_M = I_{\text{Ca}^{2+}}$ . So konnte der Faktor  $f$  aus der Messung der Fluoreszenzänderung  $\Delta F$  und der simultan in *Voltage Clamp* durchgeführten Messung des transmembranen Membranstroms  $I_M$  mit

$$f = \frac{\Delta F}{\Delta Q} = \frac{\Delta F}{\int I_M dt} \quad (5.1)$$

berechnet werden. Mit Hilfe des Proportionalitätsfaktors  $f$  konnten im Anschluss Fluoreszenzänderungen in die eingeströmte Ladungsmenge umgerechnet werden.

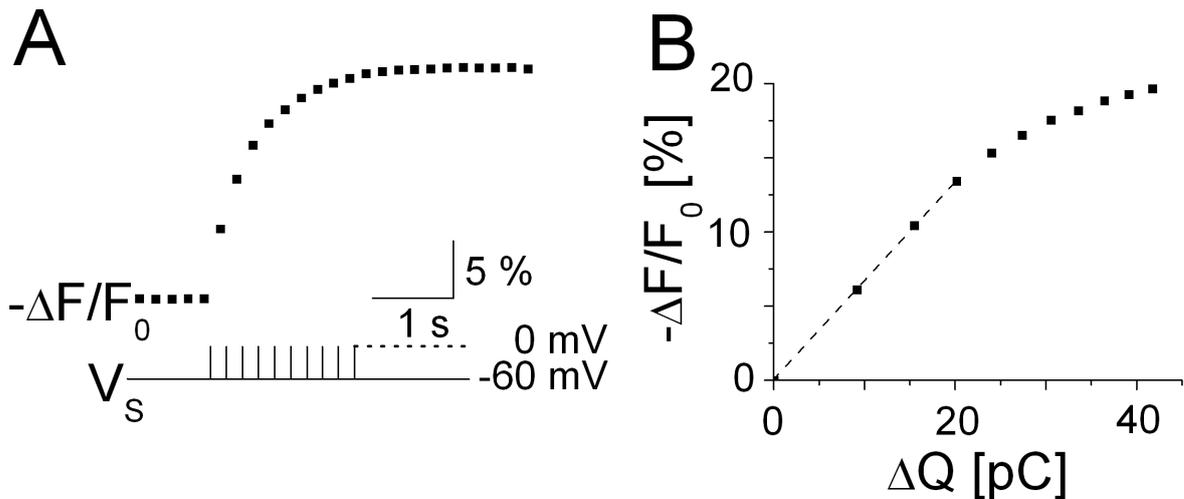


**Abbildung 5.1:** Simultane *Voltage Clamp*- und Fluoreszenzaufnahmen bei intrazellulärer und extrazellulärer Aktivierung von  $\text{Ca}_v1.2$ . **A** Membranstrom  $I_M$  und Chipspannung  $V_S$  während einer Spannungsrampe. **B** Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  bei repetitiver kapazitiver Stimulation mit 10 Rampen. **C** Membranstrom  $I_M$  und Klemmspannung  $V_M$  während eines intrazellulären Depolarisationspulses. **D** Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  bei repetitiver intrazellulärer Depolarisation mit 10 kurzen Pulsen.

Im ersten Experiment wurde  $f$  für extrazelluläre ( $f_{extra}$ ) und intrazelluläre ( $f_{intra}$ ) Stimulation gemessen. Im zweiten Experiment wurde eine Zelle durch längere intrazelluläre Depolarisationen mit größeren Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  beladen und die resultierende Fluoreszenzänderung gemessen. Der Zusammenhang zwischen  $\Delta Q$  und  $\Delta F/F_0$  ist nur bei kleinen eingeströmten Ladungsmengen linear [81, 96]. Ursache dafür ist die Sättigung des Farbstoffes bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Experiment 2 wurde durchgeführt, um den Bereich einzugrenzen, in dem die lineare Beziehung nach Gleichung 5.1 galt.

## EXPERIMENT 1

$\text{Ca}_v1.2$ -Zellen wurden auf  $\text{HfO}_2$ -Chips kultiviert und unter *Voltage Clamp*-Bedingungen extrazellulär oder intrazellulär repetitiv stimuliert. FPL wurde vor Beginn des Experiments zugegeben. Der jeweils erste Stimulus  $V_S$  (extrazelluläre Stimulation) bzw.  $V_M$  (intrazelluläre Stimulation), zusammen mit dem gemessenen Membranstrom  $I_M$  wurde in Abb. 5.1 A bzw. C für zwei typische Messungen dargestellt. Es handelte sich um zwei



**Abbildung 5.2:** Linearer und nichtlinearer Bereich des Zusammenhangs von Fluoreszenzänderung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. **A**  $-\Delta F/F_0$  bei repetitiver Stimulation mit 50 ms langen intrazellulären Depolarisationspulsen. **B**  $-\Delta F/F_0$  aufgetragen gegen die eingeströmte Menge  $\text{Ca}^{2+}$ . Der lineare Bereich ist mit einer gestrichelten Geraden der Steigung  $0.67\%/pC$  unterlegt.

verschiedene Zellen.

Für die extrazelluläre Stimulation wurden Chiprampen der Steilheit  $-7.5\text{ V}/2\text{ ms}$  gewählt. Für die intrazelluläre Stimulation wurden Pulsdauer  $\Delta t = 2\text{ ms}$  und Amplitude  $\Delta V_M = 140\text{ mV}$  so gewählt, dass die Depolarisation der Stimulation durch eine Chiprampe ähnlich war.

Eine Zelle wurde repetitiv mit zehn Rampen stimuliert, ein Stimulus erfolgte alle 200 ms. Eine weitere Zelle wurde repetitiv mit zehn intrazellulären Depolarisationen stimuliert, ein Stimulus erfolgte alle 200 ms. Die Wirkung repetitiver extra- bzw. intrazellulärer Stimulation auf die Fluoreszenz von Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge (380 nm) wurde in Abb. 5.1 B für die kapazitive und in Abb. 5.1 D für die intrazelluläre Stimulation dargestellt. Fünf Fluoreszenzbilder wurden jeweils vor der Stimulation aufgenommen, dann jeweils eines nach jedem Stimulus und dann weitere zehn nach der Stimulation. Eine Fluoreszenzabnahme, also eine Signalzunahme in  $-\Delta F/F_0$  wurde nach jedem Stimulus beobachtet.  $I_M$  wurde während der repetitiven Stimulation aufgenommen, aber nicht dargestellt.

## EXPERIMENT 2

Die Zelle aus Abb. 5.1 C und D wurde anschließend repetitiv mit 10 Depolarisationspulsen der Dauer 50 ms und der Amplitude  $\Delta V_M = 60\text{ mV}$  auf  $V_M = 0\text{ mV}$  depolarisiert. Ein Puls erfolgte alle 200 ms. Die Fluoreszenzänderung wurde dabei aufgenommen und  $-\Delta F/F_0$  in Abb. 5.2 A dargestellt. Fünf Fluoreszenzbilder wurden jeweils vor der Stimulation aufgenommen, dann jeweils eines nach jedem Stimulus und dann weitere zehn nach der Stimulation. Eine Fluoreszenzabnahme, also eine Signalzunahme in  $-\Delta F/F_0$  wurde nach jedem Stimulus gemessen. Die Fluoreszenzänderung wurde von Puls zu Puls kleiner.  $I_M$  wurde während der repetitiven Stimulation aufgenommen, aber nicht dargestellt.

## DISKUSSION

### Experiment 1

Während der intrazellulären Depolarisationspulse wurde kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gemessen, da die Membran auf  $V_M = 80 \text{ mV}$  depolarisiert wurde und so keine Triebkraft für  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom vorhanden war. Daher wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom während der Depolarisation bei der Auswertung vernachlässigt und die eingeströmte Ladungsmenge pro Rampe über das Integral der *tail currents* bestimmt. Jeder Stimulus führte im Mittel zu einem Ladungseinstrom von  $\Delta Q = 1.5 \text{ pC}$ . Der Ladungseinstrom hatte eine mittlere Fluoreszenzabnahme pro Puls von  $-\Delta F/F_0 = 1\%$  zur Folge. Aus diesem Einzelexperiment ergab sich  $f = 0.76\%/\text{pC}$ . Der Mittelwert nach 6 Experimenten war  $f_{\text{intra}} = 0.71\%/\text{pC}$ .

Bei kapazitiver Reizung konnte der Ionenstrom während der Rampe nur abgeschätzt werden: die Gleichungen 2.2 und 2.4 liefern Transmembranspannungen von  $V_{JM} = 88 \text{ mV}$  für die adhärierte und  $V_{FM} = -30 \text{ mV}$  für die freie Membran. Die Triebkraft für Ionenstrom über die adhärierte Membran war während der Rampe gering und in der freien Membran wurde die Schwelle zur Kanalöffnung kaum überschritten. Daher wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während der Rampe vernachlässigt und die eingeströmte Ladungsmenge pro Rampe wurde über das Integral der *tail currents* bestimmt. Jede Rampe führte im Mittel zu einem Ladungseinstrom von  $\Delta Q = 0.8 \text{ pC}$ . Der Ladungseinstrom hatte eine mittlere Fluoreszenzabnahme pro Puls von  $-\Delta F/F_0 = 0.6\%$  zur Folge. Aus diesem Einzelexperiment ergab sich  $f = 0.69\%/\text{pC}$ . Der Mittelwert nach 6 Experimenten war  $f_{\text{extra}} = 0.72\%/\text{pC}$ .

Intrazelluläre und kapazitive Stimulation führte zur Öffnung von  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen. Die eingeströmte Ladungsmenge war bei intrazellulärer Stimulation etwa doppelt so groß wie bei kapazitiver. Direkt war das allerdings nicht zu vergleichen, da es sich um zwei verschiedene Zellen handelte und die eingeströmte Ladungsmenge vom individuellen Ganzzellstrom der einzelnen Zellen abhing.

Kapazitive und Intrazelluläre Stimulation führten innerhalb der experimentellen Ungenauigkeit zum selben Proportionalitätsfaktor. Transmembraner  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom war also die einzige Ursache der Fluoreszenzänderung nach kapazitiver Stimulation,  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern war nicht beteiligt.

$f$  konnte jetzt eingesetzt werden, um den Ladungseinstrom aus der Fluoreszenzänderung ohne *Voltage Clamp*-Messung zu gewinnen.

### Experiment 2

Jeder intrazelluläre Stimulus führte zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Die Depolarisation auf  $V_M = 0 \text{ mV}$  führte zu Ladungseinstrom während und nach dem Stimulus. Daher wurde die eingeströmte Ladungsmenge hier über die Summe des Stromintegrals während der Depolarisation und des Stromintegrals der *tail currents* ermittelt.  $\Delta Q = \int I_M dt$  nahm von Puls zu Puls ab (nicht gezeigt), da der starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Inaktivierung führte. In Abb. 5.2 B ist der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0$  und eingeströmter Ladungsmenge  $\Delta Q$  gezeigt. Bei den ersten drei Depolarisationen war der Zusammenhang noch linear mit dem aus Experiment 1 ermittelten Faktor  $f = 0.67\%/\text{pC}$  (es handelte sich um dieselbe Zelle wie in Abb. 5.1 A und C). Danach sättigte die Beziehung zwischen Fluoreszenzänderung und eingeströmter Ladungsmenge.

Fura-2 hat eine hohe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ . Bei großen eingeströmten Ladungsmengen durch längere intrazelluläre Depolarisationspulse wird daher die Farbstoffsättigung er-

reicht. Wie viel Ladung einströmen konnte, ohne den linearen Bereich zu verlassen, hing vom Wert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vor der Stimulation  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}}$  ab. Aufgrund der hohen Konzentration des exogenen Puffers hatten die Zellen nach vollständiger Beladung durch Dialyse mit ICL eine geringe freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i \leq 50 \text{ nM}$ . Da die Zellen aber meist über intrazelluläre Depolarisation auf ihre Kanalexpression getestet wurden und einige Stimulationsprotokolle durchgeführt werden mussten, um die optimale Rampensteilheit für die kapazitive Stimulation zu ermitteln, war zu Beginn des eigentlichen Experiments  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}}$  oft erhöht.

In diesem Beispiel war  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}} \approx 50 \text{ nM}$  und der Bereich der Sättigung wurde erst bei  $\Delta Q > 20 \text{ pC}$  erreicht. Generell zeigte sich bei Zellen mit  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}} \leq 50 \text{ nM}$  erst bei einem Ladungseinstrom  $\Delta Q > 20 \text{ pC}$  eine Sättigung des Farbstoffes, während sich bei Zellen mit  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}} > 50 \text{ nM} < 70 \text{ nM}$  schon ab  $\Delta Q > 10 \text{ pC}$  eine Sättigung zeigte.

Im Folgenden wurde der  $f$ -Faktor zur quantitativen fluoreszenzoptischen Messung der eingeströmten Ladungsmenge nur angewandt, wenn  $\Delta Q < 10 \text{ pC}$  galt und  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ibasal}} < 70 \text{ nM}$  war. Diese Bedingungen gelten nicht bei dem starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach selbsterregter Kanalöffnung (siehe Punkt 5.2).

## 5.2 Current Clamp - Bedingungen

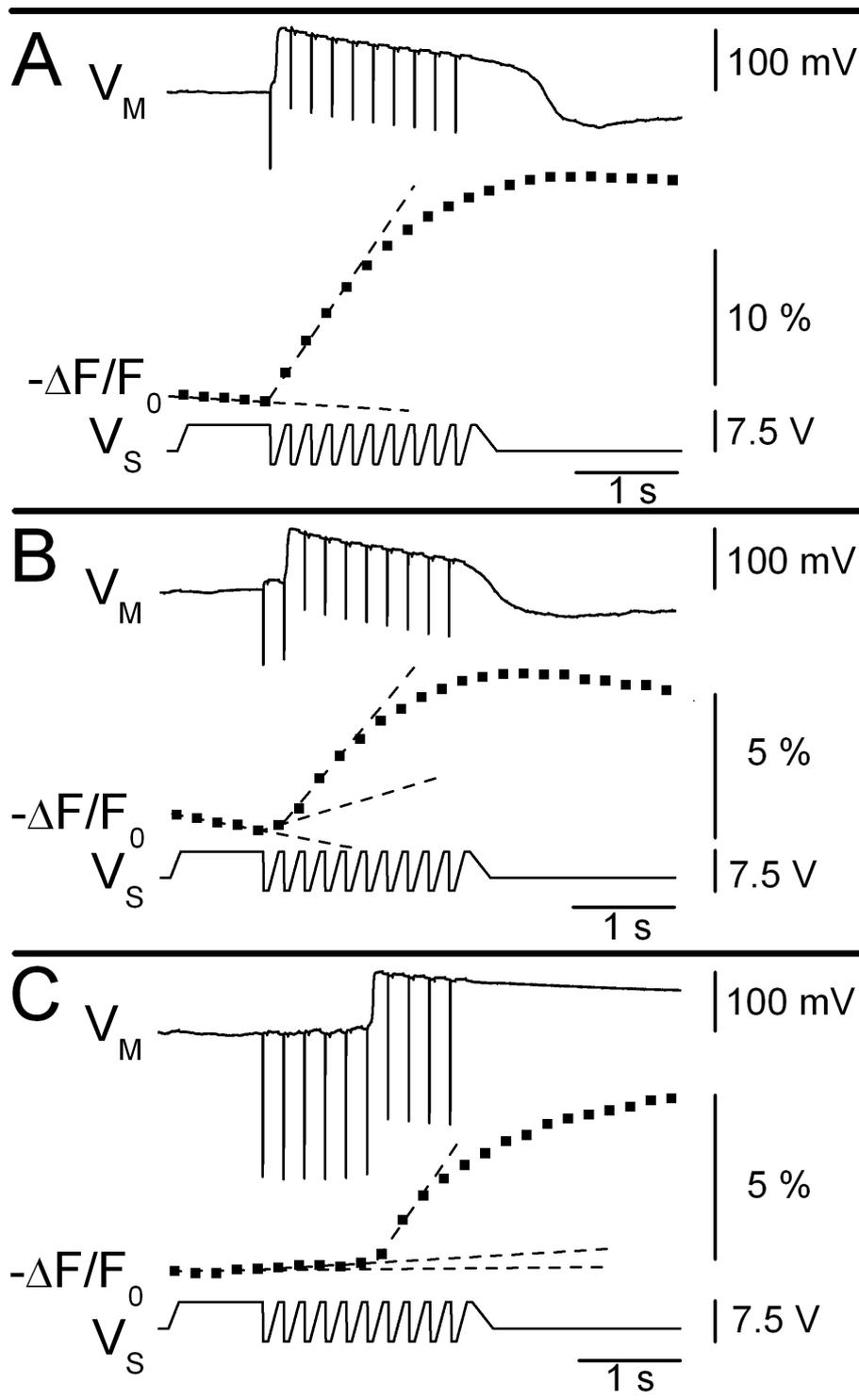
Es wurden simultan *Current Clamp*- und Fura-2 Messungen durchgeführt, um den Einfluss kapazitiver Stimulation auf das Membranpotential mit der durch Kanalöffnung eingeströmten Ladungsmenge zu korrelieren. Grundsätzlich war nur die Bestimmung des geringen Ladungseinstroms durch kapazitive Kanalöffnung sinnvoll, da bei selbsterregter Kanalöffnung (siehe Punkt 4.3) mit sehr starkem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von  $\Delta Q \gg 20 \text{ pC}$  zu rechnen war.

### EXPERIMENT

$\text{Ca}_v1.2$ -Zellen wurden auf  $\text{HfO}_2$ -Chips kultiviert und unter *Current Clamp*-Bedingungen extrazellulär mit 10 Rampen repetitiv stimuliert. Die Stimulationsfrequenz war 5 Hz. Fünf Fluoreszenzbilder wurden vor der Stimulation aufgenommen, dann jeweils eines nach jedem Stimulus und dann weitere zehn nach der Stimulation. Die Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0$ , die intrazelluläre Spannung  $V_M$  und die Stimulationsrampen  $V_S$  sind für drei Stimulationsexperimente in Abb. 5.3 dargestellt. FPL wurde vor Beginn aller Experimente zugegeben.

Die erste Zelle zeigte ein Membranpotential  $V_M = -59 \text{ mV}$  und wurde mit Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ mV}/2 \text{ ms}$  stimuliert (5.3 A). Direkt nach der ersten Rampe wurde die Schwelle für Selbsterregung erreicht und  $V_M$  stieg an auf  $51 \text{ mV}$ . Gleichzeitig erfolgte eine starke Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0 = 15.1 \%$ .

Eine Minute nach der ersten Aufnahme hatte sich das Membranpotential auf  $V_M = -59 \text{ mV}$  erholt,  $-\Delta F/F_0$  blieb im Vergleich zu vorher um  $10.7 \%$  erhöht. Dieselbe Zelle wurde erneut mit  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ mV}/2 \text{ ms}$  stimuliert (Abb. 5.3 B). Die erste Rampe hob das intrazelluläre Potential um  $\Delta V_M = 17 \text{ mV}$  auf  $V_M = -42 \text{ mV}$  an. Gleichzeitig wurde eine geringe Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0 = 0.18 \%$  gemessen. Nach der zweiten Rampe wurde die Schwelle zur Selbsterregung erreicht und das Membranpotential stieg schnell auf  $V_M = 45 \text{ mV}$ .  $-\Delta F/F_0$  stieg um  $4.5 \%$  an.



**Abbildung 5.3:** Simultane *Current Clamp*- und Fluoreszenzaufnahmen bei repetitiver kapazitiver Stimulation. Die intrazelluläre Spannung  $V_M$  und das Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  reagieren auf die Stimulationsrampen  $V_S$ . **A** und **B** wurden an einer Zelle gemessen, **C** zeigt die Messung einer anderen Zelle.

Eine andere Zelle wurde mit Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ mV}/1 \text{ ms}$  stimuliert (Abb. 5.3 C). Die ersten fünf Rampen hoben das Membranpotential insgesamt um  $V_M = 13 \text{ mV}$  auf  $V_M = -43 \text{ mV}$  an. Diese Erhöhung ging mit einer Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0 = 0.18\%$  einher. Nach der sechsten Rampe wurde die Schwelle überschritten und die Membranspannung stieg schnell auf  $V_M = 49 \text{ mV}$ , begleitet von einer weiteren Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0$  um  $5.3\%$ . Nach der vollständigen Depolarisation erholte sich die Zelle nicht mehr.

## DISKUSSION

**Experiment 1 (Abb. 5.3 A).** Die Pipette detektierte während der Rampen einen Spannungsabfall  $\Delta V_M = -130 \text{ mV}$ . Die gemessene Spannungsänderung im Bad war  $\Delta V_E = -100 \text{ mV}$ . Die Differenz lieferte  $\Delta V_M - \Delta V_E = \Delta V_{FM} = -30 \text{ mV}$ . Mit  $A_{FM} = 2A_{JM}$  und den Gleichungen 2.7 und 2.6 führte das zu  $\Delta V_{JM} = 60 \text{ mV}$ .

Bei  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ mV}/2 \text{ ms}$  ist nach Gleichung 2.4 der lokale Spannungsabfall im Spalt  $V_J - V_E = -77 \text{ mV}$  ( $A_J = 330 \mu\text{m}^2$ ,  $d_J = 20 \text{ nm}$ ,  $c_S = 1.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Bei  $A_{FM} = 2A_{JM}$  ist nach den Gleichungen 2.7 und 2.6  $\Delta V_{FM} = -26 \text{ mV}$  und  $\Delta V_{JM} = 51 \text{ mV}$ .

Die Werte aus der gemessenen Hyperpolarisation der freien Membran und der Abschätzung der Spaltspannung waren in guter Übereinstimmung. Die Depolarisation reichte aus, um die adhärenierte Membran über die Schwelle für Kanalöffnung zu depolarisieren.

**Experiment 2 (Abb. 5.3 B).** Die Kopplung der Zelle hatte sich nicht verändert, die Pipette detektierte wieder den Spannungsabfall  $\Delta V_M = -130 \text{ mV}$  während der Rampe. Da die Rampensteilheit nicht verändert wurde, gelten die Abschätzungen der Depolarisation wie bei Experiment 1.

**Experiment 3 (Abb. 5.3 C).** Die Pipette detektierte während der Rampen  $\Delta V_M = -240 \text{ mV}$ . Die gemessene Spannungsänderung im Bad war  $\Delta V_E = -200 \text{ mV}$ . Die Differenz lieferte  $\Delta V_M - \Delta V_E = \Delta V_{FM} = -40 \text{ mV}$ . Mit  $A_{FM} = 2A_{JM}$  und den Gleichungen 2.7 und 2.6 führt das zu  $\Delta V_{JM} = 80 \text{ mV}$ .

Bei  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ mV}/1 \text{ ms}$  ist nach Gleichung 2.4 der lokale Spannungsabfall im Spalt  $V_J - V_E = -154 \text{ mV}$  ( $A_J = 330 \mu\text{m}^2$ ,  $d_J = 20 \text{ nm}$ ,  $c_S = 1.2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Bei  $A_{FM} = 2A_{JM}$  gilt nach den Gleichungen 2.7 und 2.6  $\Delta V_{JM} = 102 \text{ mV}$  und  $\Delta V_{FM} = -51 \text{ mV}$ .

Die Werte aus der Abschätzung der Spaltspannung und der gemessenen Hyperpolarisation der freien Membran waren in guter Übereinstimmung. Die Depolarisation reichte aus, um die adhärenierte Membran über Schwelle für Kanalöffnung zu depolarisieren.

## Kapazitive Kanalöffnung

Laut den Abschätzungen der Transmembranspannungen wurde die adhärenierte Membran bei allen drei Experimenten etwa gleich stark depolarisiert und kapazitive Kanalöffnung fand statt. Die eingeströmte Ladungsmenge pro Rampe war in jedem Experiment jedoch unterschiedlich.

In Experiment 1 war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach der ersten Rampe so groß, dass die Schwelle für die Selbsterregung direkt überschritten wurde.

Eine Minute später hatte sich zwar das intrazelluläre Potential, nicht aber der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel der Zelle erholt. Jetzt waren zwei Rampen nötig, um die Schwelle zu erreichen, obwohl weder Kopplung noch Rampensteilheit sich verändert hatten (Experiment 2). Dies

war vermutlich auf eine teilweise  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung der Kanäle zurückzuführen.

Die eingeströmte Ladungsmenge nach kapazitiver Kanalöffnung kann in Experiment 2 aus der Änderung des Membranpotentials und aus der Fluoreszenzänderung abgeschätzt werden:

- Bei  $\Delta V_M = 17 \text{ mV}$  galt  $\Delta Q = 0.17 \text{ pC}$  nach Gleichung 4.3.
- Bei  $-\Delta F/F_0 = 0.18 \%$  galt  $\Delta Q = 0.25 \text{ pC}$  nach Gleichung 5.1.

Innerhalb der Ungenauigkeiten bei der Messung und der Abschätzung der Membranfläche stimmten die beiden Werte gut überein.

Bei der Zelle in Experiment 3 waren 5 Rampen nötig, um ausreichen  $\text{Ca}^{2+}$  zu injizieren und das Membranpotential über die Schwelle zu treiben. Ursache dafür könnte geringerer Ganzzellstrom dieser Zelle sein.

Die eingeströmte Ladungsmenge nach kapazitiver Kanalöffnung kann in Experiment 3 wieder aus der Änderung des Membranpotentials und aus der Fluoreszenzänderung abgeschätzt werden:

- Bei  $\Delta V_M = 13 \text{ mV}$  galt  $\Delta Q = 0.13 \text{ pC}$  nach Gleichung 4.3 zugrunde.
- Bei  $-\Delta F/F_0 = 0.18 \%$  galt  $\Delta Q = 0.25 \text{ pC}$  nach Gleichung 5.1.

Innerhalb der Ungenauigkeiten bei der Messung und der Abschätzung der Membranfläche stimmten die beiden Werte gut überein.

### Selbsterregte Kanalöffnung.

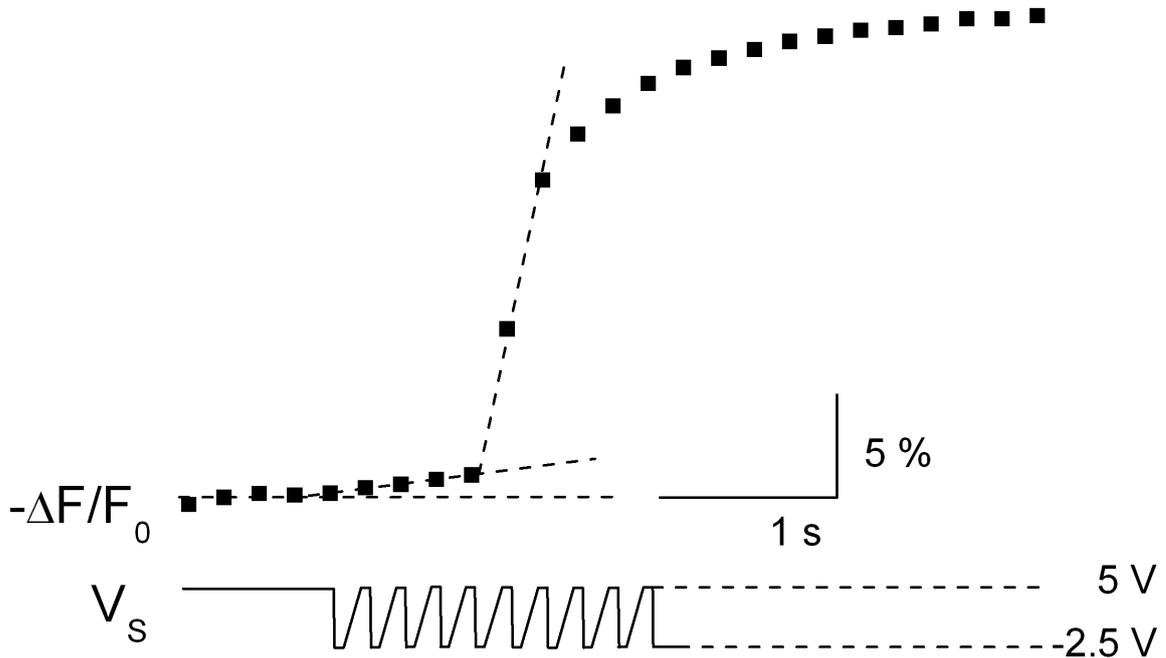
Nach Überschreiten der Schwelle für Selbsterregung erfolgte in allen drei Experimenten ein plötzlicher, starker Anstieg des Membranpotentials auf positive Werte (Exp. 1:  $V_M = 51 \text{ mV}$ , Exp. 2:  $V_M = 45 \text{ mV}$ , Exp. 3:  $V_M = 49 \text{ mV}$ ). Die darauffolgenden Rampen führten nicht mehr zu weiterer kapazitiver Kanalöffnung, da bei dem stark positiven Membranpotential die Kanäle bereits geöffnet waren.

Dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach selbsterregter Kanalöffnung folgte in Experiment 1 eine starke Fluoreszenzänderung ( $-\Delta F/F_0 = 15.1 \%$ ). Die Fluoreszenzänderung in den anderen beiden Experimenten war um Faktor 3 geringer (Exp. 2:  $-\Delta F/F_0 = 4.5 \%$ ; Exp. 3:  $-\Delta F/F_0 = 5.2 \%$ ). Dies ist eine Folge der Vorsättigung des Farbstoffes nach der ersten vollen Depolarisation der Zelle. Während die Zelle in Abb. 5.3 A im abgebildeten Experiment zum ersten mal stimuliert wurde, waren bei den Beispielen in Abb. 5.3 B und C bereits zuvor Stimulationen erfolgt. Eine Abschätzung der eingeströmten Ladung mit Hilfe des  $f$ -Faktors war nach Punkt 5.1 bei selbsterregter Kanalöffnung ohnehin nicht sinnvoll.

### Fazit

Nach obiger Messung lässt sich folgendes festhalten:

1. Kapazitive und selbsterregte Kanalöffnung führen zu einer Fluoreszenzänderung.
2. Für kapazitive Kanalöffnung ist mit Gleichung 3.1 eine Abschätzung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms aus der Fluoreszenzänderung möglich.



**Abbildung 5.4:** Fluoreszenzaufnahmen bei repetitiver kapazitiver Stimulation. Die Chipspannung  $V_S$  und das Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  sind gezeigt.

### 5.3 Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette

Der Effekt kapazitiver Stimulation auf intakte Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette sollte nun rein fluoreszenzoptisch gemessen werden. Nach obigen Ergebnissen sollte es durch rein fluoreszenzoptische Aufnahmen möglich sein, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch kapazitive Kanalöffnung zu messen. Hierfür wurden die Zellen mit hohen Farbstoffkonzentrationen beladen (siehe Punkt 3.5.3).

Die intakten Zellen verfügten noch über ihr ungestörtes Zytosol. *Rundown*-Prozesse fanden nicht statt. Daher wurden die Experimente ohne Zusatz von FPL durchgeführt.

#### EXPERIMENT

$\text{Ca}_v1.2$ -Zellen wurden auf einem  $\text{HfO}_2$ -Chip kultiviert. Für die Messungen wurden außergewöhnlich große, flache Zellen gewählt, um eine gute Kopplung zwischen Zelle und Chip sicherzustellen. Abb. 5.4 zeigt die Messung einer solchen Zelle.

Die Zelle wurde mit zehn Rampen kapazitiv stimuliert ( $\Delta V/\Delta t = -4.5 \text{ mV}/2 \text{ ms}$ , eine Rampe alle 200 ms). Der Effekt der Stimulation auf die Fura-2 Fluoreszenz wurde bei 380 nm Anregung aufgenommen. Abb. 5.4 zeigt die Chipspannung  $V_S$  und die Änderung der Fluoreszenz  $-\Delta F/F_0$ . Wieder wurden zunächst fünf Fluoreszenzbilder vor Beginn der Stimulation aufgenommen, eines nach jeder Stimulationsrampe und zehn nach der Stimulation. Die Belichtungszeit war 100 ms.

Jede der ersten vier Rampen induzierte eine kleine Fluoreszenzänderung. Nach der fünften Rampe wurde ein starker Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet.

## DISKUSSION

Die Messung wurde an einer außergewöhnlich großen, flachen Zelle durchgeführt ( $A_M = 2000 \mu\text{m}^2$ ). Bei  $\Delta V_S/\Delta t = -4.5 \text{ mV}/2 \text{ ms}$  gilt nach Gleichung 2.4  $V_J - V_E = -140 \text{ mV}$  ( $d_J = 20 \text{ nm}$ ,  $A_J = 1000 \mu\text{m}^2$ ). Die Zelle wurde nicht durch die Dialyse mit ICL aufgebläht, so dass sie während der Stimulation sehr flach blieb ( $A_{JM} = A_{FM}$ ). Nach Gleichung 2.7 gilt für die freie Membran also  $\Delta V_{FM} = -70 \text{ mV}$  und nach Gleichung 2.6 gilt für die adhärrierte Membran  $\Delta V_{JM} = 70 \text{ mV}$ .

Die Depolarisation der adhärrierten Membran war nach dieser Abschätzung ausreichend um kapazitive Kanalöffnung herbeizuführen.

### Kapazitive Kanalöffnung

Die ersten vier Rampen öffneten  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle in der adhärrierten Membran. Die Kanalöffnung hatte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Folge, der über eine Fluoreszenzänderung von insgesamt  $-\Delta F/F_0 = 0.88 \%$  detektiert wurde. Die Anwendung von Gleichung 5.1 erfolgte unter der Annahme, dass nur transmembraner  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über  $\text{Ca}_v1.2$  zum Signal beitrug. Mit einem Fura-2 Signal durch sekundäre Prozesse wie  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern war in HEK293-Zellen nicht zu rechnen [1]. Die eingeströmte Ladungsmenge ist mit  $f_{extra} = 0.72 \%/pC$  gleich  $\Delta Q = 1.22 \text{ pC}$ . Nach Gleichung 4.3 hat dieser Ladungseinstrom eine Änderung der intrazellulären Spannung  $\Delta V_M = 61 \text{ mV}$  für diese große Zelle zur Folge. Die Schwelle für Kanalöffnung lag ohne Zusatz von FPL im Bad bei einer Transmembranspannung von etwa  $0 \text{ mV}$  (siehe 4.5). Mit  $V_M = -60 \text{ mV}$  als typischem Ruhepotential war die Änderung der intrazellulären Spannung  $\Delta V_M = 61 \text{ mV}$  ausreichend, um die Schwelle für Kanalöffnung zu erreichen.

Durch die kapazitive Kanalöffnung strömten  $\Delta Q = 0.31 \text{ pC}$  pro Rampe ein. Das war mehr als bei Punkt 4.3 und 5.2, obwohl kein FPL im Bad war. Die Ursache war vermutlich das intakte Zytosol der Zelle.

### Selbsterregte Kanalöffnung

Nach Stimulation mit der fünften Rampe wurde die Schwelle für Kanalöffnung erreicht und die Zelle durchlief einen selbsterregenden Prozess. Das Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  nahm bis zum Ende der Messung um  $23 \%$  stark zu. Wie die Zelle in Abb. 5.3 A wurde die hier gezeigte Zelle zum ersten mal stimuliert. Daraus folgte die starke Fluoreszenzänderung bei selbsterregter Kanalöffnung. Eine Abschätzung der eingeströmten Ladung mit Hilfe des  $f$ -Faktors war nach Punkt 5.1 aber nicht sinnvoll. Ein Vergleich von Form und Amplitude des  $-\Delta F/F_0$ -Signals zwischen dem hier gezeigten Experiment und Punkt 5.2 ist schwierig. Hier soll lediglich die Anmerkung gemacht werden, dass der schnellere Zeitverlauf des starken Fluoreszenzsignals in der intakten Zelle von der schnelleren Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle in Abwesenheit von FPL beeinflusst sein könnte.

Sobald die Schwelle für selbsterregende Kanalöffnung überschritten wurde, erfolgte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in einer Alles-Oder-Nichts Reaktion und war unabhängig von weiterer kapazitiver Stimulation. Es strömten große Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  ein, eine Kontrolle der eingeströmten Ladungsmenge war aber nicht mehr möglich.

## 5.4 Zusammenfassung

1. Der Proportionalitätsfaktor  $f$  zwischen der Fluoreszenzänderung und der eingeströmter Ladungsmenge wurde über simultane *Voltage Clamp*- und Fluoreszenz-Messungen bestimmt. Er war für intrazelluläre und kapazitive Stimulation gleich.
2. Der fluoreszenzoptische Nachweis des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch kapazitive Kanalöffnung war in HEK-Zellen mit Kontakt zu einer Patchpipette in hochohmiger Messlösung und unter Einsatz von FPL gelungen. Die Kanalöffnung konnte in *Voltage Clamp* und *Current Clamp* gezeigt werden.
3. In Zellen ohne Kontakt zu einer Pipette war kapazitive Kanalöffnung ohne Zusatz von FPL möglich.
4. Die eingeströmte Ladungsmenge bei kapazitiver Kanalöffnung konnte aus der fluoreszenzoptischen Messung abgeschätzt werden.
5. Kapazitive Kanalöffnung konnte zu selbsterregter Kanalöffnung führen. Diese hatte eine starke Fluoreszenzänderung zur Folge, aus der sich die eingeströmte Ladungsmenge aber nicht bestimmen ließ.



# Kapitel 6

## Wirkung kapazitiver Stimulation auf $[Ca^{2+}]_i$ in Wachstumskegeln

Im Modellsystem HEK hatte die kapazitive Aktivierung von Calciumkanälen zu  $Ca^{2+}$ -Einstrom geführt. In nicht spannungsgeklemmten Zellen war die injizierte Menge  $Ca^{2+}$  bei einer einzelnen Stimulationsrampe gering. Mit repetitiver Stimulation konnten die geringen Mengen akkumuliert werden. Bei geeigneter Stimulationsfrequenz der repetitiven Stimulation wurde selbsterregte Kanalöffnung ausgelöst. Ein starker  $Ca^{2+}$ -Einstrom war die Folge.

Nun wurde die Wirkung kapazitiver Stimulation auf  $[Ca^{2+}]_i$  von Wachstumskegeln studiert. Diese sollte bei möglichst geringer Störung und bei intaktem Zytosol beobachtet werden. Daher wurde auf *Patch Clamp*-Messungen des Wachstumskegels verzichtet. Nach den Erfahrungen aus Kapitel 4 und 5 wurden die nicht spannungsgeklemmten Wachstumskegel repetitiv stimuliert.

Die Reaktionen der Wachstumskegel sollten in physiologischer Messlösung beobachtet werden. Die Verwendung von hochohmiger,  $Na^+$ -freier ECL kam nicht in Frage, da die Neurone kein physiologisches Verhalten zeigen würden [109, 58]. Der Einsatz physiologischer Messlösungen führte zu einem geringen Abdichtwiderstand. Um diesen zu kompensieren und gute Kopplung zu erreichen, wurde mit großflächigen, immotile Wachstumskegel aus Schneckenneuronen gearbeitet. Sie sind aufgrund ihrer großen Adhäsionsfläche immotil, reagieren aber auf dieselben Wachstumsfaktoren wie die motilen Wachstumskegel durch Umordnung ihres Zytoskeletts [129].

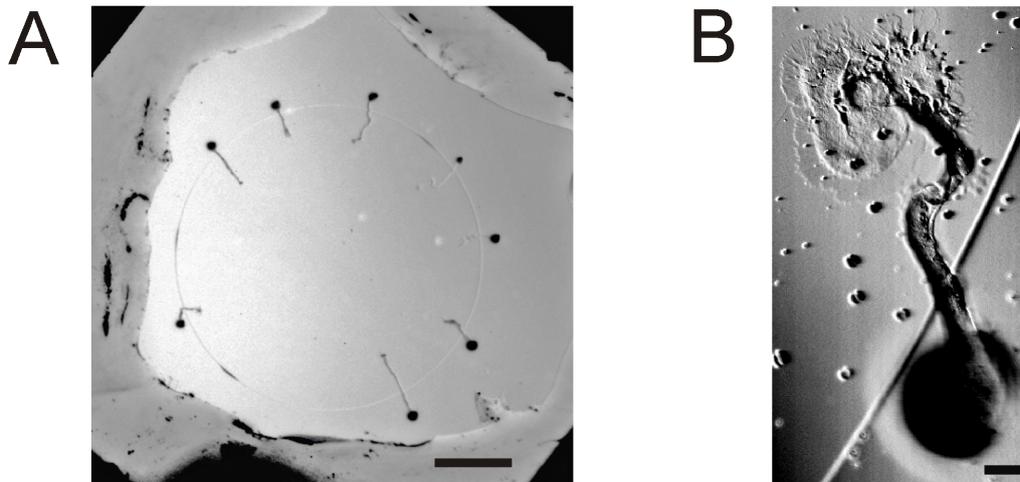
Quantitative Aussagen über  $[Ca^{2+}]_i$  bei physiologischem endogenen Puffersystem und über einen weiten Konzentrationsbereich sollten möglich sein. Daher wurden die Fluoreszenzmessungen bei möglichst geringen intrazellulären Fura-2 Konzentrationen ratiometrisch durchgeführt.

Neurone aus *Lymnea stagnalis* exprimieren verschiedene Typen VDCCs (siehe Tabelle 6.1). Schwach spannungssensitive Kanäle [132, 113] sind in der Darstellung nicht berücksichtigt, ebenso wie spannungsabhängige Kanäle, die durch Hyperpolarisation aktiviert werden. In B4 Neuronen wurden durch Hyperpolarisation aktivierbare Kanäle gefunden [112], nicht aber z.B. in ihren zerebralen Riesenzellen (*cerebral giant cells*, CGCs) [109]. Untersuchungen der Wachstumskegel von A-Cluster-Neuronen gibt es nicht. Die Reaktion des Wachstumskegels auf kapazitive Stimulation wurde unter der Annahme interpretiert, dass in den Wachstumskegeln aus A-Cluster-Neuronen von *Lymnea stagnalis* keine durch Hyperpolarisation aktivierbaren Kanäle exprimiert waren. Daher wurde ausschließlich die

Depolarisation der adhärerten Membran für die Interpretation der Reaktionen berücksichtigt.

Klasse	Name	homolog	Pharmakologie	beschrieben in	Referenz
LVA	LCa <sub>v</sub> 3	T	sensitiv: Ni <sup>2+</sup> (2 mM) insensitiv: Cd <sup>2+</sup> (100 μM)	CGCs	[109]
	LCa <sub>v</sub> 3	T	nicht getestet	VD4	[108]
HVA	LCa <sub>v</sub> 1	L	nicht getestet	VD4	[108]
	LCa <sub>v</sub> 1	L	sensitiv: Nimodipine, Nitrendipine	CDCs	[61]
	LCa <sub>v</sub> 1	L	sensitiv: TXVII	Lymnea	[25]
	LCa <sub>v</sub> 2	N, P/Q	nicht getestet	VD4	[108]
	?	?	sensitiv: Cd <sup>2+</sup> insensitiv: Ni <sup>2+</sup> , GVIA, IVA, DHPs	CGCs, CDCs	[109, 20]
	?	?	nicht getestet	A-Cluster WK	[49]
	LCa <sub>v</sub> 2	N, P/Q	sensitiv: ω-PnVIA, ω-PnVIB	CDCs	[61]
	LCa <sub>v</sub> 2	N, P/Q	sensitiv: MrVIA, MrVIB	CDCs	[26]
?	LCa <sub>v</sub> 4	U-Typ	nicht getestet	VD4	[108]

**Abbildung 6.1:** Klassifizierung und Pharmakologie der VDCCs in *Lymnea stagnalis*.



**Abbildung 6.2:** Platzierung der Neurone auf dem Halbleiterchip. **A** Acht Neurone in typischer Platzierung auf einem HfO<sub>2</sub>-Chip. Die Somata kamen außerhalb des kreisförmigen Kondensators zu liegen, die Axonstümpfe wurden in Richtung der Mitte des Kondensators orientiert, so dass die auswachsenden Wachstumskegel auf dem Kondensator zu liegen kamen. Außen sind die Ränder des Silikonklebers, mit dem der Chip in der Kulturkammer befestigt wurde, zu erkennen. Größenbalken, 500 μm. **B** Platzierung eines einzelnen Neurons. Das Bild wurde nach der Anfärbung mit Fura-2 AM aufgenommen, daher sind Farbstoffkristalle neben dem Neuron auf der Chipoberfläche zu sehen. Größenbalken, 20 μm.

Neben den in Tabelle 6.1 aufgeführten VDCCs exprimieren Neurone aus *Lymnea stagnalis* auch spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>- Kanälen und Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle [109].

Schneckenneurone exprimieren VDCCs in Soma und Wachstumskegel [48, 49]. Um selektiv nur die Wachstumskegel zu stimulieren, wurden die Neurone so auf die Chips

aufgebracht, dass nur das Ende des Axonstumpfes und der Wachstumskegel an seiner Spitze auf dem kreisförmigen Kondensator zu liegen kamen. Das Soma der Neurone wurde außerhalb des Kondensators positioniert (Abb. 6.2). Wegen der geringen Adhäsionsfläche des Axons konnte davon ausgegangen werden, dass nur die großflächigen Wachstumskegel durch die Chiprampen stimuliert wurden. Dabei wurde stets der gesamte Wachstumskegel stimuliert. Eine lokale, asymmetrische Stimulation nur einer Seite des Wachstumskegels ist mit den hier verwendeten großflächigen Kondensatoren nicht möglich.

## 6.1 Kapazitive Stimulation erhöht $[Ca^{2+}]_i$

Um den  $Ca^{2+}$ -Haushalt großer, immotiler Wachstumskegel maßgeblich zu beeinflussen, wurde repetitiv stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit mehreren Stimulationsserien. Eine Stimulationsserie bestand stets aus 10 Rampen gleicher Steilheit, eine Rampe erfolgte alle 250 ms, so dass eine Serie stets 2.5 s dauerte.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde während der Stimulation beobachtet.

### EXPERIMENT

Ein typisches Experiment ist in Abb. 6.3 gezeigt. Ein Wachstumskegel auf dem Kondensator eines  $HfO_2$ -Chips wurde mit Fura-2 beladen. Alle 250 ms wurde ein Bilderpaar bei zwei Anregungswellenlängen aufgenommen, so dass  $[Ca^{2+}]_i$  aus der Fluoreszenzänderung mit einer Aufnahmefrequenz von 4 Hz ratiometrisch ermittelt werden konnte.

Rampen mit Dauern von nur 2 ms, wie sie bei HEK-Zellen eingesetzt worden waren, zeigten keinen Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  (nicht gezeigt). Die Rampendauern mussten auf 10 ms heraufgesetzt werden, um effektiv zu stimulieren. Daher erfolgte die kapazitive Stimulation mit Serien von 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -2 \text{ V}/10 \text{ ms}$ , eine Rampe alle 250 ms. Stimulation und Fluoreszenzaufnahme waren so koordiniert, dass nach jeder einzelnen Rampe ein Bilderpaar aufgenommen und  $[Ca^{2+}]_i$  ermittelt werden konnte.

In Abb. 6.3 A ist die Stimulation mit drei Serien gezeigt.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Paare der gestrichelten Linien deuten jeweils den Zeitpunkt der ersten und der letzten Rampe einer Serie an.

Die erste Stimulationsserie führte insgesamt zu  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Serie} = 7.8 \text{ nM}$ . Nach einer Pause von etwa 1 min hatte sich  $[Ca^{2+}]_i$  wieder auf die Konzentration vor der ersten Stimulation erholt. Eine zweite Stimulationsserie führte zu  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Serie} = 10.5 \text{ nM}$ . Die dritte Stimulationsserie erfolgte nach nur 15 s und hob  $[Ca^{2+}]_i$  weiter um  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Serie} = 5.0 \text{ nM}$  an.

Abb. 6.3 B zeigt die Reaktion auf die erste Stimulationsserie vergrößert und korreliert mit der Chipspannung  $V_S$ .

Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme war nicht kontinuierlich. Es konnten drei Reaktionstypen auf kapazitive Stimulation unterschieden werden:

**Typ1** Jede Rampe führte einen kleinen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg herbei. Bei mehreren Rampen war das Resultat eine kontinuierliche  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme (mit roter Hilfslinie unterlegt). Die Steigung war hier im Mittel  $0.2 \text{ nM}/\text{Rampe}$  und für alle drei Serien etwa gleich.

**Typ2** Eine Rampe führte zu einem sprunghaften  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (mit blauer Hilfslinie unterlegt). Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme war für eine gegebene Zelle immer ähnlich und hier im Mittel  $3.2 \text{ nM}/\text{Sprung}$  für alle drei Serien.

**Typ3** Die Stimulation hatte weder einen sprunghaften Anstieg noch eine kontinuierliche Zunahme zur Folge (mit grüner Hilfslinie unterlegt).  $[Ca^{2+}]_i$  änderte sich nicht, nahm ab oder stieg geringfügig und diskontinuierlich an.

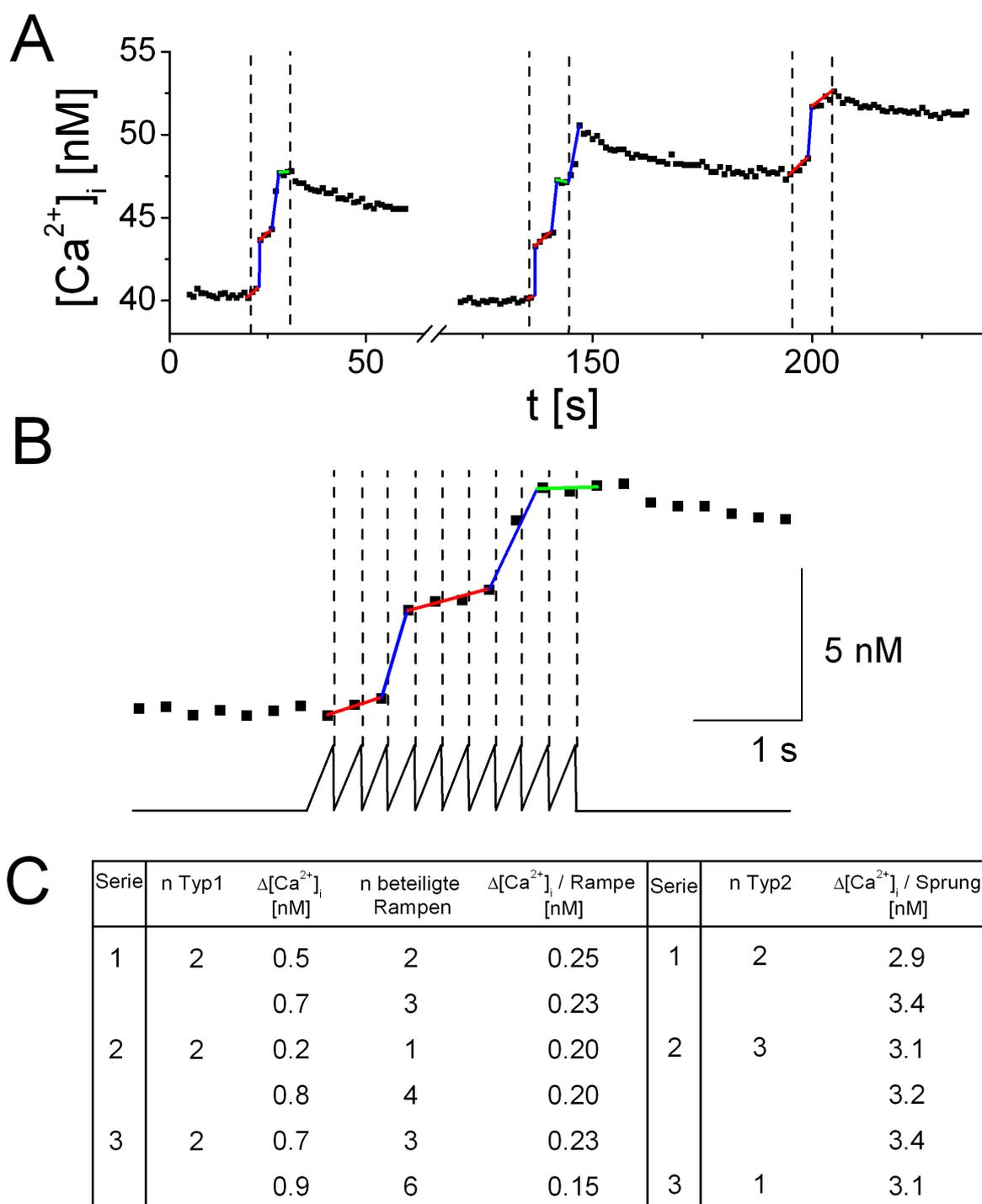
Die absolute  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung pro Serie ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Serie}$ ) ergab sich aus einer Kombination der drei Reaktionstypen. Die einzelnen Werte  $[Ca^{2+}]_i/\text{Rampe}$  für Reaktionen nach Typ 1 und  $[Ca^{2+}]_i/\text{Sprung}$  für Reaktionen nach Typ 2 sind in Abb. 6.3 C dargestellt.

## DISKUSSION

Abschätzung des Spannungsabfalls im Spalt nach Gleichung 2.4 ergibt mit  $A_J = 3000 \mu\text{m}^2$ ,  $d_J = 20 \text{ nm}$ ,  $c_{HFO_2} = 1.22 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für die applizierte Spannungsrampe  $V_J - V_E = 24 \text{ mV}$ . Mit  $A_M = 2A_J$  und Gleichung 2.6 ergibt sich daraus eine Depolarisation der adhärrierten Membran um  $\Delta V_{JM} = 12 \text{ mV}$ . Diese Depolarisation der adhärrierten Membran reicht aus, um LVA VDCCs in der adhärrierten Membran zu öffnen. Für die kapazitive Stimulation von HVA VDCCs ist sie zu schwach.

Bei  $Ca_v1.2$ -Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette hatten kleinere, inkrementale  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen nach kapazitiver Kanalöffnung nachgewiesen werden können, die nach Überschreiten einer Schwelle eine starke, nichtlineare  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme durch selbsterregte Kanalöffnung zur Folge hatten (siehe Punkt 5.3). Aufgrund dieser Vorkenntnisse aus dem Modellsystem wurde aus der obigen Messung folgender Mechanismus vorgeschlagen:

1. Einzelne Rampen öffneten spannungsabhängige Ionenkanäle in der adhärrierten Membran des Wachstumskegels.  $Ca^{2+}$ - und  $Na^{+}$ -Ionen strömten ein, eine kleine  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme wurde messbar. Mehrere solcher Rampen führten zu kontinuierlicher, inkrementaler  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme. Der Wert für  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Rampe}$  blieb gleich, solange die Anzahl der kapazitiv geöffneten VDCCs und die endogene Pufferung sich nicht änderten (Typ 1).
2. Waren genug Ionen eingeströmt, um die Schwelle zur Selbsterregung zu überschreiten, wurde ein Aktionspotential (AP) ausgelöst. In dessen Zuge öffneten auch VDCCs. Die Folge war eine sprunghafte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme (Typ 2). Die Amplitude der sprunghaften  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung während eines APs war für einen Wachstumskegel stets ähnlich. Sprünge halber oder doppelter Amplitude kamen nicht vor, so dass davon ausgegangen wurde, dass einem Sprung jeweils ein AP zugrunde lag.
3. War die Zahl der aktivierbaren VDCCs z.B. durch  $Ca^{2+}$ - und spannungsabhängige Inaktivierung nicht konstant oder änderte die Zelle als Antwort auf das erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  ihr endogenes Puffersystem, so wich die Steigung von dem charakteristischen Wert ab (Typ 3).
4.  $[Ca^{2+}]_i$  relaxierte nach der Stimulation innerhalb von 1 min. Erfolgte die nächste Stimulation nach einigen Sekunden, also vor der vollständigen Relaxation, so summierten sich die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen.



**Abbildung 6.3:** Kapazitive Stimulation von immotilen Wachstumskegeln. **A** Kapazitive Stimulation mit drei Serien gleicher Rampensteilheit ( $\Delta V_S/\Delta t = -2 \text{ V}/10 \text{ ms}$ ). Die Messpunkte sind schwarz. Die farbigen Linien sind Teil der Interpretation und sollen die Aufmerksamkeit auf die verschiedenen Reaktionstypen lenken. **B** Die erste der drei Stimulationsserien ist hier vergrößert und mit der zugehörigen Chipspannung  $V_S$  dargestellt. **C** Tabellarische Aufstellung der Zahlenwerte der in A gezeigten Stimulationsexperimente.

Bei Rampensteilheiten von bis zu  $-6 \text{ V}/10 \text{ ms}$  konnten die Reaktionen aller gemessenen Wachstumskegel auf kapazitive Stimulation in Typ 1, Typ 2 und Typ 3 klassifiziert werden.

Die Wachstumskegel konnten auf repetitive Stimulation mit einer schnellen Folge von

APs reagieren. Im Modellsystem HEK war immer nur eine selbsterregte Kanalöffnung gemessen worden. Der  $Ca^{2+}$ -Abtransport aus dem Zytosol in HEK-Zellen war nicht so effektiv wie der im Wachstumskegel.

Der vorgeschlagene Mechanismus impliziert einige Konsequenzen:

1. Die Zahl der Rampen, die nötig ist, um die Schwelle zu einem AP zu überschreiten, sollte abhängig sein von der Stärke der Depolarisation und damit von der Rampensteilheit (siehe Punkt 6.2).
2. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung durch kapazitive Kanalöffnung sollte nur an einem Wachstumskegel mit guter Kopplung messbar sein, die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung durch das AP nach Erreichen der Schwelle auch in benachbarten Bereichen, die selber nicht koppeln. Innerhalb einzelner Wachstumskegel wäre aufgrund des Spannungsprofils im Spalt (siehe Gleichung 2.3) eine ortsselektive Reaktion nach Typ 1 zu erwarten (siehe Punkt 6.3).
3. Eine Beteiligung von VDCCs an der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung nach kapazitiver Kanalöffnung, sowie an der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung während des APs sollte nachweisbar sein (siehe Punkt 6.4).

Diese Annahmen wurden in den nachfolgenden Experimenten getestet.

## 6.2 Einfluss der Rampensteilheit

Eine Erhöhung der Rampensteilheit hat nach Gleichung 2.4 einen größeren Spannungsabfall im Spalt  $V_J - V_E$  zur Folge. Das zieht eine stärkere Depolarisation  $\Delta V_{JM}$  der adhären Membran nach sich und lässt einen größeren  $Ca^{2+}$ -Influx pro Rampe erwarten. Die Schwelle zur Selbsterregung sollte bei Stimulation mit höherer Rampensteilheit also mit weniger Rampen zu erreichen sein.

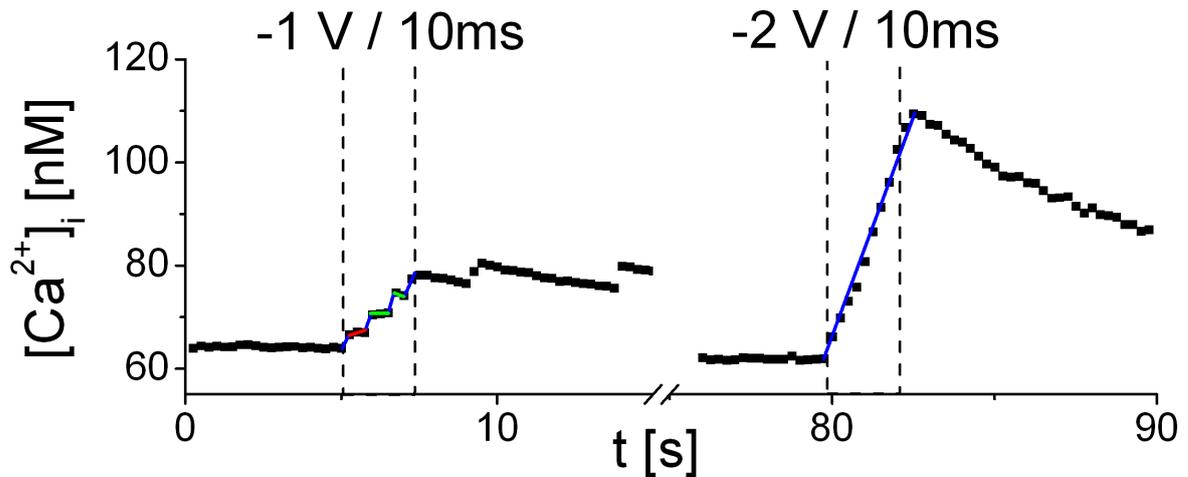
### EXPERIMENT

Abb. 6.4 zeigt  $[Ca^{2+}]_i$  eines Wachstumskegels bei Stimulation mit zwei Serien von je zehn Rampen. Die Rampendauer war in beiden Fällen  $\Delta t = 10$  ms, die Rampensteilheit war bei der zweiten Serie doppelt so groß wie bei der ersten. Jeweils die erste und die letzte Rampe der Serien sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Zwischen den beiden Stimulationsserien wurde eine Pause von 1 min eingehalten, so dass  $[Ca^{2+}]_i$  auf basale Werte relaxieren konnte.

Stimulation mit der ersten Serie ( $\Delta V_S/\Delta t = -1$  V/10 ms, links) führte zu einer  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme um 14 nM auf 78 nM. Es kamen alle Reaktionstypen vor:

Vier Sprünge nach Typ 2 (blau unterlegt,  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Sprung$  war 2.6 nM, 3.0 nM, 3.7 nM und 4.1 nM) ergaben eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme pro Sprung von durchschnittlich 3.4 nM. Außerdem wurde eine kontinuierliche Zunahme nach Typ 1 (rot unterlegt, die Steigung war  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 0.5$  nM/Rampe) und zwei Reaktionen nach Typ 3 (grün unterlegt) gemessen. Im Anschluss an die Stimulation zeigte der Wachstumskegel noch zwei spontane Reaktionen nach Typ 2 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/Sprung$  war im Mittel  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 4.5$  nM).

Die Stimulation mit einer Serie doppelter Rampensteilheit ( $\Delta V_S/\Delta t = -2$  V/10 ms, rechts) führte zu einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg um insgesamt 47 nM. Jede Rampe hatte eine etwa gleich hohe  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung von durchschnittlich  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 4.7$  nM zur Folge.



**Abbildung 6.4:** Abhängigkeit der  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalamplitude von der Rampensteilheit. Stimulation mit 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -1\text{ V}/10\text{ ms}$  (erste Serie, links) führte zu vier sprunghaften  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen nach Typ 2. Stimulation mit doppelter Rampensteilheit ( $-2\text{ V}/10\text{ ms}$ , zweite Serie, rechts) führte nach jeder Rampe zu einer sprunghaften  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung nach Typ 2.

Es wurden zwei weitere Experimente mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

## DISKUSSION

Die erste in Punkt 6.1 formulierte Annahme (siehe Punkt 6.1) wurde bestätigt: Bei Stimulation mit  $\Delta V_S/\Delta t = -1\text{ V}/10\text{ ms}$  löste nur die erste Rampe direkt einen Sprung nach Typ 2 aus. Danach waren zwei bis drei Rampen nötig, um einen Sprung auszulösen. Bei Stimulation mit doppelter Rampensteilheit ( $\Delta V_S/\Delta t = -2\text{ V}/10\text{ ms}$ ) injizierte jede einzelne Rampe genug Ladung, um den Wachstumskegel überschwellig zu depolarisieren, so dass auf jede Rampe ein AP folgte.

Die Konsequenz aus diesem Ergebnis ist eine vorsichtige Wahl der Rampensteilheit, wenn geringe Mengen  $Ca^{2+}$  in den Wachstumskegel injiziert werden sollen.

Die durchschnittliche Amplitude der Sprünge war bei Stimulation mit der höheren Rampensteilheit größer. Die spontanen Sprünge (siehe Abb. 6.4 links) zeigten auch die größere Amplitude. Möglicherweise änderte sich die Zahl der verfügbaren VDCCs im Verlauf der Messung.

## 6.3 Ortsselektivität kapazitiver Stimulation

### 6.3.1 Selektive Stimulation zweier Wachstumskegeln mit verschiedenen großen Kopplungsflächen

$[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme durch kapazitive Kanalöffnung sollte nur in Wachstumskegeln mit großer Kopplungsfläche nachzuweisen sein.  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen durch APs sollten auch in Bereichen schlechter Kopplung messbar sein.

Nach Gleichung 2.4 ist der Spannungsabfall proportional zur Kopplungsfläche. Wachstumskegel mit sehr kleiner Kopplungsfläche erfahren daher nur eine sehr kleine Änderung

ihrer Transmembranspannung. Für das Experiment wurde daher ein Neuron ausgewählt, aus dessen Axonstumpf zwei Wachstumskegel mit stark unterschiedlichen Flächen auswuchsen. Es wurde untersucht, inwieweit Unterschiede im  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal des großen und kleinen Wachstumskegel, sowie dem Axon nachweisbar waren.

### EXPERIMENT

Abb.6.5 A zeigt einen Axonstumpf mit zwei Wachstumskegeln, einem großen und einem kleineren. In drei rechteckigen Regionen wurde die  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort des großen Wachstumskegels (1), des kleinen Wachstumskegels (2) und des Axons (3) ausgewertet.

Stimuliert wurde mit einer Rampenserie à 10 Rampen ( $\Delta V_S/\Delta t = -2\text{ V}/10\text{ ms}$ ). Die Mittelwerte der jeweils zehn Messwerte vor jeder Stimulation lieferten jeweils die Werte für den basalen Calciumspiegel  $[Ca^{2+}]_{i\text{basal}}$  der jeweiligen Region. Die Werte für  $[Ca^{2+}]_{i\text{basal}}$  waren 46 nM bzw. 60 nM für den großen bzw. den kleinen Wachstumskegel, und 20 nM für das Axon. Alle Werte  $[Ca^{2+}]_i$  wurden auf  $[Ca^{2+}]_{i\text{basal}}$  normiert.  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  der drei ausgewerteten Regionen wurde in Abb. 6.5 B in Korrelation mit der Chipspannung gebracht und gegen die Zeit aufgetragen.

Die ersten fünf Rampen führten im großen Wachstumskegel (ROI 1) zu einer Reaktion nach Typ 1 (rot unterlegt),  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  war im Mittel  $0.5\text{ nM}/\text{Rampe}$ . Weder im kleinen Wachstumskegel (ROI 2) noch im Axon (ROI 3) war ein  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg als Reaktion auf die ersten fünf Rampen nachweisbar.

Die sechste Rampe führte im großen Wachstumskegel zu einem sprunghaften Anstieg nach Typ 2 (blau unterlegt) mit  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 7.2\text{ nM}$ . Zeitgleich reagierten der kleine Wachstumskegel und das Axon mit einem Sprung nach Typ 2 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 7.3\text{ nM}$ , bzw.  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 7.2\text{ nM}$ ).

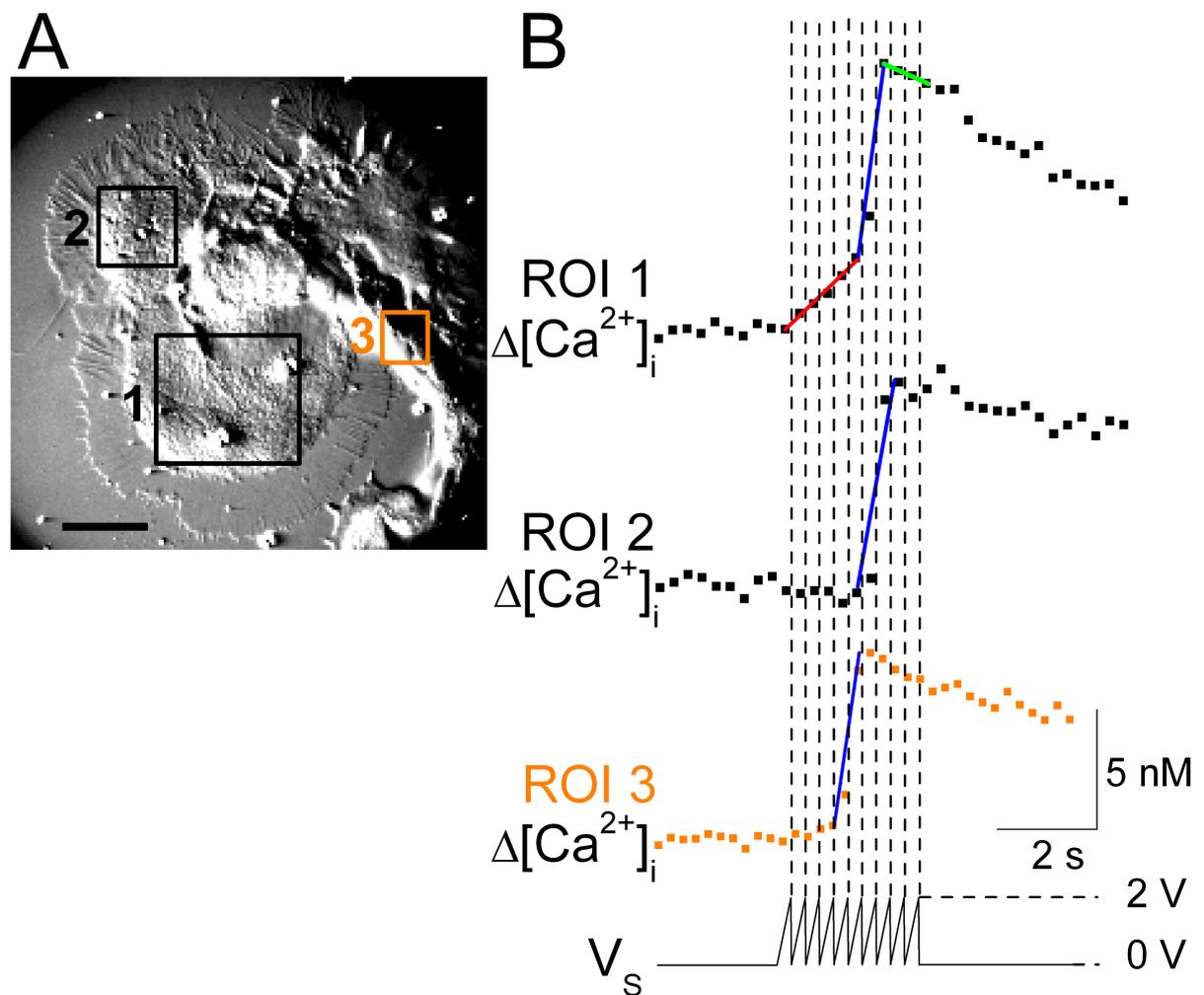
Die restlichen 4 Rampen hatten in allen Regionen eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Abnahme nach Typ 3 zur Folge (grün unterlegt).

### DISKUSSION

Kapazitive Kanalöffnung konnte nur in dem großflächigen Wachstumskegel nachgewiesen werden. Benachbarte Regionen wie der kleinere Wachstumskegel und das Axon reagierten erst, als im großen Wachstumskegel die Schwelle zur Selbsterregung überschritten war und ein AP ausgelöst wurde. Die Konsequenz daraus ist, dass in Wachstumskegel mit guter Kopplung eine lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung möglich ist, die erst bei der Ausbildung eines APs in benachbarte Bereiche propagiert. Im Hinblick auf die lokale Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in Wachstumskegeln ist dies eine wichtige Erkenntnis: Wird die Ausbildung von APs vermieden und werden Kondensatoren verwendet, die kleiner als der Wachstumskegel selbst sind, so ist eine lokale Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch kapazitive Stimulation möglich.

Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung als Folge des AP war in beiden Wachstumskegeln trotz unterschiedlicher Werte von  $[Ca^{2+}]_{i\text{basal}}$  sehr ähnlich. Das ließ auf eine vergleichbare Anzahl von VDCCs und eine vergleichbare endogener Pufferung schließen. Die Amplitude des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals im Axon war ebenfalls sehr ähnlich. Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen des Axons unterscheidet sich aber stark von dem der Wachstumskegel, so dass Rückschlüsse auf Anzahl der VDCCs und Eigenschaften des Puffersystems schwierig sind.

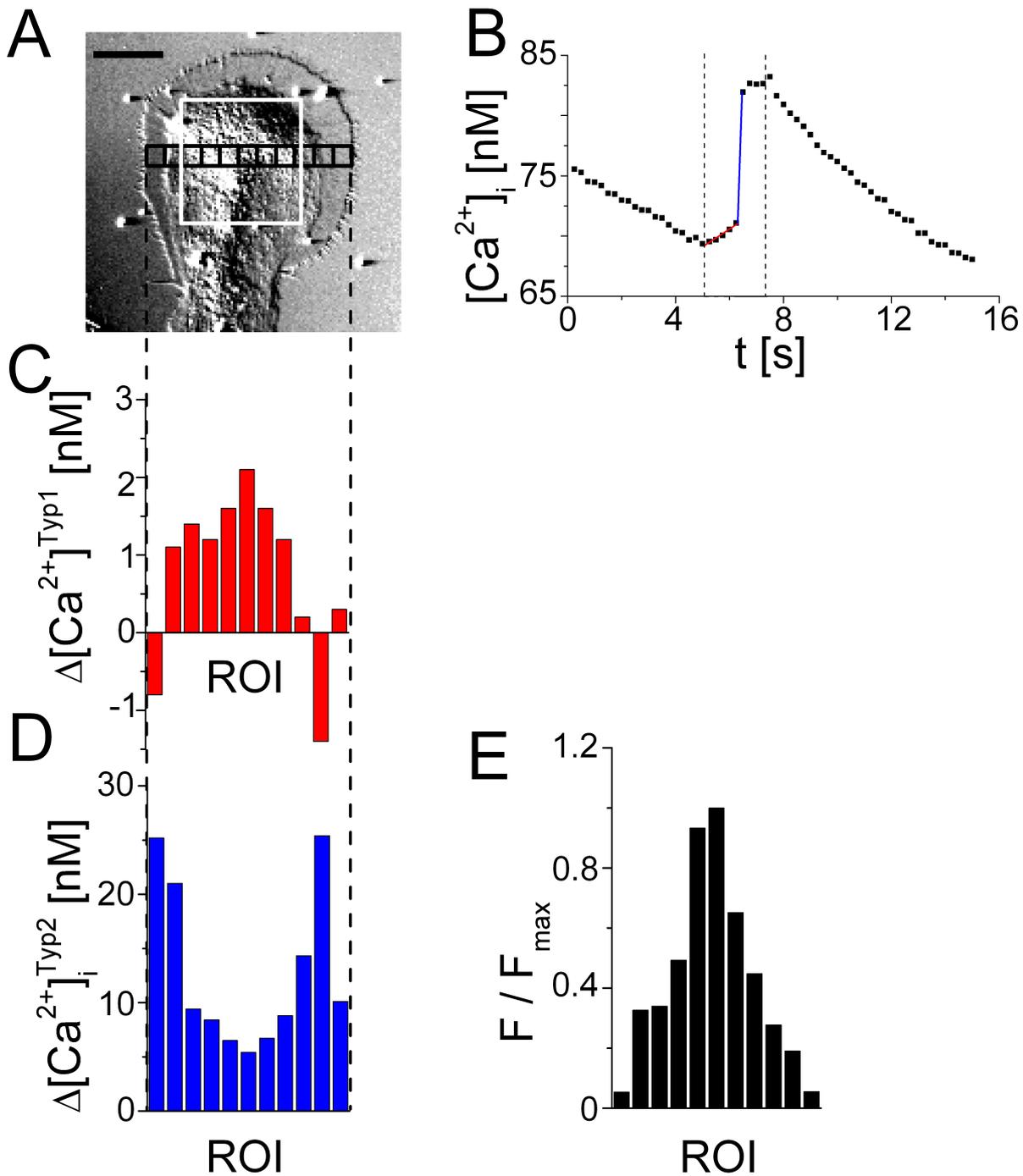
Die letzten 4 Rampen hatten in keinem Bereich  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung zur Folge (Typ 3).



**Abbildung 6.5:** Ortsselektivität kapazitiver Stimulation. **A** DIC-Aufnahme eines Axonstumpfes mit einem großflächigen und einem kleineren Wachstumskegel. Die rechteckigen Kästen bezeichnen die ROIs, aus deren mittleren Fluoreszenzintensitäten  $[Ca^{2+}]_i$  ermittelt wurde. Größenbalken,  $20\ \mu\text{m}$ . **B**  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale der drei ROIs, korreliert mit der zugehörigen Chipspannung  $V_S$ . Die farbigen Hilfslinien verdeutlichen das ortstselektive Auftreten von Reaktionstyp 1 (rot) und 2 (blau).

### 6.3.2 Signalprofil innerhalb einzelner Wachstumskegel

Der hypothetische Mechanismus aus Punkt 6.1 unterstellt, dass  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen nach Typ 1 durch kapazitive Kanalöffnung und  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen nach Typ 2 durch Kanalöffnung während APs generiert wurden. Im Hinblick auf die Wachstumskontrolle von Wachstumskegeln war es interessant, zu überprüfen, welcher Reaktionstyp welche Bereiche des Wachstumskegels betraf. Nach Gleichung 2.3 ist eine ortstselektive Reaktion nach Typ 1 zu erwarten, wenn mit Rampensteilheiten stimuliert wird, die den Schwellwert für Kanalöffnung nur in der Mitte des Spannungsprofils überschreiten. Eine Reaktion nach Typ 2 sollte nicht mehr vom Spannungsprofil im Spalt abhängen.



**Abbildung 6.6:** Signalprofile nach kapazitiv ausgelöstem Reaktionstyp 1 und 2. **A** DIC-Aufnahme eines Wachstumskegels. Die ROI für die Ermittlung der generellen Reaktion des Wachstumskegels auf kapazitive Stimulation ist in weiß eingezeichnet, die ROIs für die Ermittlung der Profile sind in schwarz eingezeichnet. Größenbalken, 20  $\mu\text{m}$ . **B** Generelle  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort des Wachstumskegels auf Stimulation mit einer Serie à 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -2 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . **C** Signalprofil von Reaktionstyp 1. **D** Signalprofil von Reaktionstyp 2. **E** Beladungsprofil des Wachstumskegels. Die relative Fluoreszenzintensität bei 360 nm Anregung wurde für jede schwarze ROI aufgetragen und aus Platzgründen auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt.

## EXPERIMENT

Abb. 6.6 A zeigt das DIC-Bild eines nahezu symmetrischen Wachstumskegels. In der großen weißen ROI wurde die generelle Reaktion des Wachstumskegels auf die Stimulation ermittelt (Abb. 6.6 B), die kleineren, schwarzen ROIs dienen der Ermittlung der Signalprofile (Abb. 6.6 C-E).

$[Ca^{2+}]_i$  in der weißen ROI änderte sich während der Stimulation mit einer Serie à 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -2\text{ V}/10\text{ ms}$ . Die erste und letzte Rampe der Serie sind mit gestrichelten Strichen angedeutet (Abb. 6.6 B).

Bis nach der 5. Rampe erfolgte eine Reaktion nach Typ 1 (mit roter Hilfslinie unterlegt), nach der 6. Rampe folgte einem Sprung nach Typ 2 (mit blauer Hilfslinie unterlegt). Das Axon des Wachstumskegels zeigte eine sprunghafte Reaktion nach der 6. Rampe, davor war keine  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung messbar (nicht gezeigt).

Für das  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil von Typ 1 (Abb. 6.6 C) wurde  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  nach der fünften Rampe in jeder kleinen schwarzen ROI einzeln ausgewertet. Für das  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil von Typ 2 (Abb. 6.6 D) wurde  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  des Sprungs nach der sechsten Rampe in jeder kleinen schwarzen ROI einzeln ausgewertet. Das Signalprofil von Typ 1 zeigt ein Maximum in der Mitte des Wachstumskegels, das Signalprofil von Typ 2 hingegen zeigt zwei Maxima an den Seiten. Abb. 6.6 E zeigt das Profil der relativen Fluoreszenzintensitäten der kleinen ROIs bei 360 nm Anregung als Maß für die Dicke des Wachstumskegels.

Es wurden drei weitere Experimente mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

## DISKUSSION

Das Signalprofil von Typ 1 zeigt an den Rändern eine negative, in der Mitte eine positive  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung mit dem Maximum etwa in der Mitte des Wachstumskegels. Die negative  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung resultiert aus der fallenden Basislinie der ausgewerteten Messung (siehe Abb. 6.6 B).

Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung war in der Mitte des Wachstumskegels am stärksten. Dafür gab es zwei mögliche Ursachen:

1. Die VDCCs sind gleichmäßig verteilt, der Spannungsabfall im Spalt öffnet aber nur die Kanäle in der Mitte.
2. Die VDCCs sind nicht gleichmäßig über den Wachstumskegel verteilt, sondern vor allem in der Mitte lokalisiert.

Nach Gleichung 2.3 bildet sich bei einer Spannungsrampe ein Spannungsprofil mit Maximum in der Mitte des Spaltes aus. Ein  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil mit einem Maximum in der Mitte ergibt sich also direkt aus dem Stimulationsmechanismus, wenn die Spannungsrampen so flach gewählt sind, dass nur das Maximum des generierten Spannungsprofils die adhärierte Membran über die Schwelle für Kanalöffnung depolarisiert. Eine Ungleichverteilung der Kanäle muss nicht angenommen werden, um das Profil zu erklären.

In Anhang A.2 ist gezeigt, dass elektroporierende Stimulation, abhängig von der Rampensteilheit, ein vergleichbares  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil wie in Abb. 6.6 C generieren kann (siehe Abb. A.2 D).

Bei gleichmäßiger Verteilung der VDCCs und unter der Annahme uniformer  $Ca^{2+}$ -Pufferung und Sequestrierung konnte das  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil während Typ 2 wie folgt

erklärt werden: Bei der Ausbildung eines APs nach überschwelliger intrazellulärer Depolarisation durch größere Mengen eingeströmten Kationen ( $Ca^{2+}$  und  $Na^+$ ) öffnen alle Kanäle des Wachstumskegels. Das  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil richtet sich nach dem Membran/Volumen-Verhältnis der analysierten Bereiche, so dass in der dickeren zentralen Domäne ein schwächeres  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal gemessen wird, als in der dünnschichtigen peripheren Domäne.

Eine frühe Studie an *Helisoma* Wachstumskegeln stützt diese These [14]: Das räumliche  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil über neu ausgebildete Wachstumskegel zeigte sein Maximum bei Aktionspotentialen in der Mitte. Der Lamellipod erfährt keine  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung. In gereiften Wachstumskegeln veränderte sich das Signalprofil und zeigte nun Maxima im Bereich des Lamellipod. Die Autoren führten dies auf eine Umverteilung der Kanäle und auf das Membran/Volumen-Verhältnis zurück.

Die Interpretation der Reaktionstypen 1 und 2 als kapazitive Kanalöffnung und Kanalöffnung durch APs ist also weiter bestätigt.

## 6.4 Beteiligung von VDCCs an der Reaktion auf kapazitive Stimulation

*Lymnea* Neurone exprimieren verschiedene Typen von VDCCs (siehe Tabelle 6.1). In physiologischer Lösung waren neben  $Ca^{2+}$ - auch  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ionen als Ladungsträger verfügbar, so dass bei der Wirkung kapazitiver Stimulation auch spannungsabhängige  $Na^+$ - und  $K^+$ - Kanäle beteiligt sein könnten [109], oder aber unspezifische Poren nach Elektroporation.

Aussagen über Beteiligung und Identität von transmembranen Strömen über spannungsabhängige Kanäle waren mit pharmakologischen Mitteln möglich. Gängige VDCC-Toxine wie omega-conotoxin GVIA (N-Typ) oder omega-conotoxin IVA (P/Q-Typ) wirken in Schnecken oft nicht [109, 20, 61].  $\omega$ -Conotoxine aus molluscivoren Conidae wie  $\omega$ -TXVII,  $\omega$ -MrVIA/B und PnVIA/B sind wirksam gegen VDCCs und  $Na^+$ -Kanäle in *Lymnea stagnalis* (siehe Tabelle 6.1), konnten aber nicht beschafft werden. Als Blocker wurden daher das Dihydropyridin Nitrendipine und der unspezifische ionische Blocker  $Cd^{2+}$  eingesetzt, als Agonist das Benzolpyrrol FPL64176.

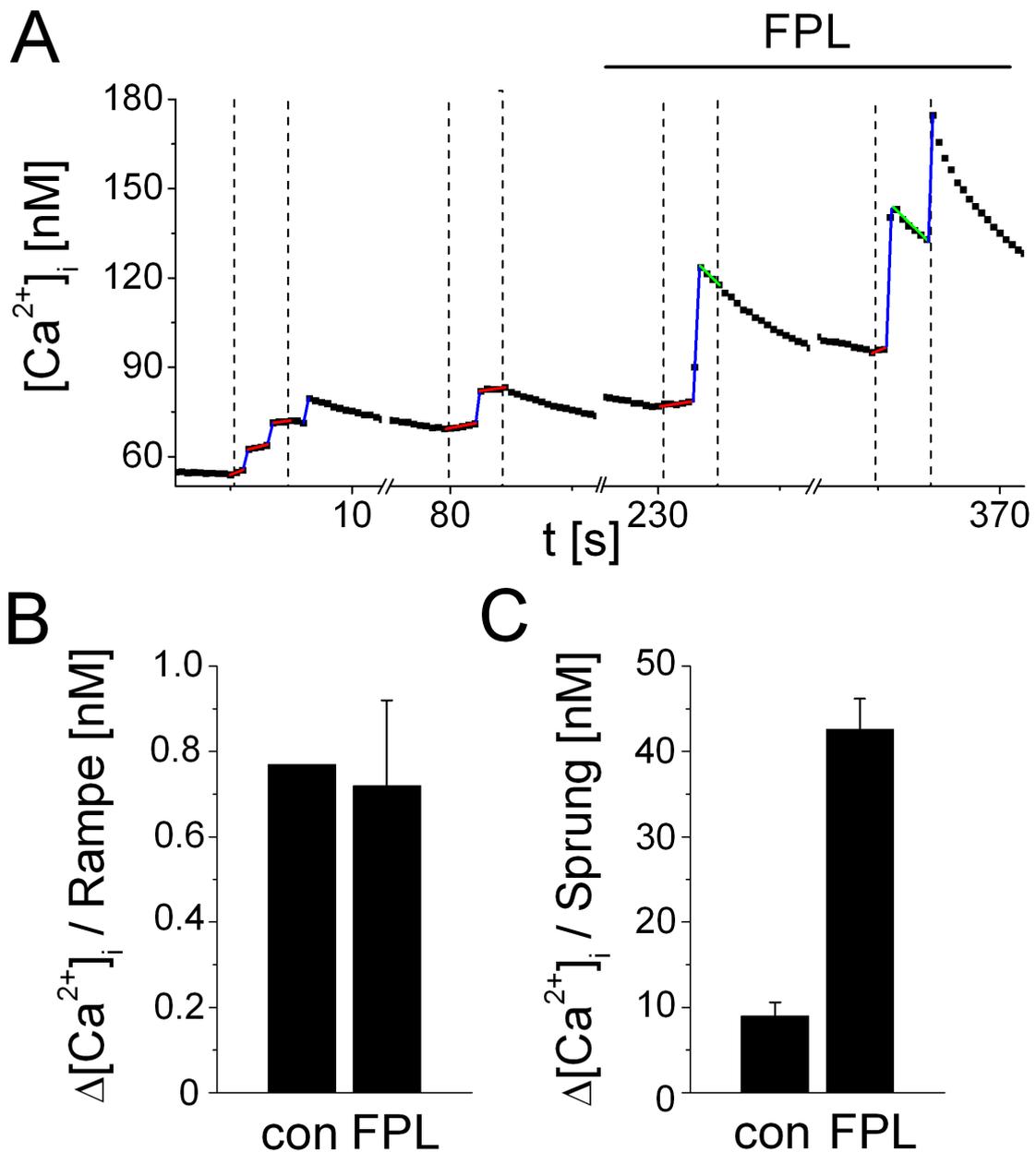
### 6.4.1 FPL

Der Agonist FPL64176 hatte im Modellsystem der  $Ca_v1.2$ -Zellen den  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung wesentlich verstärkt. Neben der verstärkenden Wirkung von FPL auf den Strom durch L-Typ VDCCs von Wirbeltieren [65] ist ebenfalls eine hemmende Wirkung auf N-Typ VDCCs bekannt [69]. In Schneckenneuronen war eine Wirkung bislang nicht untersucht.

## EXPERIMENTE

Es wurden ein typischer Wachstumskegel mit allen drei Reaktionstypen für die Darstellung in Abb. 6.7 ausgesucht. Außerdem wurde ein Wachstumskegel ausgesucht, der nur Reaktionen nach Typ 1 zeigte (Abb. 6.8). Die Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -2\text{ V}/10\text{ ms}$  in Abb. 6.7 und  $\Delta V_S/\Delta t = -6\text{ V}/10\text{ ms}$  in Abb. 6.8. Die gestrichelten Linien deuten jeweils den Zeitpunkt der ersten und der letzten Rampe einer Serie an. Die Reaktionen des

Wachstumskegels nach Typ 1 (kapazitive Kanalöffnung) sind mit roten Hilfslinien betont, Reaktionen nach Typ 2 (APs) mit blauen und Reaktionen nach Typ 3 mit grünen Hilfslinien. Die Zugabe von FPL ( $2\ \mu\text{M}$ ) ist jeweils mit einem Querbalken angedeutet. Zwischen den gezeigten Stimulationsserien wurde jeweils mehrmals stimuliert, wobei stets 1 min zwischen den Messungen gewartet wurde. Dennoch ergab sich insgesamt ein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

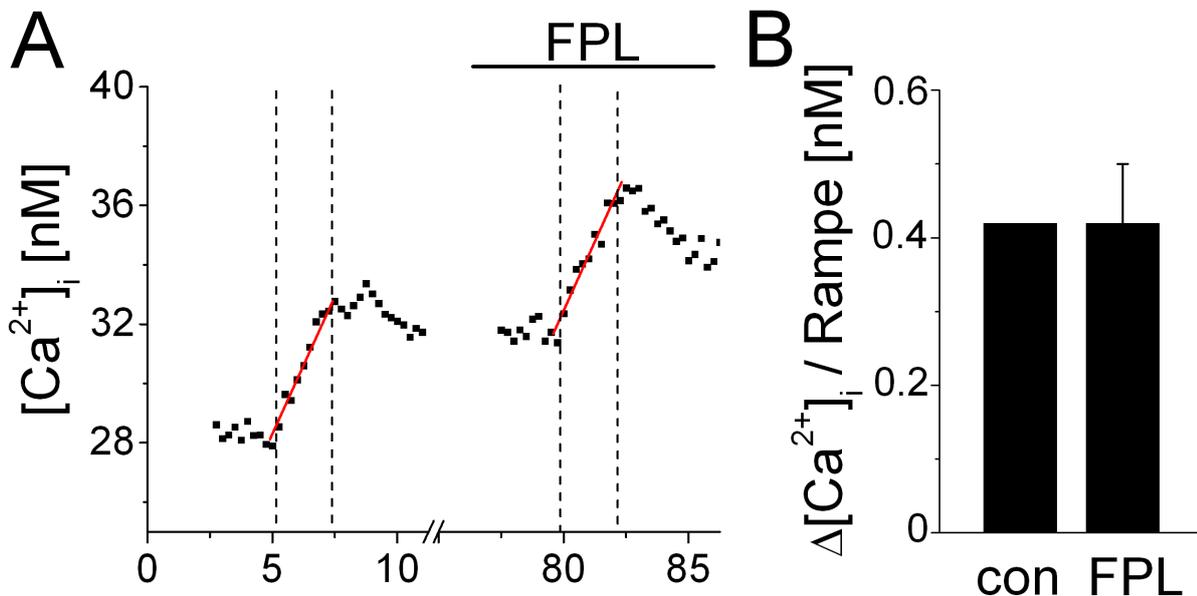


**Abbildung 6.7:** Wirkung von FPL auf Reaktionstyp 1 und 2 nach kapazitiver Stimulation. **A** Reaktion von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  des Wachstumskegels auf Stimulation mit zwei Serien mit  $\Delta V_S / \Delta t = -2\text{V}/10\text{ms}$  vor und nach Zugabe von FPL ( $2\ \mu\text{M}$ ). Der Wachstumskegel zeigte mit und ohne FPL Reaktionen nach Typ 1 und Typ 2. **B** Mittelwerte der Steigung  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i / \text{Rampe}$  für alle durchgeführten Messungen vor (con,  $n = 2$ ) und nach (FPL,  $n = 3$ ) Zugabe von FPL. **C** Mittelwerte der Amplituden der Sprünge nach Typ 2 vor (con,  $n = 6$ ) und nach (FPL,  $n = 11$ ) Zugabe von FPL.

Für den Wachstumskegel in Abb. 6.7 wurde die Steigung  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe$  für alle durchgeführten Messungen vor ( $n = 2$ ) und nach Zugabe von FPL ( $n = 3$ ) ausgewertet und der jeweilige Mittelwert in Abb. 6.7 B dargestellt. Ein Fehlerbalken für die Messung ohne FPL findet sich wegen der geringen Stichprobenanzahl nicht. Ohne FPL war die Steigung im Mittel  $0.77 \text{ nM/Rampe}$  ( $n = 2$ ), mit FPL war sie  $0.72 \text{ nM/Rampe} \pm 0.2 \text{ nM}$  ( $n = 3$ ). Die Amplituden der Sprünge nach Typ 2 wurden vor und nach Zugabe von FPL ausgewertet und sind in Abb. 6.7 C dargestellt. Die Amplitude der APs nahm um mehr als Faktor 4 zu: ohne FPL war die Amplitude  $9 \text{ nM} \pm 0.6 \text{ nM}$  ( $n = 6$ ), mit FPL war sie  $42.6 \text{ nM} \pm 1.1 \text{ nM}$  ( $n = 11$ ).

Der Wachstumskegel in Abb. 6.8 zeigte vor und nach Zugabe von FPL ausschließlich Reaktionen nach Typ 1 (siehe Abb. 6.8 A). Die Steigung  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe$  wurde vor ( $0.42 \text{ nM/Rampe}$ ,  $n = 2$ ) und nach Zugabe von FPL ( $0.42 \text{ nM/Rampe} \pm 0.08 \text{ nM}$ ,  $n = 4$ ) ausgewertet und in Abb. 6.8 B dargestellt. Auch hier fehlt vor Zugabe von FPL wegen  $n = 2$  der Fehlerbalken.

Es wurden zwei weitere Experimente mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.



**Abbildung 6.8:** Wirkung von FPL auf Reaktionstyp 1 nach kapazitiver Stimulation. **A**  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion eines Wachstumskegels bei Stimulation mit je einer Serie ( $\Delta V_S/\Delta t = -6 \text{ V}/10 \text{ ms}$ ) vor (links) und einer nach (rechts) Zugabe von FPL ( $2 \mu\text{M}$ ). Der Wachstumskegel zeigte ausschließlich Reaktionen nach Typ 1. **B** Mittelwerte der Steigung  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe$  für alle durchgeführten Messungen vor (con,  $n = 2$ ) und nach (FPL,  $n = 4$ ) Zugabe von FPL.

## DISKUSSION

FPL wirkte bei kapazitiver Stimulation auf Reaktionstyp 2. Die Amplitude der Sprünge war nach Zugabe von FPL um mehr als Faktor 5 größer. Es traten keine doppelten oder halben Amplitude auf, so dass wahrscheinlich nur ein AP jedem sprunghaften  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal nach Typ 2 zugrunde lag. Daraus war zu schließen, dass FPL eine Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms während der APs bewirkte, nicht eine höhere Anzahl von APs pro sprunghaftem  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal nach Typ 2.

In beiden Experimenten zeigte FPL keine Wirkung auf Reaktionstyp 1.

Aus den Ergebnissen konnten folgende Aussagen formuliert werden:

1. FPL wirkte in Schneckenneuronen agonistisch auf mindestens einen Typ von VDCCs.
2. Der FPL-empfindliche VDCC-Typ öffnete bei APs
3. Der FPL-empfindliche VDCC-Typ wurde nicht kapazitiv durch die Stimulationsrampen geöffnet.

Es liegt nahe zu vermuten, dass es sich bei dem FPL-sensitiven Kanaltyp auch in Schnecken um den L-Typ handelt. Ob das wirklich der Fall war und ob eine antagonistische Wirkung auf einen anderen VDCC-Typ die agonistische überlagerte, wurde nicht weiter untersucht.

Die Tatsache, dass keine FPL-sensitiven VDCCs an der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung vom Typ 1 beteiligt waren, konnte grundsätzlich zwei Ursachen haben:

1. Bei Reaktionstyp 1 wurden andere, nicht FPL-sensitive VDCCs kapazitiv geöffnet.
2. Die kapazitive Stimulation öffnete entgegen der Arbeitshypothese keine VDCCs, sondern unspezifische Poren durch Elektroporation.

Elektroporation war nach Abschätzungen der Spannung im Spalt mit der Gleichung 2.4 auch bei der großen Fläche der Wachstumskegel unwahrscheinlich. Um das zu überprüfen, wurden Kanalblocker angewendet.

### 6.4.2 $Cd^{2+}$

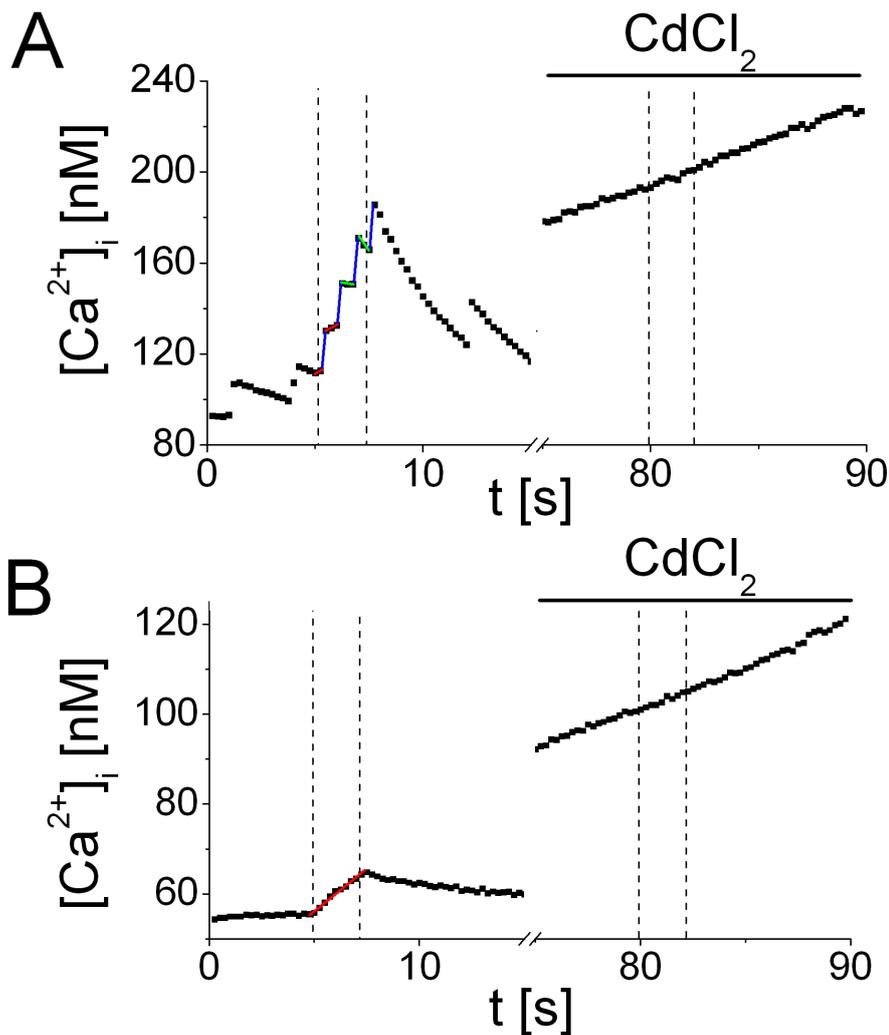
Um alle HVA VDCCs der Wachstumskegel zu blocken, wurde der unspezifische VDCC Blocker  $Cd^{2+}$  eingesetzt. Seine Wirkung auf HVA VDCCs in Schneckenneuronen gilt als gesichert [62].

## EXPERIMENTE

In Abb. 6.9 ist  $[Ca^{2+}]_i$  während der kapazitiven Stimulation für zwei typische Experimente dargestellt.

Die Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t$  war  $-4\text{ V}/10\text{ ms}$  in Abb. 6.9 A und  $-2\text{ V}/10\text{ ms}$  in Abb. 6.9 B. Die gestrichelten Linien in Abb. 6.9 A und B deuten wieder die jeweils erste und letzte Rampe einer Serie an. Typ 1 ist wieder rot, Typ 2 blau und Typ 3 grün unterlegt. Links ist jeweils ein Kontrollexperiment, rechts ein Experiment mit  $CdCl_2$  ( $200\text{ }\mu\text{M}$ ) zu sehen.

Der Wachstumskegel in Abb. 6.9 A zeigte vor Zugabe von  $CdCl_2$  alle drei Reaktionstypen. Der Wachstumskegel in Abb. 6.9 B zeigte ausschließlich Reaktionen nach Typ 1. Zwischen den Stimulationsserien und nach Zugabe von  $CdCl_2$  wurde jeweils mindestens eine Minute gewartet. Es wurde jeweils vor und nach Zugabe von  $CdCl_2$  mehrmals stimuliert und das Ergebnis war immer dasselbe:  $[Ca^{2+}]_i$  stieg nach  $CdCl_2$ -Zugabe stetig an und der Effekt kapazitive Stimulation auf  $[Ca^{2+}]_i$  war vollständig verschwunden.



**Abbildung 6.9:** Wirkung von  $CdCl_2$  auf Reaktionstyp 1 und 2 nach kapazitiver Stimulation. **A**  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort eines Wachstumskegels auf Stimulation mit einer Serie vor (links) und nach (rechts) Zugabe von  $CdCl_2$  ( $200 \mu\text{M}$ ). Die Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -4 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . **B**  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion eines anderen Wachstumskegels bei Stimulation mit einer Serie vor (links) und einer Serie nach (rechts) Zugabe von  $CdCl_2$  ( $200 \mu\text{M}$ ). Die Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -2 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . Der Wachstumskegel zeigte ausschließlich Reaktionen nach Typ 1.

Es wurde ein weiteres Experiment mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

## DISKUSSION

$CdCl_2$  blockte Reaktionstyp 1 und 2. HVA VDCCs waren also an beiden Reaktionstypen beteiligt waren. Der zugrunde liegende Mechanismus war also Öffnung von VDCCs und nicht Elektroporation.

Die Messung war unter typischen Stimulationsbedingungen und an einem Wachstumskegel mit typischer Adhäsionsfläche durchgeführt worden. Es wurden 3 weitere Experimente mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

Bei den eingesetzten Konzentrationen von  $Cd^{2+}$  war eine Wirkung auf HVA VDCCs gesichert. Die Wirkung von  $Cd^{2+}$  auf andere spannungsabhängige Kanäle hängt von der eingesetzten Konzentration und vom untersuchten Organismus ab: in *Helix* zeigt sich

der T-Typ LVA VDCCs sensitiv gegenüber  $10\ \mu\text{M}\ \text{Cd}^{2+}$ , in *Helisoma* und zerebralen Riesenneuronen aus *Lymnea stagnalis* ist derselbe Kanaltyp insensitiv gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  Konzentrationen von etwa  $100\ \mu\text{M}$  ([62] bzw. [109]). Daher war eine Wirkung von  $\text{Cd}^{2+}$  auf LVA VDCCs in unseren Wachstumskegeln zwar unwahrscheinlich, aber nicht ganz auszuschließen. Spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle könnten auch in geringem Maß betroffen sein [60].

Der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nach  $\text{Cd}^{2+}$ -Zugabe ist für verschiedene Zelltypen beschrieben [21, 36, 131], darunter auch für Schneckenneuronen [79]. Die Wirkung von  $\text{Cd}^{2+}$  auf  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zurückgeführt, vermittelt möglicherweise über Metallrezeptoren.

Ob die Zelle trotz  $\text{Cd}^{2+}$  APs generierte, die ohne Beteiligung von HVA VDCCs stattfanden, kann über Fura-2 Fluoreszenzmessung nicht überprüft werden.

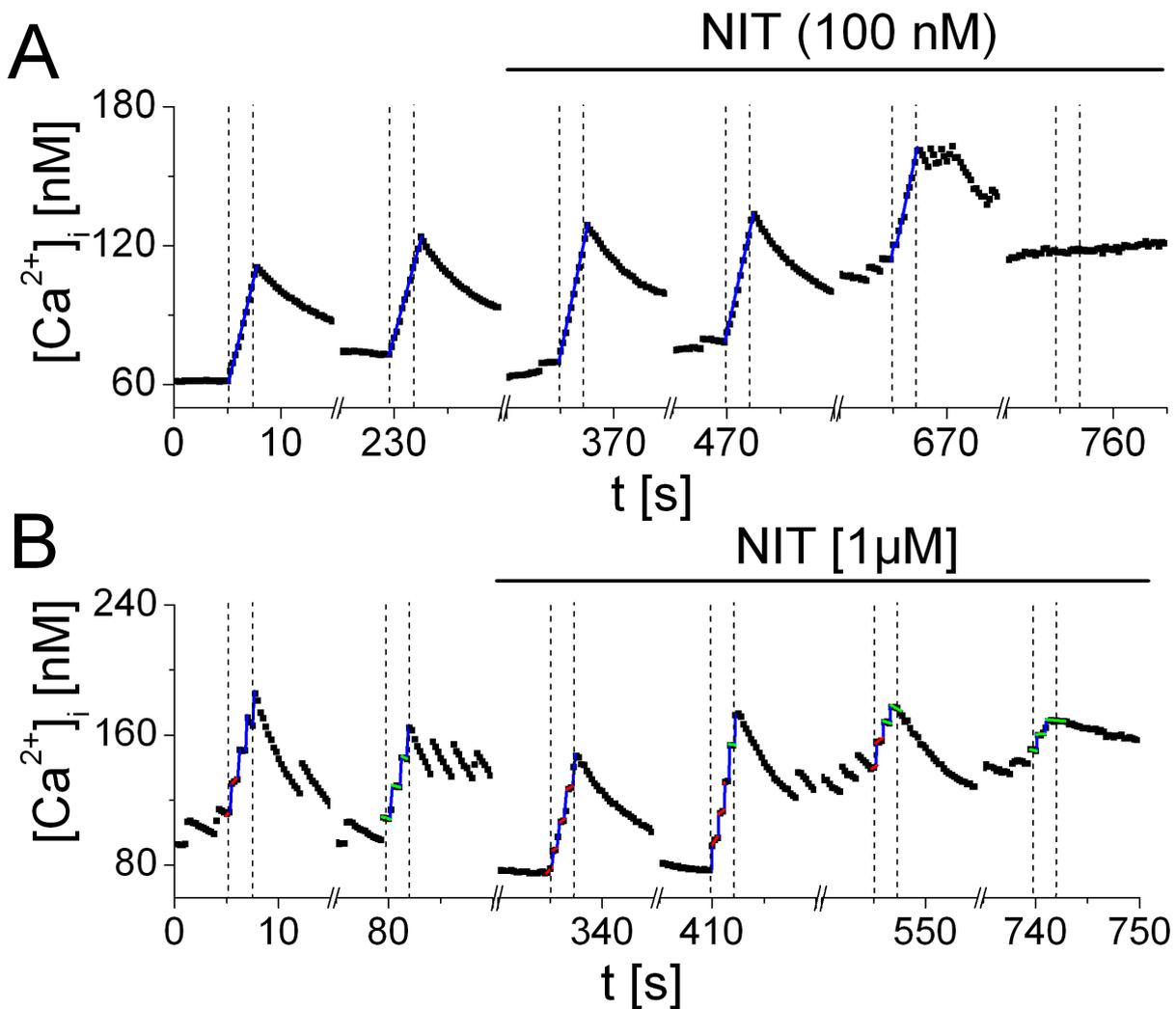
### 6.4.3 Nitrendipine

Das Dihydropyridin-Derivat Nitrendipin (NIT) wirkt in Wirbeltieren spezifisch auf L-Typ VDCCs. Seine Wirkung in Schneckenneuronen ist für Caudodorsale Zellen (CDCs) in *Lymnea stagnalis* beschrieben [62]. Die Wirkung von NIT auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung im Wachstumskegel bei kapazitiver Stimulation wurde überprüft.

## EXPERIMENTE

Abb. 6.10 A und B zeigen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Aufnahmen für zwei typische Wachstumskegel bei kapazitiver Stimulation vor und nach Zugabe von NIT.

Der erste Wachstumskegel (Abb. 6.10 A) wurde mit Serien von jeweils zehn Rampen ( $\Delta V_S/\Delta t = -2\ \text{V}/10\ \text{ms}$ ) stimuliert. Die erste und letzte Rampe ist jeweils mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Vor der Zugabe von NIT wurde mit 4 Serien stimuliert, die dritte und vierte Serie erfolgten im Abstand von 3.5 min zueinander und sind in Abb. 6.10 A gezeigt. Die Stimulation führte nach jeder Rampe zu einem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Sprung nach Typ 2 (Klassifizierung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen in Typen 1, 2 und 3 siehe 6.1). Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung war im Mittel  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{Serie} = 43\ \text{nM} \pm 3\ \text{nM}$  ( $n = 4$ ) für die vier Serien vor NIT-Zugabe. Nach der vierten Serie wurde NIT ( $100\ \text{nM}$ ) zugegeben und erneut mit 4 Stimulationsserien stimuliert. Alle vier Serien sind in Abb. 6.10 A gezeigt. Die erste wurde 2 min, die zweite 3 min, die dritte 6 min und die vierte 7 min nach Zugabe von NIT aufgenommen. NIT im Bad ist mit einem Querbalken über den letzten vier Serien angedeutet. 2 min und 3 min nach Zugabe von NIT zeigte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  noch eine starke Reaktion auf kapazitive Stimulation. Jede Rampe führte zu einem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Sprung nach Reaktionstyp 2 mit  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{Serie} = 59\ \text{nM}$  nach 2 min und  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{Serie} = 55\ \text{nM}$  nach 3 min. 6 min nach NIT-Zugabe erfolgte auch noch eine vergleichbar starke  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Reaktion wie zuvor ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{Serie} = 47\ \text{nM}$ ), doch es schien nicht mehr nach jeder Rampe ein  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Sprung nach Typ 2 zu erfolgen. Die letzte Stimulationsserie erfolgte 7 min nach NIT-Zugabe. Hier war keine  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Reaktion auf kapazitive Stimulation mehr festzustellen.

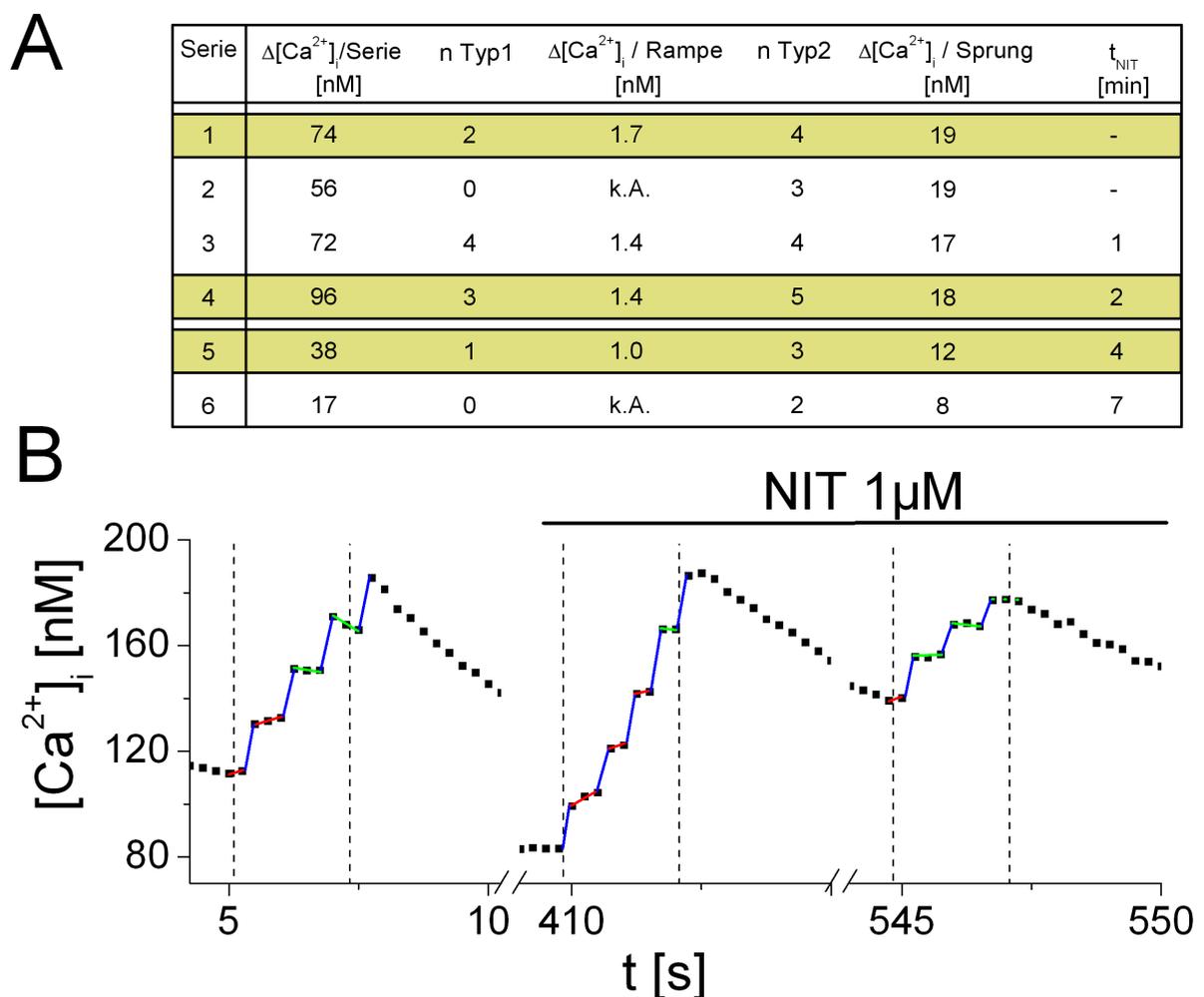


**Abbildung 6.10:** Wirkung von NIT auf die Reaktion nach kapazitiver Stimulation. **A** und **B**  $[Ca^{2+}]_i$ -Aufnahmen für zwei typische Wachstumskegel bei kapazitiver Stimulation mit zwei Serien vor und vier Serien nach Zugabe von NIT. Die Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t$  war  $-2V/10ms$  (A) und  $-4V/10ms$  (B). NIT-Konzentration war 100 nM (A) bzw. 1  $\mu M$  (B). NIT im Bad ist mit einem Querbalken angedeutet, erste und letzte Rampe einer Serie sind jeweils mit gestrichelten Linien angedeutet.

Ein zweiter Wachstumskegel wurde mit Serien der Rampensteilheit  $-4V/10ms$  stimuliert (Abb. 6.10 B, erste und letzte Rampe sind jeweils mit einer gestrichelten Linie angedeutet). Vor der Zugabe von NIT wurde mit 3 Serien stimuliert, die zweite und dritte erfolgten im Abstand von 1 min und sind in Abb. 6.10 B gezeigt. Die Stimulation führte zu  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktionen nach allen 3 Typen. Die gesamte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung für die ersten Serien ohne NIT war im Mittel  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 73 nM \pm 10 nM$  ( $n = 3$ ). Nach der dritten Serie wurde NIT (1  $\mu M$ ) zugegeben und mit weiteren 4 Serien stimuliert. Alle 4 Aufnahmen sind in Abb. 6.10 B gezeigt. Die erste wurde 1 min, die zweite 2 min, die dritte 4 min und die vierte 7 min nach Zugabe von NIT aufgenommen. NIT im Bad ist mit einem Querbalken über den letzten vier Serien angedeutet. 1 min und 2 min nach Zugabe von NIT zeigte  $[Ca^{2+}]_i$  eine starke Reaktion auf kapazitive Stimulation mit  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 72 nM$  nach 1 min und  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 96 nM$  nach 2 min. 4 min nach NIT-Zugabe war die  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion mit  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 38 nM$  verringert. Die letzte Stimulationsserie nach 7 min

zeigte eine noch weiter abgeschwächte  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion von  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 17$  nM.

Die Messung in Abb. 6.10 B wurde herangezogen, die Wirkung von NIT auf Typ 1 und Typ 2 genauer zu betrachten. Abb. 6.11 A zeigt die einzelnen Zahlenwerte für die gesamte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung pro Serie  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie$ , die Anzahl von Reaktionstyp 1 pro Serie (n Typ 1), die charakteristische Steigung von Reaktionstyp 1 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe$ ), die Anzahl von Reaktionstyp 2 pro Serie (n Typ 2) und die Amplitude der Sprünge nach Typ 2 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/Sprung$ ). Die letzte Spalte gibt eine Übersicht über die Zeit, die der Wachstumskegel vor Einsetzen der Stimulation dem Antagonisten NIT ( $1 \mu M$ ) ausgesetzt war ( $t_{NIT}$ ). Die Zahlenwerte einer Serie vor und der Serien 2 min und 4 min nach NIT-Zugabe sind gelb hervorgehoben. Zur Veranschaulichung der Auswertung zeigt Abb. 6.11 B exemplarisch diese drei Serien vergrößert und mit farbigen Hilfslinien zur Klassifizierung der Reaktionstypen (Typ 1: rot, Typ 2: blau) unterlegt.



**Abbildung 6.11:** **A** Tabelle mit den Zahlenwerten für das Stimulationsbeispiel aus B. Aufgeführt ist die gesamte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung pro Serie  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie$ , die Anzahl von Reaktionstyp 1 pro Serie (n Typ 1), die charakteristische Steigung von Reaktionstyp 1 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe$ ), die Anzahl von Reaktionstyp 2 pro Serie (n Typ 2), die Amplitude der Sprünge nach Typ 2 ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/Sprung$ ) und die Zeit, der NIT-Exposition ( $t_{NIT}$ ). Die Zahlenwerte einer Serie vor und zweier Serien nach NIT-Zugabe sind gelb hervorgehoben. In **B** sind zur Veranschaulichung dieser drei Serien vergrößert und mit farbigen Hilfslinien unterlegt (Typ 1: rot, Typ 2: blau) dargestellt.

1 min und 2 min nach Zugabe von NIT war die  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion in keiner der untersuchten Kategorien verringert. Die Steigungen von Typ 1 und die Amplituden der Sprünge waren etwa gleich. Die gesamte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung ergab sich maßgeblich aus der Zahl der ausgelösten APs ( $n$  Typ 2). 4 min nach Zugabe von NIT war die gesamte  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung deutlich reduziert ( $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 38$  nM). Hauptursache war die verringerte Amplitude der Sprünge nach Typ 2. 7 min nach Zugabe von NIT war die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung mit  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 17$  nM weiter reduziert. Sowohl die Amplitude, wie auch die Anzahl der ausgelösten APs waren hier verringert.

Die Zahlenwerte der Steigungen von Reaktionstyp 1 waren durch die geringe Anzahl verwertbarer Reaktionen bei den Serien nach 4 min und 7 min nicht stichhaltig und führten zu keiner konkreten Aussage. Dennoch ist ein Trend zu geringeren Steigungen nach Zugabe von NIT zu beobachten.

Ein weiterer Wachstumskegel (Messung nicht gezeigt) zeigte ausschließlich Reaktionen nach Typ 1. Die Zugabe von NIT (100 nM) hatte über 5 min keinen Effekt auf die Steigung (vor NIT:  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe = 0.73$  nM,  $n = 2$ , nach NIT:  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Serie = 0.86$  nM  $\pm$  0.2 nM,  $n = 4$ ).

Es wurde ein weiteres Experiment mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

## DISKUSSION

Die NIT-Zugabe führte nach einigen Minuten zu einer reduzierten oder vollständig geblockten Reaktion auf kapazitive Stimulation (Abb. 6.10). Die Analyse der Wirkung von NIT auf Typ 1 und 2 (Klassifizierung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen in Typen 1, 2 und 3 siehe 6.1) zeigte, dass NIT seine hemmende Wirkung v.a. durch eine geringere Anzahl und eine kleinere Amplitude von Reaktionen nach Typ 2 herbeiführte (siehe Abb. 6.11 A). Das lässt Schlussfolgerungen für die Beteiligung von L-Typ VDCCs an den einzelnen Reaktionstypen zu:

NIT reduzierte die Amplitude von Typ 2. Eine Beteiligung von L-Typ VDCCs an Typ 2 konnte also nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem vorgeschlagenen Signalmechanismus für Typ 2: Bei  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach einem AP sollten alle VDCCs des Wachstumskegels beteiligt sein.

Eine konkrete Aussage zur Wirkung von NIT auf Typ 1 war nicht möglich. Die Auswertung der Reaktionen nach Typ 1 in 6.11 A führte zu keinem Ergebnis. Das zusätzliche Experiment zu Reaktionstyp 1 zeigte über 5 min keinen Effekt auf NIT. Eine Wirkung wäre ev. erst nach Minuten eingetreten, so dass hier keine definitive Aussage getroffen werden kann. Da die Anzahl der ausgelösten Reaktionen nach Typ 2 reduziert waren, ließ sich spekulieren, dass auch die kapazitive Kanalöffnung NIT-sensitiv war. So würden in Anwesenheit von NIT weniger VDCCs kapazitiv geöffnet, so dass mehr Rampen nötig wären, um ein AP auszulösen.

Eine Beteiligung von L-Typ VDCCs konnte für Reaktionstyp 2 gezeigt werden, nicht aber für Reaktionstyp 1. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit dem Agonisten FPL überein. Obwohl die klassische pharmakologische Charakterisierung von VDCCs in Mollusken nicht immer haltbar ist (siehe Punkt 1.4), weisen unsere Beobachtungen der Wirkung von NIT und FPL darauf hin, dass in immotilen Wachstumskegeln von A-Cluster-Neuronen DHP-sensitive L-Typ VDCCs exprimiert sind und dass diese Kanäle an der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung nach Typ 2 bei kapazitiver Stimulation beteiligt sind.

### Verzögerte Reaktion von NIT

In CDCs von *Lymnea stagnalis* wurde für die antagonistische Wirkung von NIT auf L-Typ VDCCs ein  $ED_{50}$  von  $\approx 100$  nM angegeben [61]. In einem Review der Autoren aus demselben Jahr wird auf eine unveröffentlichte Beobachtung von Kits und Lodder hingewiesen: der  $ED_{50}$ -Wert ist stark abhängig von der Zeit der Exposition [62]. In diesem Zusammenhang erscheint es schlüssig, dass NIT die  $[Ca^{2+}]_i$ -Reaktion der immotilen Wachstumskegel auf kapazitive Stimulation hemmte, die Wirkung aber erst nach einigen Minuten eintrat.

Während bei 100 nM NIT nach 6 min Exposition noch kein Effekt zu verzeichnen war (Abb. 6.10 A) war die Reaktion bei 1  $\mu$ M NIT bereits nach 4 min Exposition reduziert. Beim Einsatz micromolarer Konzentrationen von NIT ist allerdings zu berücksichtigen, dass in CDCs von *Lymnea stagnalis* in diesem Konzentrationsbereich auch N- bzw. P/Q-Typ Kanäle geblockt werden [61]. Dennoch hemmten 1  $\mu$ M NIT im zweiten Beispiel die Reaktion aber nicht vollständig: Auch nach 7 min reagierte  $[Ca^{2+}]_i$  noch schwach auf die Stimulation. 100 nM NIT blockten die Reaktion im ersten Beispiel vollständig. Die auftretenden Unterschiede könnten auf unterschiedliche Kanalexpression der Wachstumskegel zurückzuführen gewesen sein. Da nicht identifizierte Neurone, sondern A-Cluster-Neurone verwendet wurden, ist ein unterschiedliches Expressionsmuster der Wachstumskegel durchaus denkbar. Nach dieser Interpretation müsste bei dem in Abb. 6.11 A gezeigten Wachstumskegel der L-Typ der vorherrschende VDCC gewesen sein, während im zweiten Beispiel (Abb. 6.11 B) noch andere LVA und HVA VDCCs exprimiert waren, die trotz der hohen Konzentration von NIT nicht gehemmt wurden.

## 6.5 Zusammenfassung

Alle obigen Ergebnisse, sowie einige ergänzende Experimente im Anhang A (siehe Punkt A.2) unterstützen den unter Punkt 6.1 formulierten Signalmechanismus. Zusammenfassend wurden daher folgende Aussagen formuliert:

1. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen durch kapazitive Stimulation großflächiger Wachstumskegel sind vollständig hemmbar durch den HVA VDCC Blocker  $Cd^{2+}$ . Die kapazitive Stimulation führt bei geeigneter Rampensteilheit also zur kapazitiven Öffnung von VDCCs, nicht zu Elektroporation.
2. Die eingeströmten Ionen depolarisieren den Wachstumskegel, so dass die repetitive kapazitive Kanalöffnung zur Ausbildung eines APs führen kann.
3. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung pro Stimulationsserie setzt sich aus kapazitiver Kanalöffnung und  $Ca^{2+}$ -Einstrom während der APs zusammen. Eine Beteiligung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern kann zwar nicht ausgeschlossen werden, es wurden allerdings keine Hinweise darauf gefunden.
4. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen pro Stimulationsserie sind akkumulierbar, wenn innerhalb von Sekunden mehrere Stimulationsserien erfolgen.
5. FPL-sensitive Kanäle werden nicht kapazitiv geöffnet, öffnen aber während der APs.
6. NIT-sensitive Kanäle öffnen während der APs.

Im Folgenden wird Reaktionstyp 1 als  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung gewertet und Reaktionstyp 2 als  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach einem kapazitiv stimulierten AP. Spontane  $[Ca^{2+}]_i$ -Peaks werden nach den Ergebnissen aus Punkt 6.3.2 als spontane APs gewertet.

# Kapitel 7

## Wirkung kapazitiver Stimulation auf die Morphologie von Wachstumskegeln

$[Ca^{2+}]_i$  spielt eine wichtige Rolle für die Motilität von Wachstumskegeln: Um die Motilität eines Neuriten zu erlauben, muss der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel des Wachstumskegels in einem optimalen Bereich liegen. Bei zu wenig  $Ca^{2+}$  kann er nicht wachsen, bei zu viel  $Ca^{2+}$  stoppt er das Wachstum [55, 11, 13, 48, 39, 56].

Viele Signalstoffe üben ihre Wirkung auf die Dynamik von Wachstumskegeln über  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale aus (siehe Punkt 1.2). Einige repulsive Stoffen führen starke  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung herbei, die morphologische Veränderungen des Zytoskeletts und den Kollaps einleiten (siehe Punkt 1.6). Dieser geht in Wachstumskegeln von Schneckenneuronen mit dem Verlust der Aktinrippen aus dem Lamellipod und der Verlängerung der Filopodien einher [140].

Aktivierung von VDCCs in immotilen Wachstumskegeln von Schneckenneuronen durch Depolarisation mit extrazellulärer Applikation von KCl, führt zu einer starken  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung im Wachstumskegel ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 130 \text{ nM}$  [128]). Die Folge ist eine Umstrukturierung des Zytoskeletts. Diese zeigt die Charakteristika von Wachstumskegel-Kollaps, vergleichbar mit der Reaktion auf Schreckstoffe [128, 140] (siehe dazu Punkt 1.6).

Mit kapazitiver Stimulation konnte den  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel von Wachstumskegeln durch kapazitive Kanalöffnung und APs angehoben werden (siehe Punkt 6), ohne die ionische Zusammensetzung der Badlösung zu ändern. Um starke Erhöhungen von  $[Ca^{2+}]_i$  zu erreichen, wurde mit Stimulationsblöcken stimuliert, die jeweils aus mehreren Stimulationsserien von jeweils 10 einzelnen Rampen bestanden. Es sollte überprüft werden, ob die resultierenden  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen die für den Kollaps typischen morphologischen Veränderungen zur Folge hatten.

Um die Morphologie der Wachstumskegel zu überwachen wurde *Differential Interference Contrast* (DIC) Mikroskopie eingesetzt. Gleichzeitige Aufnahme von Fura-2 Fluoreszenz-Messungen und DIC-Bildern war nicht möglich. Grundsätzlich gab es zwei Möglichkeiten für die Durchführung der Experimente:

1. DIC-Bilderserien wurden während der Stimulation aufgenommen. Anschließend wurde während erneuter Stimulation eine Fura-2-Messung aufgenommen. Durch sie sollte kontrolliert werden, ob die kapazitive Stimulation der gewählten Rampensteilheit bei dem individuellen Wachstumskegel grundsätzlich  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen erreichte. Der Schwerpunkt lag bei diesen Experimenten auf dem zeitlichen Ablauf der morphologischen Veränderungen.

2. Vor der Stimulation wurde eine DIC-Bildaufnahme gemacht. Während der gesamten Stimulation wurde  $[Ca^{2+}]_i$  über Fura-2 Messungen überwacht. Im Anschluss an die Stimulation wurde eine zweite DIC-Bildaufnahme gemacht, um etwaige morphologische Veränderungen zu visualisieren. Der Schwerpunkt lag hier auf den  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen, die den Morphologie-Änderungen zugrunde lagen.

## 7.1 Kapazitive Stimulation führt zu Veränderungen der Morphologie

Das Auftreten morphologischer Veränderungen während der kapazitiven Stimulation wurde mit der seriellen Aufnahme von DIC-Bildern überprüft (Aufnahmetyp 1, siehe Punkt 7). Anschließend an die Bilderserie wurde die Reaktion von  $[Ca^{2+}]_i$  auf kapazitive Stimulation fluoreszenzoptisch überprüft.

Um  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen wurde nach den Erkenntnissen aus Kapitel 6 mit mehreren Serien à 10 Rampen stimuliert. Zwischen den Serien wurde jeweils eine Pause von nur 15 s eingehalten, so dass die  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung nach einer Serie nicht vollständig relaxierte und die Effekte der Rampenserien sich summierten.

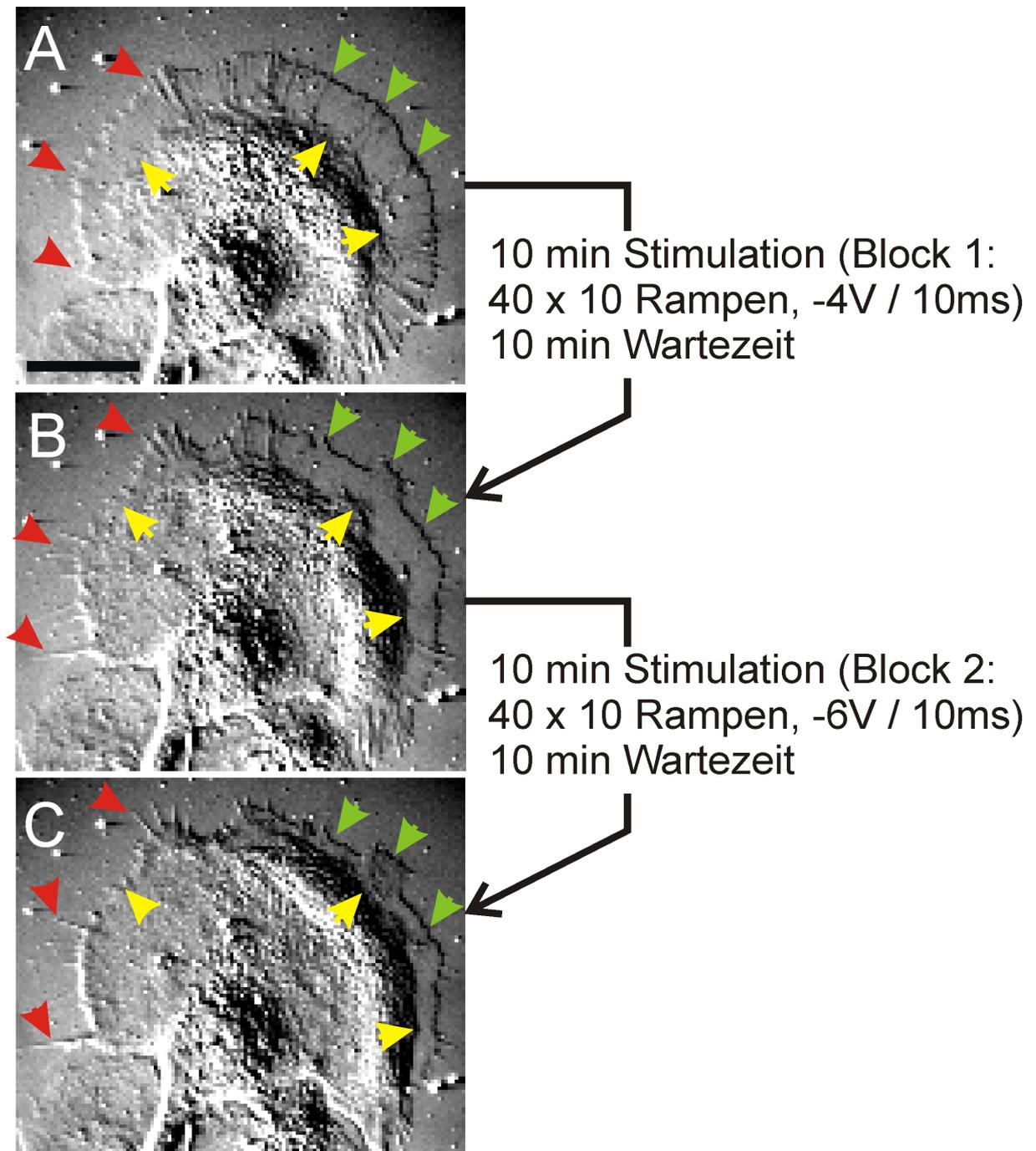
### EXPERIMENT

Abb. 7.1 A zeigen das DIC-Bild eines Wachstumskegels vor der Stimulation. Der Wachstumskegel befand sich im Stadium der Maturation und zeigte die typische Form: eine erhabene zentrale Domäne, in die das Axon mündete, eine periphere Domäne mit den Aktinrippen, die den Lamellipod durchspannten und in den sehr kurzen Filopodien mündeten. Diese Charakteristika änderten sich während der 15 min Beobachtungsphase vor der Stimulation nicht.

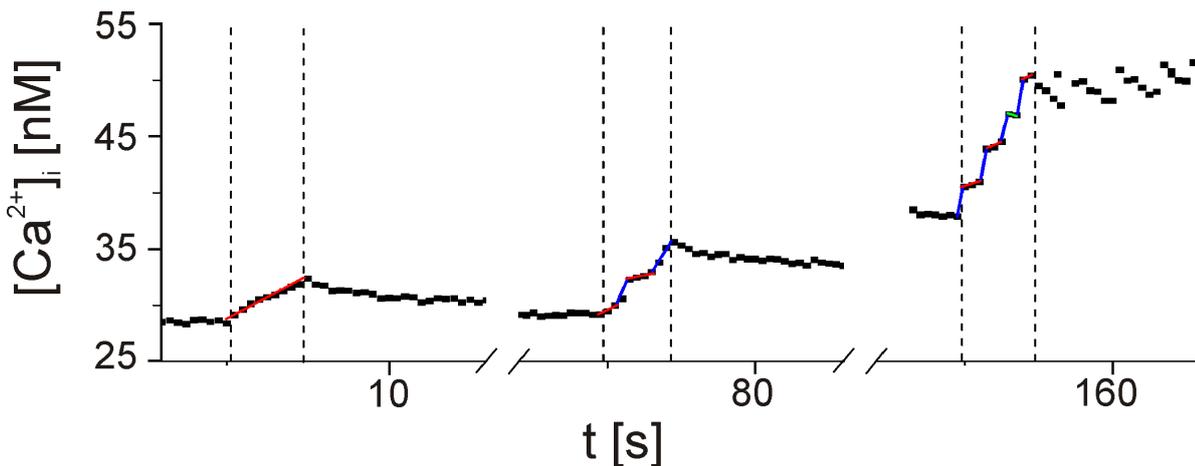
Anschließend wurde der Wachstumskegel mit dem ersten 10-minütigen Stimulationsblock stimuliert. Während des Stimulationsblockes erfolgte alle 15 s eine Stimulationsserie mit jeweils 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -4 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . Während und nach dem Stimulationsblock wurde alle 15 s ein DIC-Bild aufgenommen. Die DIC-Aufnahme 10 min nach dem ersten Stimulationsblock wurde für die Darstellung in Abb. 7.1 B ausgewählt, da hier deutliche morphologische Änderungen zu erkennen waren: Die **Filopodien** auf der linken Seite des Wachstumskegels waren stark **verlängert** (rote Pfeile). Der Lamellipod war auf derselben Seite vollständig zurückgebildet (gelber Pfeil). Auf der rechten Seite war der **Lamellipod verschmälert** (gelbe Pfeile) und viele **Aktinrippen** waren **zurückgebildet** (grüne Pfeile).

Anschließend folgte der zweite 10-minütigen Stimulationsblock mit weiteren 40 Stimulationsserien mit jeweils 10 Rampen der Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -6 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . Während und nach dem Stimulationsblock wurde alle 15 s ein DIC-Bild aufgenommen. Abb. 7.1 C zeigt die DIC-Aufnahme 10 min nach dem zweiten Stimulationsblock. Auf der linken Seite zeigten sich die Filopodien noch weiter verlängert (rote Pfeile). Der Lamellipod war auf der rechten Seite noch weiter verschmälert (gelbe Pfeile) und die Aktinrippen waren vollständig zurückgebildet (grüne Pfeile).

Zur Kontrolle, ob die kapazitive Stimulation des Wachstumskegels grundsätzlich eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung bewirkte, wurde im Anschluss an die Aufnahme der DIC-Bildserie eine ratiometrische Fura-2 Messungen durchgeführt (siehe Abb. 7.2).  $[Ca^{2+}]_i$  wurde während



**Abbildung 7.1:** Wirkung kapazitiver Stimulation auf die Morphologie eines Wachstumskegels. Die grünen Pfeile machen auf die Aktinrippen aufmerksam, die gelben Pfeile auf die Breite des Lamellipod und die roten Pfeile auf die kurzen Filopodien. **A** DIC-Aufnahme des Wachstumskegels vor Einsatz der Stimulation. **B** Derselbe Wachstumskegel 10 min nach Stimulation mit den ersten 40 Serien ( $\dot{\Delta}V_S/\Delta t = -4\text{V}/10\text{ms}$ ) und **C** 10 min nach Stimulation mit den zweiten 40 Serien ( $\dot{\Delta}V_S/\Delta t = -6\text{V}/10\text{ms}$ ). Größenbalken, 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 7.2:**  $[Ca^{2+}]_i$  des Wachstumskegels während drei Stimulationsserien mit jeweils 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -4\text{ V}/10\text{ ms}$  im Abstand von jeweils 1 min.

der Stimulation mit drei Serien mit jeweils 10 Rampen in einer rechteckigen ROI über der zentralen Domäne des Wachstumskegels ermittelt (siehe Punkt 3.5.5) und gegen die Zeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien deuten den Zeitpunkt der jeweils ersten und letzten Rampe einer Serie an. Die Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -4\text{ V}/10\text{ ms}$ . Reaktionen nach Typ 1 wurden mit roten Hilfslinien unterlegt, Reaktionen nach Typ 2 mit blauen und Reaktionen nach Typ 3 mit grünen (Einordnung und Beschreibung der Reaktionstypen siehe Punkt 6.1).

Die erste Stimulationsserie führte insgesamt zu  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Serie} = 3.8\text{ nM}$ . Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme erfolgte kontinuierlich nach Typ 1 mit dem Mittelwert  $\Delta[Ca^{2+}]_i/\text{Rampe} = 0.38\text{ nM}$ . Nach 10 s war der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel von 29 nM vor der Stimulation auf 31 nM erhöht.

Nach etwa 1 min Pause führte die zweite Serie zu einer nicht kontinuierlichen Zunahme von insgesamt  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 6.6\text{ nM}$ . Nach 10 s war der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel von 29 nM vor der Stimulation auf 34 nM erhöht.

Nach einer weiteren Pause von etwa 1 min war  $[Ca^{2+}]_i$  auf 38 nM erhöht, vermutlich durch spontane Aktivität in der einminütigen Messpause. Die dritte Serie führte zu einer nicht kontinuierlichen Zunahme von diesmal insgesamt  $\Delta[Ca^{2+}]_i = 12.6\text{ nM}$ . Der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel blieb anschließend für mindestens 10 s auf Werte von etwa 50 nM erhöht und der Wachstumskegel zeigte spontane Aktivität mit einer Frequenz von 0.7 Hz.

## DISKUSSION

10 min nach dem ersten Block kapazitiver Stimulation beobachteten waren folgende morphologische Veränderungen des Wachstumskegels zu beobachten:

1. Verlängerung der Filopodien
2. Verkürzung der Aktinrippen
3. Verschmälerung des Lamellipod

All diese Punkte sind für immotile Wachstumskegel von *Helisoma trivolvis* nach  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Depolarisation mit extrazellulärem KCl beschrieben worden [128]. Die

fluoreszenzoptische Messung im Anschluss (Abb. 7.2) zeigte, dass die Stimulation grundsätzlich zu  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen führen konnte, wobei Typ 1 und Typ 2 (siehe Punkt 6.1) auftraten. Nach Stimulation mit mehreren Serien traten außerdem spontane APs auf (Abb. 7.2). Auch wenn die Fluoreszenzmessung nicht simultan mit den DIC-Aufnahmen stattfand, war es wahrscheinlich, dass auch die Stimulation während der DIC-Bilderserie  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen nach Typ 1 und 2 herbeigeführt hatte, und dass diese zu den morphologischen Veränderungen führten.

Die Verlängerung der Filopodien war 10 min nach dem ersten Stimulationsblock abgeschlossen, während sich ein vollständiger Verlust der Aktinrippen 10 min erst nach dem zweiten Stimulationsblock zeigte. Dieser zeitliche Verlauf der morphologischen Änderungen ist dem in *Helisoma*-Wachstumskegeln nach Applikation von KCl ähnlich [128].

Die fluoreszenzoptische Messung im Anschluss zeigte, dass die kapazitive Stimulation während der DIC-Aufnahmen den  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel des Wachstumskegels nur reversibel angehoben hatte. Zum Zeitpunkt der Fura-2-Messung (10 min nach dem zweiten Stimulationsblock) zeigte der Wachstumskegel mit 29 nM sehr geringe  $[Ca^{2+}]_i$ -Werte. Im Vergleich zur Depolarisation durch Applikation von KCl in *Helisoma*-Wachstumskegeln ( $\Delta[Ca^{2+}]_i = 130$  nM [128]) waren die durch kapazitive Stimulation hier in *Lymnea*-Wachstumskegeln erzeugten  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen ohnehin eher gering. Dennoch ist repetitive Stimulation in der Lage, die morphologische Umstrukturierung auszulösen. Bei dem vorliegenden Experiment unklar, ob  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen nach Typ 1 oder Typ 2 zugrunde lagen.

## 7.2 Morphologieänderung durch Aktionspotentiale

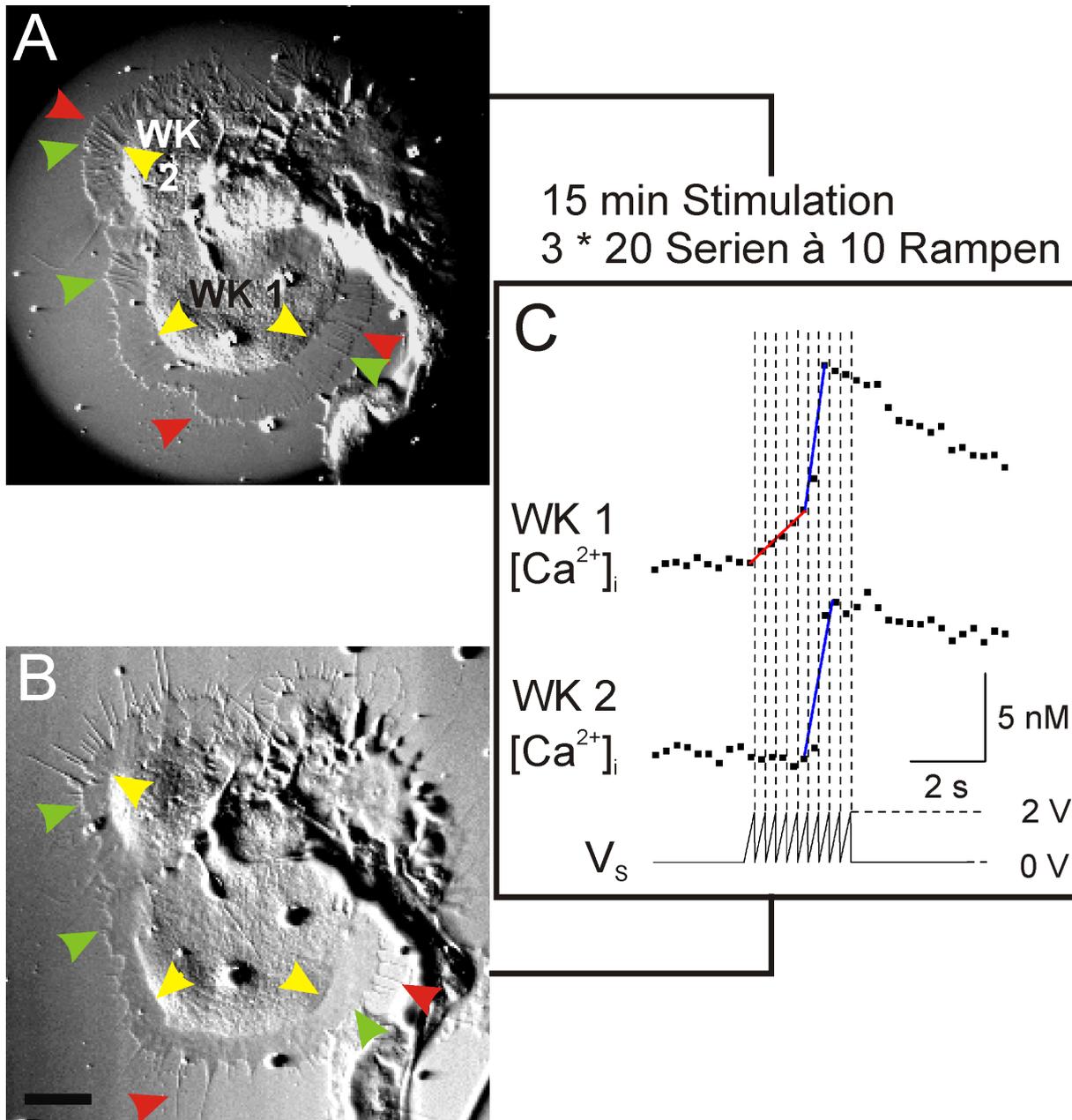
Die Ortsselektivität kapazitiver Stimulation (siehe Punkt 6.3.1) sollte nun helfen, den Typ der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung, die der morphologischen Veränderung zugrunde lag, zu bestimmen. Hierfür wurden Neurone ausgesucht, aus deren Axonstümpfen je zwei verschieden große Wachstumskegel ausgewachsen waren. Wenn der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch APs die Morphologieänderung einleiteten, so musste sich die Umformung in beiden Wachstumskegeln zeigen, auch wenn kapazitive Kanalöffnung nur im größeren Wachstumskegel stattfand.

### EXPERIMENTE

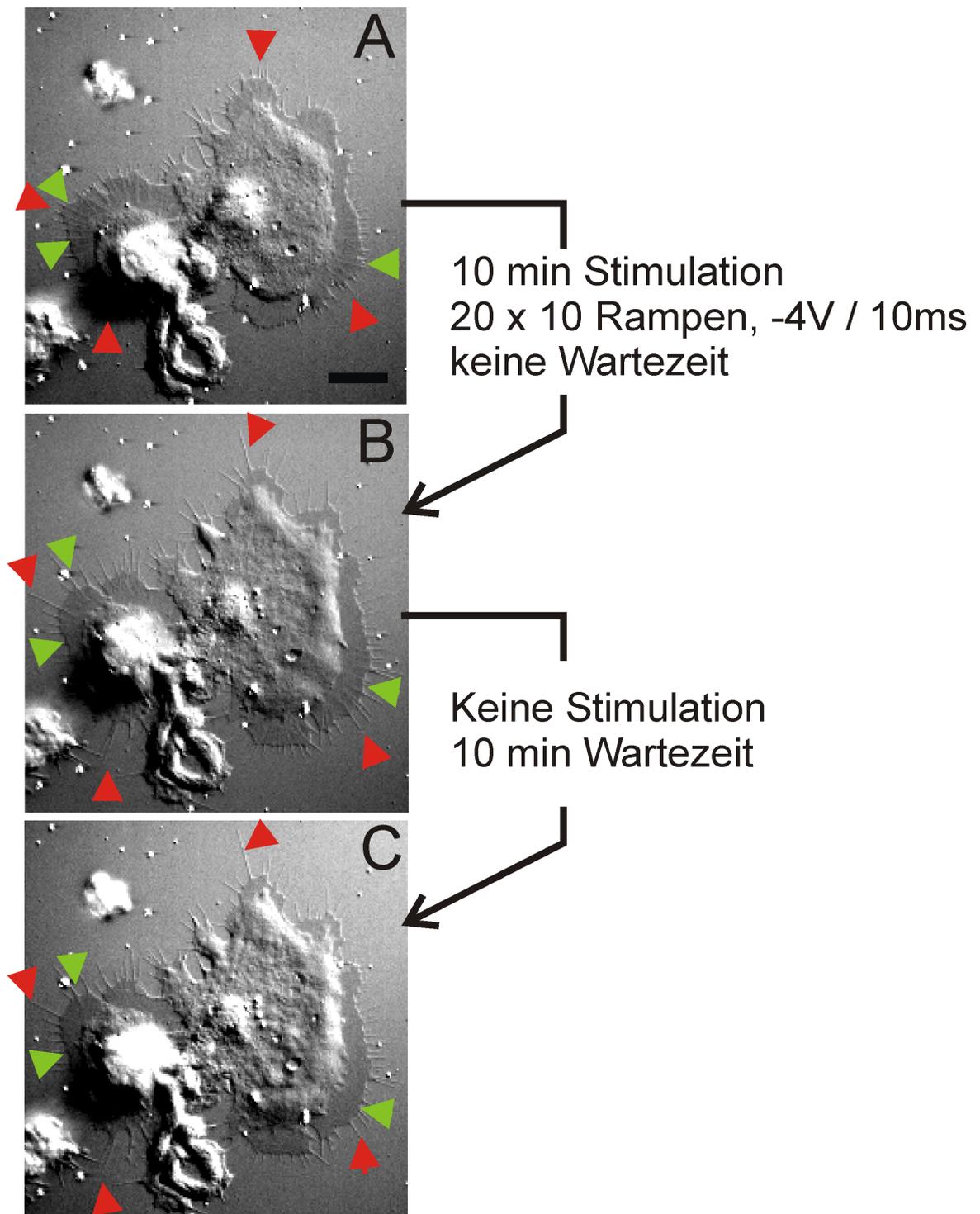
Abb. 7.3 zeigt die Morphologie der Wachstumskegel aus Punkt 6.3.1 vor (Abb. 7.3 A) und nach Stimulation mit mehreren Serien mit maximal  $\Delta V_S/\Delta t = -5$  V/10 ms (Abb. 7.3 B), sowie  $[Ca^{2+}]_i$  bei Stimulation mit einer Serie mit  $\Delta V_S/\Delta t = -2$  V/10 ms (Abb. 7.3 C). Der größere Wachstumskegel trägt die Bezeichnung WK1, der kleinere Wachstumskegel die Bezeichnung WK2.

Ausschließlich WK1 zeigte  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung (Abb. 7.3 C, mit roter Hilfslinie unterlegt). Eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung durch das darauffolgende stimulierte AP (mit blauer Hilfslinie unterlegt) zeigte sich in beiden Wachstumskegeln. Dies galt für alle eingesetzten Rampensteilheiten.

Vor der Stimulation ( $[Ca^{2+}]_i$  war 40 nM und 56 nM für WK1 und WK2) waren die Filopodien kurz und in den Lamellipodien beider Wachstumskegel waren deutlich Aktinrippen zu erkennen, die sich z.T. über die gesamte Breite des Lamellipods erstreckten (Abb. 7.3 A).



**Abbildung 7.3:** Wirkung kapazitiv ausgelöster APs auf die Morphologie von Wachstumskegeln. **A** DIC-Aufnahme eines Axonstumpfes, aus dem ein kleinerer und ein größerer Wachstumskegel ausgewachsen waren. Grüne Pfeile machen auf Aktinrippen aufmerksam, gelbe Pfeile auf die Breite des Lamellipod und rote Pfeile auf die Länge einzelner Filopodien. **B** Dieselben Wachstumskegel 10 min nach der Stimulation mit drei Blöcken à 20 Serien der maximalen Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -5 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . **C** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> der beiden Wachstumskegel WK1 und WK2 bei Stimulation mit einer Serie der Rampensteilheit  $-2 \text{ V}/10 \text{ ms}$ . Größenbalken, 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 7.4:** Wirkung kapazitiver Stimulation auf Wachstumskegel mit großer und kleiner Adhäsionsfläche. **A** DIC-Aufnahme eines Axonstumpfes mit zwei Wachstumskegeln mit verschiedenen großer Kopplungsfläche. Grüne Pfeile machen auf Aktinrippen aufmerksam, gelbe Pfeile auf die Breite des Lamellipod und rote Pfeile auf die Länge einzelner Filopodien. **B** Dieselben Wachstumskegel direkt nach Stimulation mit 20 Serien ( $\Delta V_S/\Delta t = -4\text{ V}/0\text{ ms}$ ). **C** Dieselben Wachstumskegel nach weiteren 10 min ohne Stimulation. Größenbalken, 20  $\mu\text{m}$ .

Abb. 7.3 B wurde 10 min nach der Stimulation aufgenommen ( $[Ca^{2+}]_i$  war 107 nM und 132 nM für WK1 und WK2). Bei beiden Wachstumskegeln hatte die Filopodienlänge stark zugenommen. Die Aktinrippen waren in beiden Wachstumskegeln verschwunden. Der Lamellipod war verschmälert.

Ein ähnliches Experiment wurde an einem weiteren Neuron mit zwei unterschiedlich großen Wachstumskegeln durchgeführt. Hier erfolgte ausschließlich eine Aufnahme von DIC-Bilderserien vor der Stimulation (Abb. 7.4 A), direkt danach (Abb. 7.4 B) und nach weiteren 10 min ohne Stimulation (Abb. 7.4 C).

Vor der Stimulation waren in den Lamellipodien beider Wachstumskegel deutlich Aktinrippen zu erkennen, die sich z.T. über die gesamte Breite des Lamellipods erstreckten. Die Filopodien waren eher kurz.

Anschließend wurde in drei Blöcken mit jeweils 20 Serien, eine Serie alle 15 s stimuliert. Die maximale Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -4 \text{ V}/10 \text{ ms}$ .

Direkt nach der Stimulation hatte bei beiden Wachstumskegeln die Filopodienlänge stark zugenommen. Die Aktinrippen waren in beiden Wachstumskegeln verkürzt und erstreckten sich höchstens noch über die halbe Breite des Lamellipods.

Nach weiteren 10 min ohne Stimulation hatten sich die Aktinbündel vollständig zurückgebildet, während die Filopodien nicht weiter verlängert waren.

## DISKUSSION

Im ersten Experiment liegt  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch APs der morphologischen Veränderung zugrunde. Der kleinere Wachstumskegel wurde aufgrund seiner kleinen Adhäsionsfläche selbst nicht kapazitiv stimuliert. Doch das in Wachstumskegel 1 generierte AP hatte auch in Wachstumskegel 2 eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung nach Typ 2 zur Folge (siehe Abb. 7.3 C), das zu der typischen Morphologieänderung führte (siehe Abb. 7.3 A und B): Verlust der Aktinrippen und Verlängerung der Filopodien. Erneut war die Verlängerung der Filopodien vor dem Verlust der Aktinrippen abgeschlossen.

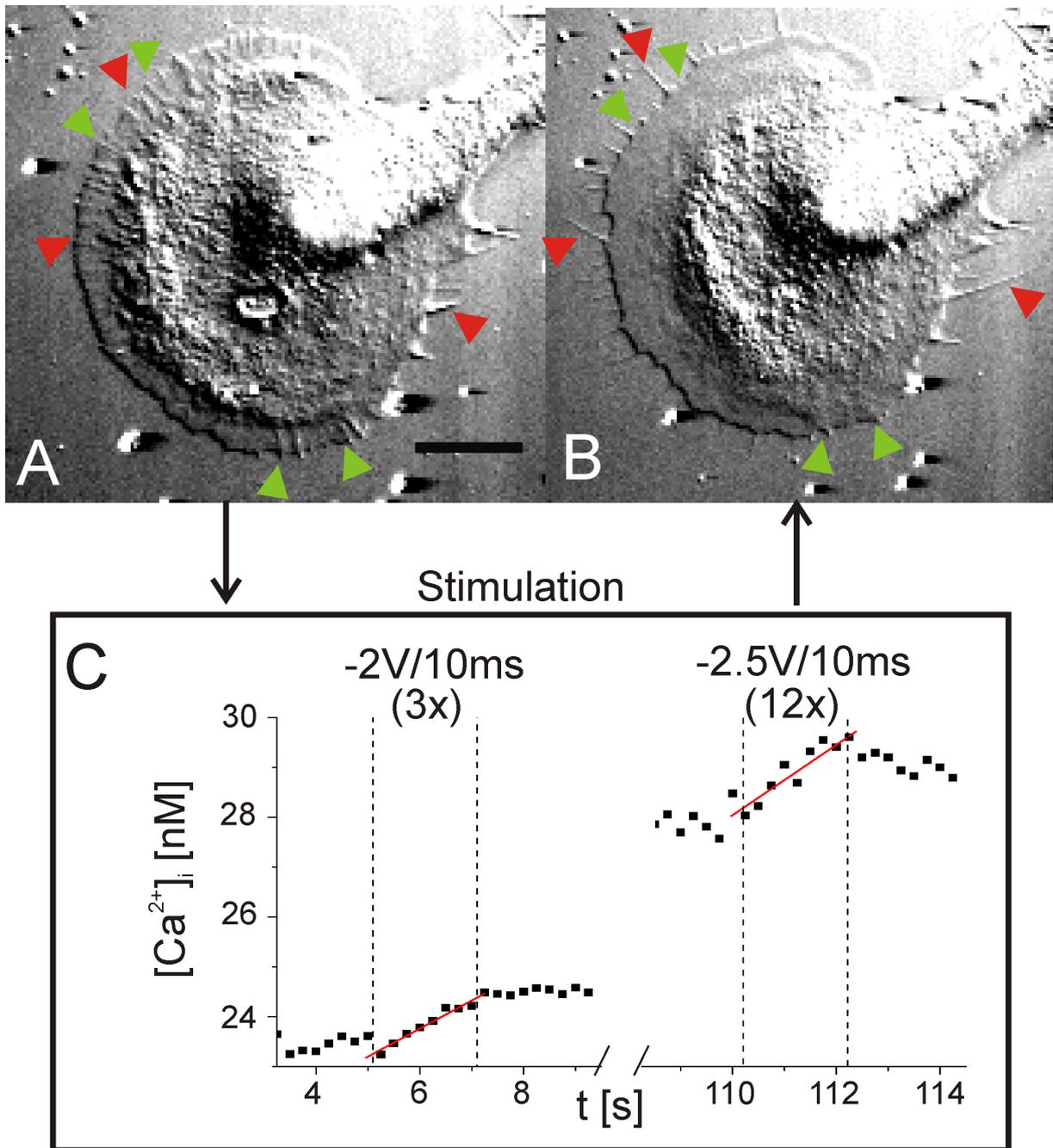
Auch im zweiten Beispiel zeigte der Wachstumskegel mit der kleinen Adhäsionsfläche die gleichen morphologischen Veränderungen wie der Wachstumskegel mit der wesentlich größeren Adhäsionsfläche. Hier war es ebenfalls wahrscheinlich, dass nur im größeren Wachstumskegel kapazitiv Kanäle geöffnet wurden und der kleinere Wachstumskegel aufgrund eines propagierenden APs seine Morphologie änderte.

Eine Verschmälерung des Lamellipod trat nur im ersten Beispiel auf. Wovon die Verschmälерung des Lamellipod abhing, konnte nicht geklärt werden.

## 7.3 Morphologieänderung durch kapazitive Kanalöffnung

Für die Induktion von Richtungswachstum ist eine lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in Wachstumskegeln nötig. Lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale können grundsätzlich über  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch kapazitiv geöffnete Kanäle erreicht werden, da die kapazitive Kanalöffnung ortsselektiv nur in Bereichen guter Kopplung zwischen Wachstumskegel und Elektrode stattfindet (siehe Punkt 6.3.1). Über kapazitiv stimulierte APs ist eine lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung nicht möglich.

In Kapitel 6 konnte bei vorsichtiger Stimulation  $[Ca^{2+}]_i$  allein über kapazitive Kanalöffnung beeinflusst werden. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen waren mit  $\Delta[Ca^{2+}]_i \approx 10 \text{ nM}$  pro Stimulationsserie allerdings klein. Als Grundlage für chipgesteuertes Richtungswachstum



**Abbildung 7.5:** Wirkung kapazitiver Kanalöffnung auf die Morphologie von Wachstumskegeln. **A** Wachstumskegel vor Einsetzen der Stimulation. Grüne Pfeile machen auf Aktinrippen aufmerksam und rote Pfeile auf die Länge der Filopodien. **B** Derselbe Wachstumskegel nach Stimulation mit 15 Serien à 10 Rampen der maximalen Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -2.5 V/10 ms$ . **C**  $[Ca^{2+}]_i$  des Wachstumskegels während der Stimulation mit zwei Serien von  $\Delta V_S/\Delta t = -2 V/10 ms$ , bzw.  $\Delta V_S/\Delta t = -2.5 V/10 ms$ . Größenbalken,  $20 \mu m$ .

musste untersucht werden, ob eine morphologische Veränderung ausschließlich durch den geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung erreicht werden konnte. Dabei konnte die Beteiligung von APs nur zweifelfrei ausgeschlossen werden, wenn der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel der Zelle während des gesamten Experiments beobachtet wurde. Daher fanden DIC-Aufnahmen nicht in Bilderserien, sondern nur in Einzelbildern vor und nach der Stimulation statt (Aufnahmemodus 2, siehe Punkt 7.1).

## EXPERIMENT

Abb. 7.5 A zeigt einen Wachstumskegel vor der Stimulation, Abb. 7.5 B zeigt ihn etwa 10 min nach der Stimulation. Während der gesamten Stimulationsphase wurde  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gemessen. Abb. 7.5 C zeigt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  exemplarisch während zwei Stimulationsserien.

Vor der Stimulation hatte der Wachstumskegel kurze Filopodien und Aktinrippen durchspannten die gesamte Breite seines Lamellipod (Abb. 7.5 A). Nach der Stimulation waren die Filopodien verlängert und keine Aktinrippen im Lamellipod mehr erkennbar.

Der Wachstumskegel hatte mit 16 nM vor der Stimulation einen sehr niedrigen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel und zeigte zu keinem Zeitpunkt spontane Aktivität.

Stimulation mit der Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -2 \text{ V}/10 \text{ ms}$  führte zu einer kontinuierlichen Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Abb. 7.5 C, links). Der Wachstumskegel wurde mit zwei weiteren Serien dieser Rampensteilheit stimuliert. Für alle drei Serien ergab sich im Mittel  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{Rampe} = 0.1 \text{ nM} \pm 0.015 \text{ nM}$ . Anschließend wurde mit 12 Serien der Rampensteilheit  $-2.5 \text{ V}/10 \text{ ms}$  stimuliert.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist exemplarisch während einer dieser 12 Serien in Abb. 7.5 C rechts dargestellt. Im Mittel war  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i/\text{Rampe} = 0.4 \text{ nM} \pm 0.1 \text{ nM}$ . Durch die Stimulation mit insgesamt 15 Serien war  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von 16 nM um insgesamt 40 nM auf 67 nM angestiegen.

## DISKUSSION

Während der gesamten Fluoreszenzmessung zeigte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  des Wachstumskegel nur Reaktionen nach Typ 1 und keine spontanen oder stimulierten APs (Typ 2). Durch repetitive Stimulation mit insgesamt 15 Serien wurde eine Erhöhung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegels um 40 nM ohne eine Beteiligung von APs erreicht, ausschließlich über  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach kapazitiver Kanalöffnung.

Der DIC-Aufnahmen ließen nach der Stimulation eine deutliche Verlängerung der Filopodien und einen vollständigen Verlust der Aktinrippen im ganzen Wachstumskegel erkennen. Die geringe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch rein kapazitive Kanalöffnung war ausreichend, die Umstrukturierung des Zytoskeletts einzuleiten.

## 7.4 Zusammenfassung

1. Kapazitive Stimulation von großflächigen Wachstumskegeln führt zu Verlängerung der Filopodien und Verlust der Aktinrippen. Diese Umstrukturierungen des Zytoskeletts folgen auch auf die globale Applikation eines repulsiven Signalstoffes und leiten den Kollaps von Wachstumskegeln ein. Kapazitive Stimulation konnte also wie ein repulsiver Signalstoff wirken.
2. Die kapazitive Stimulation kann die Umstrukturierung des Zytoskeletts über APs herbeiführen. Dabei sind alle Wachstumskegel und jeweils der ganze Wachstumskegel von der Umstrukturierung betroffen.
3. Die kapazitive Stimulation kann die Umstrukturierung des Zytoskeletts über kapazitive Kanalöffnung herbeiführen. Da kapazitive Kanalöffnung nur in Bereichen guter Kopplung zwischen Wachstumskegel und Stimulationselektrode stattfinden kann, ist die lokale Stimulation von Wachstumskegeln denkbar.



# Kapitel 8

## Zusammenfassende Diskussion

### 8.1 Kapazitive Aktivierung von $\text{Ca}_v1.2$ in HEK-Zellen

Die Grundidee der vorliegenden Arbeit war es, durch kapazitive Öffnung von VDCCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhungen in Wachstumskegeln herbeizuführen, um so vom Chip aus in die Wachstumsprozesse einzugreifen. Eine Grundvoraussetzung dafür war das kapazitive Gating von VDCCs. Die Methodik der kapazitiven Öffnung spannungsabhängiger Kanäle ist bislang nur an  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen untersucht [122, 102, 103]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die kapazitive Aktivierung von L-Typ VDCCs im Modellsystem HEK-Zelle studiert.

$\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle konnten in HEK-Zellen kapazitiv aktiviert werden. Allerdings mussten unphysiologische Bedingungen gewählt werden, um die kleine Adhäsionsfläche der HEK-Zellen zu kompensieren: ein hochohmiger Elektrolyt sorgte für eine ausreichende Kopplung zwischen Zelle und Chip, so dass kurze, steile Chiprampen die Zelle über die Schwelle für Kanalöffnung depolarisierten. Der Nachweis der Kanalöffnung erfolgte zunächst elektro-physiologisch. Anschließend wurden die eingeströmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit Fura-2 detektiert.

Der Ladungsträger  $\text{Ba}^{2+}$  erlaubt hohe Ströme durch  $\text{Ca}_v1.2$  ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung [50, 134, 67]. In spannungsgeklemmten Zellen (*Voltage Clamp*) konnte so das kapazitive Gating des Kanals studiert werden (siehe Punkt 4.2.1). Während der sehr kurzen Rampen wurden die Kanäle kapazitiv aktiviert. Der Ladungseinstrom während der Rampe war aber sehr gering. Unter Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Ladungsträger war der Einstrom während der Rampe noch geringer als mit  $\text{Ba}^{2+}$  (siehe Punkt 4.2.2). Nach der Rampe strömte  $\text{Ca}^{2+}$  während der Deaktivierung der Kanäle ein. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom konnte durch den L-Typ VDCC Agonisten FPL verstärkt werden, so dass einzelne Rampen Ladungsmengen von bis zu 5 pC in spannungsgeklemmte HEK-Zellen injizierten (siehe Punkt 4.2.2).

In nicht spannungsgeklemmten Zellen (*Current Clamp*) führten einzelne Spannungsrampen trotz FPL nur zu einem sehr geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (siehe Punkt 4.3). Ursache war die schwächere Depolarisation der adhären Membran (siehe Punkt 2.4). Über repetitive Stimulation waren die geringen injizierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen akkumulierbar. Das eingeströmte  $\text{Ca}^{2+}$  depolarisierte die nicht spannungsgeklemmte Zelle und führte bei geeigneter Reizfrequenz zu selbsterregter Kanalöffnung (siehe Punkt 4.3). Diese hatte einen starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Folge.

Um kapazitive Kanalöffnung in Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette messen zu können, wurde in simultanen *Voltage Clamp*- und Fura-2 Messungen der Proportio-

nalitätsfaktor zwischen Fluoreszenzänderung und eingeströmter Ladungsmenge ermittelt (siehe Punkt 5.1). Er war für intra- und extrazelluläre Stimulation gleich. Er konnte somit eingesetzt werden, die geringen eingeströmten Ladungsmengen nach kapazitiver Stimulation von nicht spannungsgeklemmten Zellen aus einer Fura-2 Messung abzuschätzen (siehe Punkt 5.2).

In Zellen ohne Kontakt zu einer Patchpipette konnte kapazitive Kanalöffnung mit Fura-2 detektiert und die eingeströmte Ladungsmenge aus der Fluoreszenzänderung abgeschätzt werden (siehe Punkt 5.3). Repetitive Stimulation konnte auch hier zu selbsterregter Kanalöffnung führen. Dabei war kein Zusatz von FPL nötig.

Die Experimente im Modellsystem zeigten, dass die kapazitive Aktivierung von VDCCs bei guter Kopplung möglich war und der resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit Fura-2 gemessen werden konnte. Abhängig von der Stärke und der Frequenz der kapazitiven Stimulation konnte die eingeströmte Menge  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden. Einzelne Spannungsrampen führten zu geringem Ladungseinstrom, durch repetitive Stimulation mit mehreren Rampen konnten die geringen Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  akkumuliert werden bis selbsterregte Kanalöffnung einen sehr starken  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch alle Kanäle der Zelle nach sich zog. Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde nun die Injektion von  $\text{Ca}^{2+}$  durch kapazitive Aktivierung von VDCCs in großflächige Wachstumskegel versucht.

## 8.2 Kapazitive Stimulation von Wachstumskegeln: lokale und globale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale

Im zweiten Teil der Arbeit wurden großflächige Wachstumskegel der A-Cluster-Neurone aus der Schnecke *Lymnea stagnalis* kapazitiv stimuliert. Ihre große Fläche gewährleistete eine gute Kopplung zu Elektrode, so dass sie in physiologischer Lösung stimuliert werden konnten. Repetitive Stimulation führte zu wiederholter Aktivierung von VDCCs und zu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalen, denen zwei Mechanismen zugrunde lagen (siehe Punkt 6):

1.  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch kapazitive Kanalöffnung.
2.  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch APs (nach überschwelliger Depolarisation durch repetitive kapazitive Kanalöffnung).

Beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch APs sind alle VDCCs des Wachstumskegels beteiligt. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung fand auch in benachbarten Wachstumskegeln statt, die selber nicht koppelten (siehe Punkt 6.3.1). Eine lokale Stimulation ist durch kapazitiv stimulierte APs nicht möglich.

Bei kapazitiver Kanalöffnung sind nur Kanäle in der adhären Membran des Wachstumskegels beteiligt [103]. Die Stimulation war ortsselektiv: Die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung im stimulierten Wachstumskegel propagierte nicht in andere Bereiche des Neurons wie das Axon und benachbarte, schlechter koppelnde Wachstumskegel (siehe Punkt 6.3.1). Auch innerhalb eines Wachstumskegels war lokale Stimulation möglich: Unter einem nahezu kreisförmigen Wachstumskegel entsteht während der Simulationsrampe ein Spannungsprofil ([103, 104], siehe dazu auch Punkt 2.2). Das Maximum des Profils liegt in der Mitte der Kopplungsfläche. Bei geeigneter Wahl der Simulationsrampen wurden nur in der Mitte des Wachstumskegels Kanäle geöffnet. Die Folge war ein  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalprofil mit maximaler  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung in der Mitte und keiner  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung an den Rändern (siehe Punkt 6.3.2).

Kapazitive Stimulation mit großflächigen Kondensatoren konnte also grundsätzlich globale und lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale im Wachstumskegel generieren, je nachdem, ob APs am  $Ca^{2+}$ -Einstrom beteiligt waren oder nicht.

Globale  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale können die Motilität von Wachstumskegeln beeinflussen. Lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen können Richtungsänderungen auslösen, wenn nur eine Seite eines Wachstumskegels eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung erfährt ("asymmetrische"  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung) [139, 40]. Mit großflächigen Kondensatoren war lokale Stimulation nur in der Mitte des Wachstumskegels möglich (siehe Punkt 6.3.2). Um asymmetrische lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen herbeizuführen, müssen Kondensatoren zur Stimulation verwendet werden, deren Fläche kleiner ist als die des Wachstumskegels. Dabei darf die Stimulation keine APs generieren. Wie klein die Kondensatorfläche im Vergleich zum Wachstumskegel sein muss, um durch das asymmetrische  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal eine Richtungsänderung zu induzieren, bleibt offen.

Eine neue Chip-Entwicklung stellt ein Array von kleinen Kondensatoren zur Verfügung: Hoch orts aufgelöste Multitransistor-Chips [68] wurden von der Arbeitsgruppe Fromherz in Kooperation mit Infineon um kleine Kondensatoren von etwa  $10\ \mu\text{m}$  Ausdehnung ergänzt (Fromherz und Mitarbeiter, unveröffentlicht). Diese neuen Chips werden allerdings erst in einigen Monaten zur Verfügung stehen. Immotile Wachstumskegel sind mit etwa  $70\ \mu\text{m}$  Durchmesser groß genug um mehrere dieser Kondensatoren gleichzeitig abzudecken. Lokale kapazitive Kanalöffnung auf nur einer Seite des Wachstumskegels sollte so möglich sein.

Auch lokale Stimulation motiler Wachstumskegel von etwa  $20\ \mu\text{m}$  Durchmesser wird mit diesen Chips denkbar. Es bleibt offen, ob deren kleine Kopplungsflächen kapazitive Kanalöffnung erlauben, oder ob  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale mit elektroporierender Stimulation generiert werden müssten. Eine Alternative wäre der unter Punkt 8.2 angedachte Mechanismus der Ablenkung der Wachstumskegel über laterale Felder.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass bei Wachstumskegeln mit großer Kopplungsfläche lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale durch kapazitive Kanalöffnung generiert werden können, wenn die Ausbildung von APs vermieden wird. Das ist die Grundvoraussetzung dafür, Richtungsänderungen in Wachstumskegeln kapazitiv zu induzieren.

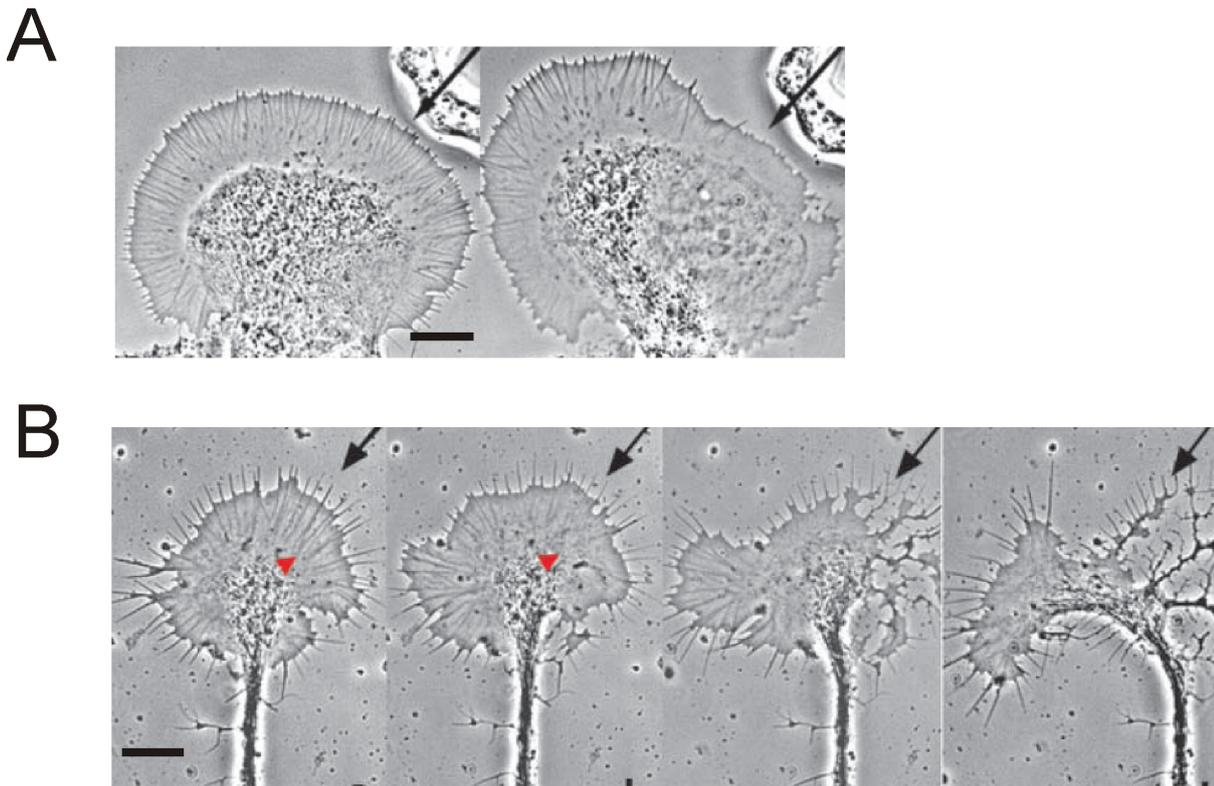
### 8.3 Morphologieänderung, Kollaps und repulsives Richtungswachstum

Im Hinblick auf chipgesteuertes Wachstum von Neuronen mussten die kapazitiv induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale Auswirkungen auf die Morphologie der Wachstumskegel erreichen können. Wachstumsstudien waren am Modellsystem der großflächigen Wachstumskegel nicht möglich, da sie aufgrund ihrer großen Adhäsionsfläche immotil sind.

Die Wachstumskegel reagierten auf kapazitive Stimulation mit einer deutlichen Umstrukturierung ihres Zytoskeletts (siehe Punkt 7). Die Hauptmerkmale waren:

1. Verlust der Aktinrippen aus dem Lamellipod
2. Verlängerung der Filopodien

In *Helisoma* ist eine vergleichbare Reaktion immotiler Wachstumskegel auf die globale Applikation repulsiver Signalstoffe beschrieben [128, 140]. In motilen Wachstumskegeln leitet



**Abbildung 8.1:** Lokaler Verlust der Aktinrippen induziert asymmetrisches Vorstoßen des Lamellipod und leitet repulsive Richtungsänderungen ein. Abbildung verändert übernommen aus [141]. **A** Lokale Applikation des repulsiven Signalstoffes ML-7 (Pipette jeweils rechts oben) induziert lokalen Verlust von Aktinrippen in immotilen Wachstumskegeln von *Helisoma*. Weitere Expansion des Wachstumskegels erfolgt nur auf der Seite, wo die Aktinrippen erhalten bleiben. Größenbalken, 10  $\mu\text{m}$ . **B** Außergewöhnlich große motile Wachstumskegel aus *Helisoma* haben ähnlich prominente Aktinrippen wie die noch größeren, immotilen Wachstumskegel. Lokale Applikation von ML-7 (Pfeile rechts oben indizieren die Position der Pipette) induziert auch hier lokalen Verlust dieser Aktinrippen (mit rotem Pfeil betont), gefolgt von lokalem Kollaps des Wachstumskegels und repulsivem Richtungswachstum. Größenbalken, 10  $\mu\text{m}$ .

der globale Verlust der Aktinrippen aus dem Lamellipod den Kollaps ein, der Wachstumskegel zieht sich zurück ([27, 141], siehe dazu auch Punkt 1.6). In den großflächigen, immotilen Wachstumskegeln erfolgt der Kollaps aufgrund der starken Adhäsion nicht [128].

Es ist also gelungen, über kapazitive Stimulation eine Morphologieänderung herbeizuführen, die für globale Applikation repulsiver Signalstoffe beschrieben ist. Damit ist der erste Schritt auf dem Weg zur kapazitiven Kontrolle der Motilität von Wachstumskegeln getan.

Die kapazitive Kontrolle von Richtungswachstum verlangt lokale Stimulation. Gradienten von repulsiven Signalstoffen leiten in immotilen und motilen Wachstumskegeln einen lokalen Kollaps ein, der ebenfalls durch den Verlust der Aktinrippen aus dem Lamellipod ausgelöst wird [141] (siehe Abb. 8.1). In motilen Wachstumskegeln ist das der erste Schritt der repulsiven Richtungsänderung.

Um kapazitiv lokalen Kollaps herbeizuführen, müsste ein lokales  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal generiert werden. Nach Punkt 8.2 ist das über kapazitive Kanalöffnung ohne Beteiligung von

APs möglich. Die durch rein kapazitive Kanalöffnung generierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale waren aber vergleichsweise klein (siehe Kapitel 6). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass geringe  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen durch repetitive kapazitive Kanalöffnung, ohne Beteiligung von APs, ausreichend war, den Verlust der Aktinrippen auszulösen (siehe Punkt 7.3). Ein lokaler Kollaps nach lokaler kapazitiver Stimulation mit kleinen Kondensatoren sollte also herbeizuführen sein. Somit ist die Grundlage geschaffen, Richtungsänderungen von Wachstumskegeln durch kapazitive Stimulation zu induzieren.

## 8.4 Galvanotropismus und kapazitive Stimulation

Der hier studierte Mechanismus elektrischer Manipulation des Wachstumsverhaltens über kapazitive Aktivierung von VDCCs steht einem seit langem bekannten Phänomen elektrischer Wegleitung von Neuriten gegenüber: dem Galvanotropismus. Im Galvanotropismus reagieren Wachstumskegel auf laterale elektrische Felder (EFs). Die Richtungsänderung in Kultur erfolgt unter meist zur Kathode hin [89, 111, 22, 88, 97] (siehe Abb. 8.2 A). Sie kann aber auch von ihr weg erfolgen oder ausbleiben, je nachdem auf welchem Substrat die Neurone adhärirt sind, welchem Zelltyp sie angehören und ob es sich um einen axonalen oder einen dendritischen Fortsatz handelt [15, 17, 42, 53, 98].

Kapazitive Stimulation ändert die Transmembranpannung der adhärirten Membran. Wie die Wachstumskegel auf die lateralen EFs reagieren, ist noch nicht eindeutig geklärt. Grundsätzlich induzieren auch laterale EFs eine Änderung des Transmembranpotentials. Für die kathodenseitige Membran ergibt sich eine Depolarisation. Ist diese Depolarisation stark genug um kathodenseitig VDCCs öffnen und dadurch einen  $[Ca^{2+}]_i$ -Gradienten erzeugen, könnte dieser Mechanismus dem Galvanotropismus zugrunde liegen.

Die Änderung des Transmembranpotentials  $\Delta V_{TM}$  durch ein laterales EF hängt von der Zellgröße, der Zellform und der Orientierung der Zelle im Feld ab. Für eine sphärische Zelle mit dem Zellradius  $r$  gilt im Feld der Feldstärke  $E$

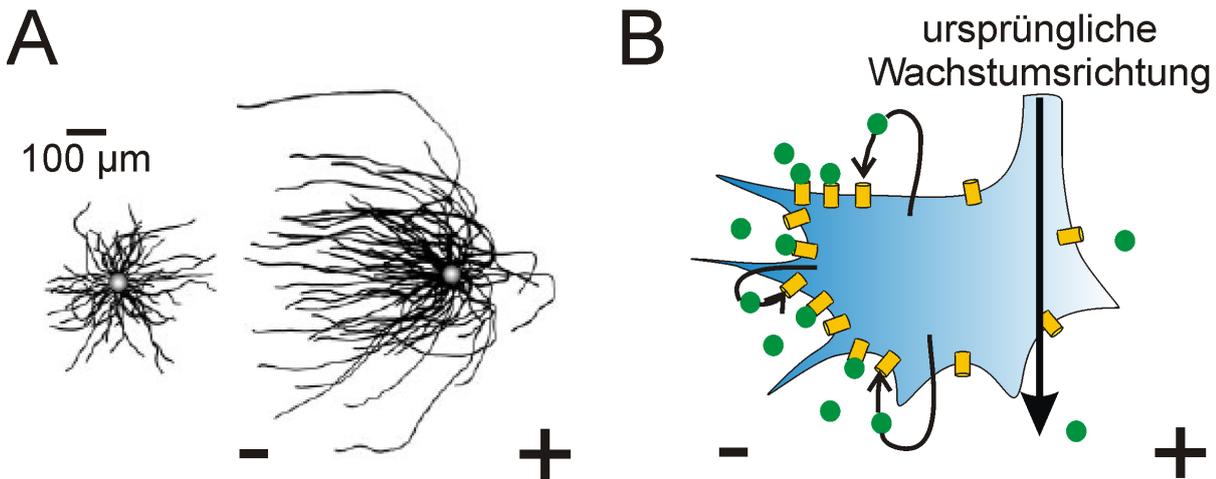
$$\Delta V_{TM} = 1.5Er \cos\theta \quad (8.1)$$

wobei  $\theta$  der Winkel zwischen der Achse des elektrischen Feldes und dem betrachteten Punkt auf der Zelloberfläche ist [43]. Für eine adhärirte, unregelmäßig geformte Zelle liefert Gleichung 8.1 zu hohe Werte für  $\Delta V_{TM}$  [117].

Neurone in Kultur reagieren auf laterale EFs der Feldstärken 10-150 mV/mm durch Richtungsänderungen ihrer auswachsenden Neuriten (siehe Abb. 8.2 A). EFs vergleichbarer Feldstärke spielen auch bei der Entwicklung und Regeneration von Neuronen *in vivo* eine Rolle [74]. Nach Gleichung 8.1 sind EFs der Feldstärke 10 mV/mm zu schwach, um eine asymmetrische Öffnung spannungsabhängiger Kanäle in der Membran herbeizuführen (mit  $r = 10 \mu\text{m}$  ergibt sich eine maximale Depolarisation von  $\Delta V_{TM} = 0.15 \text{ mV}$ ). Die direkte Öffnung von VDCCs durch physiologische EFs ist daher unwahrscheinlich. Bei höheren Feldstärken lässt sich dieser Effekt in Kultur allerdings durchaus herbeiführen: ab 1 V/mm führen EFs zur Aktivierung von VDCCs und massivem  $Ca^{2+}$ -Einstrom [10, 16]. Noch höhere Feldstärken ab etwa 20 V/mm führen zu Elektroporation [117, 120, 119].

Doch wie wird der Effekt des Galvanotropismus in physiologischen EFs vermittelt?

Es wird vermutet, dass die Wechselwirkung der EFs mit geladenen Wachstumsfaktoren und Membranproteinen wie Rezeptoren und Kanälen verantwortlich ist [74] (siehe Abb. 8.2 B). Dabei scheint vor allem letzteres von Bedeutung zu sein: während galvanotropische Effekte auch unter experimentellen Bedingungen möglich sind, in denen sich



**Abbildung 8.2:** Galvanotropismus von Wachstumskegeln. Abbildung verändert übernommen aus [74]. **A** Zusammengesetzte Zeichnungen des Neuritenwachstums von *Xenopus* Neuralrohr-Neuronen in Kultur. Das Auswachsen der Neuriten einzelner isolierter Neurone wurde mit Hilfe einer Kamera über 5 h verfolgt. Die Zeichnung in A wurde durch Übereinanderlegen der Somata der einzelnen Neurone (graue Punkte) generiert. Links: Kontrollkultur. Die Neuriten wachsen zufällig verteilt in alle Richtungen. Rechts: Elektrisches Feld der Feldstärke 150 mV/mm. Die Neuriten wachsen wesentlich schneller und verstärkt zur Kathode hin. Größenbalken, 100 µm. **B** Modell für die kathodenseitige Orientierung von Wachstumskegeln. Membranrezeptoren (gelb) sammeln sich bevorzugt in der kathodenseitigen Membran des Wachstumskegels an. Der spontan vom *Xenopus* Wachstumskegel freigesetzte Ligand (grün) wird bevorzugt an der zur Kathode gewandten Seite des Wachstumskegels gebunden. Auf dieser Seite werden so bevorzugt Signalkaskaden angeschaltet und der Wachstumskegel ändert seine Wachstumsrichtung hin zur Kathode.

kein stehender chemischer Gradient extrazellulärer Signalstoffe ausbilden kann [42], ist die EF-induzierte Asymmetrie geladener Rezeptormoleküle in der Membran essentiell für den Effekt [73].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein großflächiger Stimulationschip eingesetzt, um VDCCs in der adhären Membran kapazitiv zu öffnen,  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen im Wachstumskegel herbeizuführen und so in die Wachstumsprozesse einzugreifen. Die Ausbildung lateraler elektrischer Felder zur Induktion von Membranproteinasymmetrie analog zum Galvanotropismus war hier nicht möglich.

Räumlich stärker strukturierte Chips mit vielen kleinen Kondensatoren, wie der unter Punkt 8.2 erwähnte Multitransistor-Multikondensator-Chip, werden in einigen Monaten diese Alternative eröffnen: Durch geschickte repetitive Rampenprotokolle sollte sich ein gerichteter Ionenstrom im Bad ausbilden lassen. Der Spannungsabfall zwischen den Elektroden lässt sich über

$$V = R \cdot I = \frac{L \cdot \rho_E}{B \cdot d_J} \cdot L \cdot W \cdot c_S \cdot \frac{\Delta V_S}{\Delta t} \quad (8.2)$$

abschätzen mit der Länge eines motilen Wachstumskegels  $L$ , der Breite des Wachstumskegels  $B$ , der Länge der Elektrode  $L$  (sie kann aufgrund des strukturierten Chips gleich der Länge des Wachstumskegels gewählt werden) und der Breite der Elektrode  $W$ . Nimmt man an, dass der Wachstumskegel so lang wie breit ist, gilt  $R = \rho_E/d_J = r_J$  und

Gleichung 8.2 vereinfacht sich zu

$$\Delta V = r_J \cdot L \cdot W \cdot c_S \cdot \frac{\Delta V_S}{\Delta t}. \quad (8.3)$$

Für  $r_J = 50 \text{ M}\Omega$ ,  $L = 20 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $W = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $c_S = 1.5 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ,  $\Delta V_S = 0.2 \text{ V}$  und  $\Delta t = 10 \text{ ms}$  ergibt sich ein lateraler Spannungsabfall über den Wachstumskegel von  $\Delta V = 3 \text{ mV}$ . Das entspricht einer physiologischen Feldstärke von  $150 \text{ mV}/\text{mm}$ .

Ob das gepulste EF eine Rezeptorasyrmetrie erreichen kann, bleibt offen. Der Ansatz ist allerdings vielversprechend, da auch *in vivo* repetitive, gepulste EFs, wie sie über das Feuern von Aktionspotentialen entstehen, das Richtungswachstum von Neuronen beeinflussen [24, 89, 133].

Galvanotropismus ist für hohe Feldstärken auch bei Neuronen von *Helisoma* beschrieben [16]: Die Wachstumskegel reagieren auf Feldstärken von  $> 1 \text{ V}/\text{mm}$  mit starkem kathodenseitigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Bei kleineren Feldstärken zeigen sie keine Reaktion. Ob sich die Wachstumskegel von Schneckenneuronen für Experimente mit physiologischen Feldstärken zur Induktion von Richtungswachstum eignen, bleibt offen. Frühere Studien in diese Richtung blieben erfolglos [19]. Die gut untersuchten, motilen Wachstumskegel von Neuralrohr-Neuronen aus *Xenopus* könnten dafür die bessere Wahl sein.



# Anhang A

## Ergänzungen

### A.1 Kapazitive Öffnung von $\text{Ca}_v1.2$ in HEK-Zellen in physiologischer Messlösung

Alle unter Punkt 4 und 5 gezeigten Messungen wurden in hochohmiger Lösung durchgeführt, um die kleine Kopplungsfläche von HEK-Zellen zu kompensieren.

Physiologische Messlösung hat im Vergleich zur bisher eingesetzten hochohmigen Lösung zwei wichtige Nachteile:

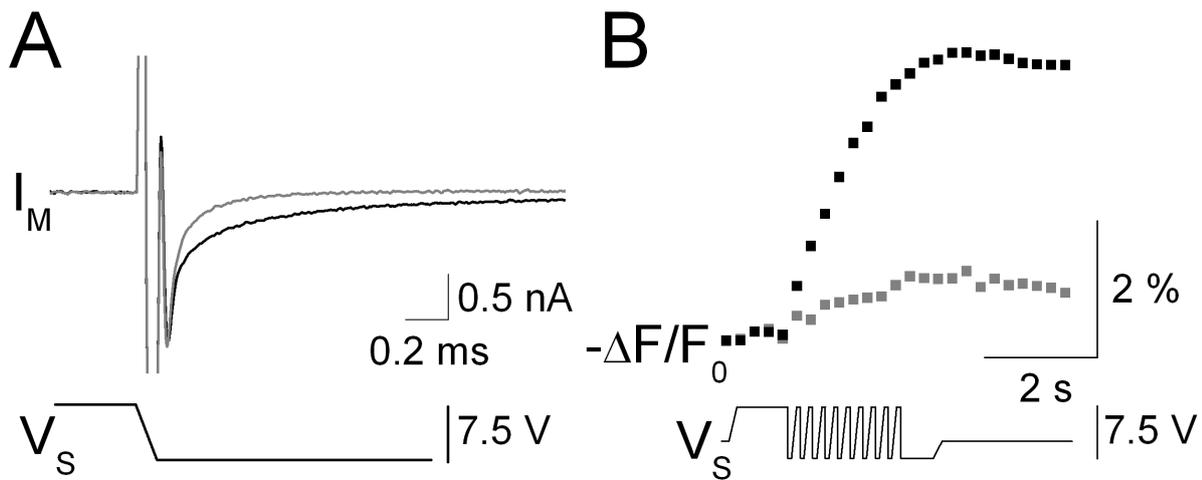
1. Die Konzentration des Ladungsträgers  $\text{Ca}^{2+}$  ist in der physiologischen Lösung um etwa Faktor 10 kleiner.
2. Der spezifische Widerstand des Elektrolyten ist geringer als bei der hochohmigen Lösung. Die Kopplung zwischen Zelle und Chip ist daher schlechter.

Ob trotz dieser beiden Punkte kapazitive Kanalöffnung unter physiologischen Bedingungen möglich war, sollte hier untersucht werden.

Um bei erhöhter Leitfähigkeit des Elektrolyten eine Aktivierung der Kanäle zu erreichen, musste nach Gleichungen 2.2 und 2.4 die Rampensteilheit heraufgesetzt werden. Da schon in hochohmiger Lösung der Arbeitsbereich der Chips voll ausgenutzt werden musste, um Kanäle zu öffnen, war eine weitere Erhöhung der Rampensteilheit nur über Verkürzung der Rampendauer auf  $\Delta t < 1$  ms möglich. Eine direkte Folge der kurzen Rampendauern ist allerdings, dass der Spannungsabfall in Bad und Spalt nur kurz aufrechterhalten werden kann. Ob unter diesen Bedingungen  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle kapazitiv aktiviert werden konnten, und ob der resultierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom fluoreszenzoptisch nachweisbar war, sollte mit Hilfe von simultanen *Voltage Clamp*- und Fluoreszenz-Messungen überprüft werden. Die verwendeten Messlösungen sind in Anhang A.4.4 zu finden (Lösungspaar 5).

## EXPERIMENT

$\text{Ca}_v1.2$ -Zellen wurden auf  $\text{HfO}_2$ -Chips kultiviert und unter *Voltage Clamp*-Bedingungen vor und nach Zugabe von FPL repetitiv stimuliert. Für den jeweils ersten Stimulus sind die Chipspannung  $V_S$  (extrazelluläre Stimulation) und der gemessene Membranstrom  $I_M$  vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von FPL Abb. A.1 A gezeigt. Um die hohe Leitfähigkeit des physiologischen Messlösung zu kompensieren, wurde die Dauer der Rampe um etwa Faktor 7 reduziert und mit der Rampensteilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5 \text{ V}/0.3 \text{ ms}$  stimuliert.



**Abbildung A.1:** Simultane *Voltage Clamp*- und Fluoreszenzaufnahmen bei extrazellulärer Aktivierung von  $\text{Ca}_v1.2$  in physiologischer Messlösung. **A** Membranstrom  $I_M$  und Chipspannung  $V_S$  während einer Spannungsrampe vor (grau) und nach (schwarz) Zugabe von FPL ( $2\ \mu\text{M}$ ). Die Rampensteilheit war  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5\ \text{V}/0.3\ \text{ms}$ . **B** Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  bei repetitiver kapazitiver Stimulation mit 10 Rampen der Steilheit  $\Delta V_S/\Delta t = -7.5\ \text{V}/0.3\ \text{ms}$  vor (grau) und nach (schwarz) Zugabe von FPL ( $2\ \mu\text{M}$ ).

Auswertung der *tail currents* lieferte  $\Delta Q < 1\ \text{pC}$  vor und  $\Delta Q = 3.7\ \text{pC}$  nach Zugabe von FPL.

In Abb. A.1 B erfolgte die Stimulation repetitiv mit jeweils zehn Rampen, ein Rampe erfolgte alle 100 ms. Die Fluoreszenzänderung  $-\Delta F/F_0$  und die Chipspannung  $V_S$  sind dargestellt.  $I_M$  wurde während der repetitiven Stimulation aufgenommen, aber nicht dargestellt.

## DISKUSSION

Vor der Zugabe von FPL war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom elektrophysiologisch und fluoreszenzoptisch kaum über der Nachweisgrenze. Nach Zugabe von FPL wurde mit FPL nach der Rampe ein *tail current* sichtbar und das Fluoreszenzsignal  $-\Delta F/F_0$  detektierte den Einstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

Kapazitive Stimulation spannungsgeklemmter HEK-Zellen führte in physiologischer Messlösung nach Zusatz von FPL also zur Öffnung von  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen. Die eingeströmte Menge  $\text{Ca}^{2+}$  pro Rampe war aber deutlich geringer als in hochohmiger Lösung (siehe Punkt 4.2.2).

## A.2 Signalprofil von Wachstumskegeln bei elektroporierender Stimulation

Unter einem nahezu kreisförmigen Wachstumskegel entsteht während der Simulationsrampe ein Spannungsprofil ([103, 104], siehe dazu auch Punkt 2.2). Das Maximum des Profils liegt in der Mitte der Kopplungsfläche. Bei geeigneter Wahl der Stimulationsrampen wurden nur in der Mitte des Wachstumskegels Kanäle geöffnet. Die Folge war ein  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil mit maximaler  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in der Mitte und keiner  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung an den Rändern (siehe Punkt 6.3.2).

Mit Hilfe elektroporierender Stimulation sollte überprüft werden, ob das  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofil eines Wachstumskegels von der Rampensteilheit abhing. Elektroporation ist wie die Kanalöffnung ein Schwellwertphänomen [59]. Es werden nur dort Poren in der adhärerten Membran generiert, wo der Spannungsschwellwert für Elektroporation überschritten wird. Stimuliert man einen Spannungsabfall im Spalt, der nur an seinem Maximum in der Mitte der Kopplungsfläche ausreichend ist um die Schwelle für Elektroporation zu überschreiten, so kann man selektiv in der Mitte des Wachstumskegels Poren bilden. Der Vorteil der Elektroporation gegenüber der Kanalöffnung ist dabei, dass sie unabhängig von eventuellen Effekten ungleichmäßiger Kanalverteilung ist und die injizierte Menge  $Ca^{2+}$  groß ist, da die Poren sich im Vergleich zu Kanälen langsamer schließen [99].

Durch sehr kurze Rampen hoher Steilheit wurde ein starker Spannungsabfall im Spalt generiert, so dass unselektive Poren in der adhärerten Membran des Wachstumskegels entstanden und  $Ca^{2+}$  durch sie einströmte. Die Rampendauern waren hier um etwa Faktor 50 kürzer, so dass die Rampen etwa Faktor 50 steiler waren als in den Experimenten in Kapitel 6 und Kapitel 7.

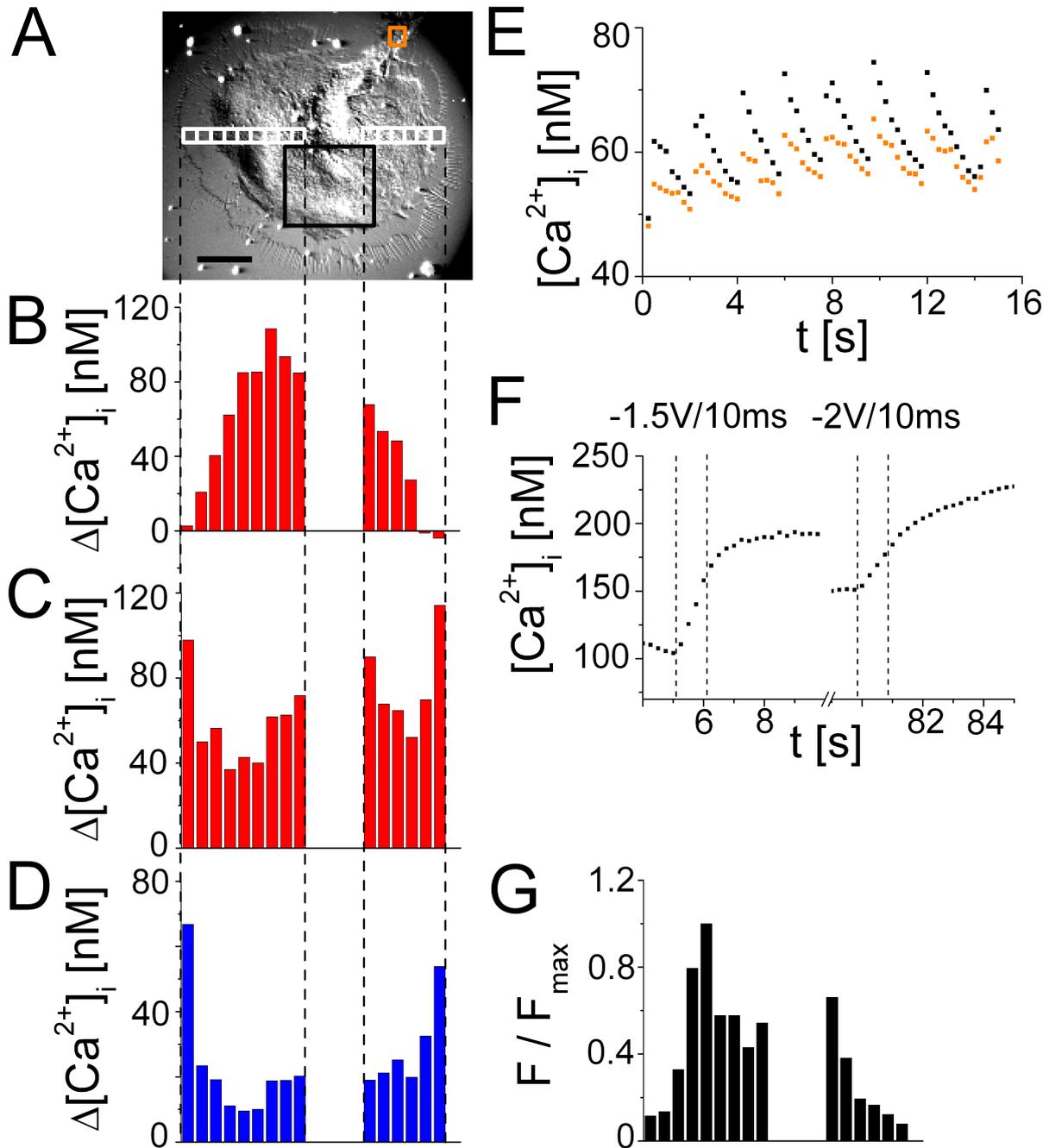
### EXPERIMENT

Abb. A.2 A zeigt die DIC-Aufnahme eines Wachstumskegels. Aus der großen ROI im Bereich der zentralen Domäne (schwarz) wurde  $[Ca^{2+}]_i$  des Wachstumskegels für die generelle Reaktion des Wachstumskegels auf die Stimulation ermittelt, aus der kleinen orangenen ROI  $[Ca^{2+}]_i$  des Axons. Die kleinen, weißen ROIs wurden zur Ermittlung des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofils herangezogen.

Zu Beginn des Experiments war der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel des Wachstumskegels niedrig ( $[Ca^{2+}]_i = 55 \text{ nM}$ ). Es wurden spontane  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale detektiert, die in Wachstumskegel (schwarz) und Axon (orange) gemessen werden konnten (Abb. A.2 E).

Durch wiederholte Stimulation wurde der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel des Wachstumskegels so weit erhöht, bis keine spontane Aktivität mehr gemessen wurde ( $[Ca^{2+}]_i = 100 \text{ nM}$ ). Nun wurde zuerst mit einer Serie von 5 Rampen der Steilheit  $-1.5 \text{ V}/0.2 \text{ ms}$  stimuliert (A.2 F links), danach mit einer Serie von 5 Rampen der Steilheit  $-2 \text{ V}/0.2 \text{ ms}$  (A.2 F rechts). Die erste und letzte Rampe der Serien sind jeweils mit gestrichelten Linien angedeutet.  $[Ca^{2+}]_i$  änderte sich während der Stimulation mit den beiden Serien kontinuierlich mit etwa  $\Delta[Ca^{2+}]_i/Rampe = 13 \text{ nM}$  und der  $Ca^{2+}$ -Einstrom hielt länger an als die Stimulation selbst.

Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen pro Stimulationsserie wurden für jede weiße ROI einzeln ermittelt. Die Werte  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  pro Serie mit  $-1.5 \text{ V}/0.2 \text{ ms}$  sind in Abb. A.2 B aufgetragen, die Werte  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  pro Serie mit  $-2 \text{ V}/0.2 \text{ ms}$  in Abb. A.2 C. Das Signalprofil der Serie mit den flacheren Rampen zeigte ein Maximum in der Mitte des Wachstumskegels. Bei



**Abbildung A.2:** Signalprofile nach kapazitiver Elektroporation im Vergleich zum Profil spontaner  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. **A** DIC-Aufnahme eines Wachstumskegels mit den ROIs für die generelle Reaktion des Wachstumskegels (schwarz), die Reaktion des Axons (orange) und die Emission der Profile (weiß). **B** Signalprofil bei Stimulation mit der ersten Serie ( $-1.5\text{ V}/0.2\text{ ms}$ ). **C** Signalprofil bei Stimulation mit der zweiten Serie  $-2\text{ V}/0.2\text{ ms}$ . **D** Signalprofil eines spontanen  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. **E** Aufnahme der spontanen  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale in Wachstumskegel (schwarz) und Axon (orange). **F**  $[Ca^{2+}]_i$ während kapazitiver Elektroporation mit zwei Serien von je 5 Rampen der Steilheit  $-1.5\text{ V}/0.2\text{ ms}$  (links), bzw.  $-2\text{ V}/0.2\text{ ms}$  (rechts). **G** Beladungsprofil des Wachstumskegels. Die relative Fluoreszenzintensität bei  $360\text{ nm}$  Anregung wurde für jede weiße ROI aufgetragen und aus Platzgründen auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt.

der Serie höherer Rampensteilheit war diese Profilform verschwunden und die  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung war gleichmäßiger über den Wachstumskegel verteilt mit zwei Maxima an den Seiten. Abb. A.2 D zeigt die  $\Delta[Ca^{2+}]_i$ -Werte für ein spontanes  $[Ca^{2+}]_i$ -Signal. Hier wurde die Amplitude eines der spontanen APs aus Abb. A.2 E für jede weiße ROI ausgewertet. Das Profil zeigte Maxima an den Seiten, die noch deutlicher ausgeprägt waren als in Abb. A.2 C und die Signalamplitude in der Mitte des Wachstumskegels war eher gering.

Abb. A.2 G zeigt die relative Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 360 nm als Maß für die Dicke des Wachstumskegels. Der Wachstumskegel ist nicht ganz symmetrisch und hat auf der linken Seite einen dickeren Bereich.

## DISKUSSION

Die spontanen  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale des Wachstumskegels generieren ein Signalprofil (Abb. A.2 F), das sich über  $Ca^{2+}$ -Einstrom während eines APs erklären lässt: Alle VDCCs des Wachstumskegels öffnen durch die Membrandepolarisation während eines APs. Bei gleichmäßiger Verteilung der Kanäle und unter der Annahme ähnlicher endogener  $Ca^{2+}$ -Pufferung über den gesamten Wachstumskegel entsteht wegen der Abhängigkeit des Signals vom Membran/Volumen-Verhältnis ein Profil mit einem Minimum an der dicksten Stelle des Wachstumskegels und jeweils einem Maximum in den Bereichen des sehr flachen Lamellipod.

Das Signalprofil der Serie mit geringer Rampensteilheit ließ den Schluss zu, dass die Schwelle für Elektroporation nur in der Mitte des Wachstumskegels überschritten wurde. Das Profil ähnelte dem, welches für knapp überschwellige kapazitive Kanalöffnung nach Typ 1 in Punkt 6.3.2 gemessen wurde. Es waren daher vermutlich keine APs am Signal beteiligt.

Bei erhöhter Rampensteilheit verändert sich das Profil: das Maximum in der Mitte verschwand und es tauchten zwei Maxima an den Rändern des Wachstumskegels auf. Die Form des Signalprofils ähnelte jetzt eher dem der spontanen APs. Ursache hierfür war vermutlich, dass der Schwellwert für Elektroporation nun in der gesamten adhärenierten Membranfläche überschritten wurde, überall Poren generiert wurden und  $Ca^{2+}$ -Einstrom stattfand. Ähnlich wie bei  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch VDCCs ist auch beim  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch unselektive Poren die Amplitude des  $[Ca^{2+}]_i$ -Signals abhängig vom Membran/Volumen-Verhältnis. Da aber nur die adhärenierte, nicht die gesamte Membranfläche eine Rolle spielte, wies die Verteilung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Signalamplituden nicht so starke Extrema auf wie sie bei APs beobachtet wurden.

In Abb. A.2 F lässt sich erkennen, dass die  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung länger anhielt als die Stimulation selbst. Ursache war vermutlich das langsame schließen der Poren innerhalb von Sekunden [99].

## A.3 Protokolle Molekularbiologie

### A.3.1 PCR-Programme

#### *C*-terminale Verkürzung von $\alpha_{1C}$ durch *Gene sewing*

Zweck der PCR	Hot start	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycles	Holding Temperature
Schritt 1, <i>upstream</i>	94°C, 4 min	94°C, 45 s	64°C, 45 s	72°C, 4 min	25	6°C, $\infty$
Schritt 1, <i>downstream</i>	94°C, 4 min	94°C, 45 s	64°C, 45 s	72°C, 1 min	25	6°C, $\infty$
Schritt 2	94°C, 4 min	94°C, 45 s	64°C, 45 s	72°C, 4 min	25	72°C, 1 min, 6°C, $\infty$

#### PIRES- $\alpha_2\delta$ - $\beta_{2a}$

Zweck der PCR	Hot start	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycles	Holding Temperature
Amplifikation von $\beta_{2a}$	94°C, 4 min	94°C, 45 s	57°C, 45 s	72°C, 4 min	25	6°C, $\infty$

### A.3.2 PCR-Ansätze

#### *C*-terminale Verkürzung von $\alpha_{1C}$ durch *Gene sewing*

##### Schritt 1, *downstream*

Substanz	Konzentration	Menge
Pfu buffer	10x	5 $\mu$ l
dNTPs	12.5 mM	1 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	3 $\mu$ l
P <sub>dr</sub>	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
P <sub>df</sub>	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
pcDNA3- $\alpha_{1C}$	1.9 ng/ $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
Pfu-Turbo-Polymerase	2.5 Units / 1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Wasser (reinst)	-	34.8 $\mu$ l

##### Schritt 1, *upstream*

Substanz	Konzentration	Menge
Pfu buffer	10x	5 $\mu$ l
dNTPs	12.5 mM	1 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	3 $\mu$ l
P <sub>ur</sub>	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
P <sub>uf</sub>	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
pcDNA3- $\alpha_{1C}$	1.9 ng/ $\mu$ l	2.6 $\mu$ l
Pfu-Turbo-Polymerase	2.5 Units / 1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Wasser (reinst)	-	34.8 $\mu$ l

**Schritt 2**

Substanz	Konzentration	Menge
P <sub>uf</sub>	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
P <sub>df</sub>	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
dNTPs	12.5 mM	1 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	3 $\mu$ l
PCR-Produkt aus Schritt 1 <i>downstream</i> , nach Gelextraktion	228 ng/ $\mu$ l	0.9 $\mu$ l
PCR-Produkt aus Schritt 1 <i>upstream</i> , nach Gelextraktion	307 ng/ $\mu$ l	0.7 $\mu$ l
Pfu buffer	10x	5 $\mu$ l
Pfu-Turbo-Polymerase	2.5 Units / 1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Wasser (reinst)	-	35.8 $\mu$ l

**Konstruktion von pIRES- $\alpha_2\delta_1$ - $\beta_{2a}$** **PCR zur Amplifikation von  $\beta_{2a}$** 

Substanz	Konzentration	Menge
Pfu buffer	10x	5 $\mu$ l
dNTPs	12.5 mM	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 $\mu$ l
pcDNA3- $\beta_{2a}$	1.7 ng/ $\mu$ l	3 $\mu$ l
$\beta_{2a}$ _forward	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
$\beta_{2a}$ _reverse	10 pmol/ $\mu$ l	1.3 $\mu$ l
Pfu-Turbo-Polymerase	2.5 Units / 1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Wasser (reinst)	-	34.4 $\mu$ l

**A.3.3 Ligation**

Ligationen wurden stets in einem 20  $\mu$ l Ansatz durchgeführt: 120 fmol Insert und 30 fmol Vektor wurden zusammen mit 1  $\mu$ l T4-Ligase und 2  $\mu$ l des zugehörigen Puffers eingesetzt und mit reinst Wasser auf 20  $\mu$ l gebracht. Die Ligation erfolgte stets bei 16 °C über Nacht.

**A.4 Verwendete Materialien****A.4.1 Molekularbiologie****Primer**

Alle Primer wurden bei MWG Biotech AG Ebersberg in Auftrag gegeben.

**Rückmutation  $\alpha_2\delta_1$ :**

Punktmutation 2: QMSDM

mut\_ $\alpha_2\delta_1$ \_Del\_forward: 5'CAGATTATAGCAGTTTGGCCTTGG

mut\_ $\alpha_2\delta_1$ \_AzuC\_forward: 5'CAAGTGGAGTCCATCAGCTTGTTG

mut\_α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>\_CzuG\_forward: 5'GAAATTGCAGCCAGAGACATTGAGAAG

Punktmutation 1: SDM 1

pkt1α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>\_for: 5'CAGCAAGTGGAGTCCATCAGCTTGTTGATATCTATGAGAAATATC

pkt1α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>\_rev: 5'GATATTTCTCATAGATATCAACAAGCTGATGGACTCCACTTGCTG

Deletion: SDM 2

Delα<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>\_forward: 5'GGCACAGATTATAGTAGCTTAGCCTTGGTATTAC

Delα<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>\_reverse: 5'GTAATACCAAGGCTAAGCTACTATAATCTGTGCC

### Gene-Sewing zur Kürzung der cDNA von a1C

P<sub>uf</sub>\_ (upstream forward Primer): 5'CTGGGCAGAGTATGACCCTGAAGCC,

P<sub>ur</sub>\_ (upstream reverse Primer): 5'CCCTGGCGCCTATGAGCCGCAG TG,

P<sub>df</sub>\_ (downstream forward Primer): 5'CACTGCGGCTCATAGGCGCCAGGG

P<sub>dr</sub>\_ (downstream reverse Primer): 5'CTGCAGAATTCCAGCACACTGGC

### Amplifikation von β<sub>2a</sub> zur Konstruktion von pIRES-α<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>-β<sub>2a</sub>;

β<sub>2a</sub>\_forward: 5': ACGCGTCGACGCCACCATGCTTGACAGGC,

β<sub>2a</sub>\_reverse: 5': GCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTG

### Enzyme

Enzym	Kat. Nr.	Bezugsquelle
BamHI	ER0051	Fermentas
Bpu1102I	ER0091	Fermentas
DpnI	ER1701	Fermentas
EcoRI	ER0271	Fermentas
EcoRV=Eco32I	ER0301	Fermentas
Eco91I	ER0391	Fermentas
NotI	ER0592	Fermentas
Pfu	600355	Stratagene
SalI	R0138L	BioLabs
T4-Ligase	EL0015	Fermentas

Für Ansätze mit den obigen Enzymen wurde stets der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet.

**Kits**

Name	Kat. Nr.	Bezugsquelle	Verwendungszweck
TopoTA Cloning Kit for Subcloning	K4550-40	Invitrogen	Zwischenklonierung des verkürzten C-Terminus von $\alpha_{1C}$
QIAprep Spin Miniprep	27106	Qiagen	Plasmidpräparation, kleinere Mengen
Qiagen Plasmid Maxi	12165	Qiagen	Plasmidpräparation, größere Mengen
QIAquick Gel extraction	28704	Qiagen	Gelaufreinigung von DNA
Quick Change Site-directed Mutagenesis	200518	Stratagene	Gezieltes Einführen von Mutationen

**Zellen zur Transformation**

Zellen	Art.Nr.	Bezugsquelle	Verwendungszweck
One Shot Top10	C4040-10	Invitrogen	Transformationen

**Vektoren**

Name	Bezugsquelle
pcDNA3	Invitrogen
pEYFP	Clontech
pIRES	Clontech
pCR2.1	Invitrogen

**A.4.2 Medien und Puffer für HEK- und Neuronen-Zellkultur**

**DMEM** Cat. No. 21885-025, Gibco™, Invitrogen Corp., Dulbecco's Modified Eagle Medium

Zusatz (*nicht* bei Kultivierung auf Chip): 10 % FKS, Gibco™ 40F6414K (30 min hitzeinaktiviert bei 56 °C)

Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes: zusätzlich 200 µg/ml Geneticin und 100 µg/ml Hygromycin

**Hygromycin** Cat.No. 631309, BD Biosciences, Hygromycin B  
50 mg/ml Lösung, 4 °C

**G-418** Cat.No. 11811-064, Gibco™, Invitrogen Corp., Geneticin G-418  
40 mg/ml Stammcklösung in PBS, 4 °C, höchstens 5 Tage verwendet.

**D-PBS** Cat. No. 14040-091, Gibco™, Invitrogen Corp., Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

**Ca<sup>2+</sup>-freies D-PBS** Cat. No. 14190-136, Gibco™, Invitrogen Corp., Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>

**Trypsin-EDTA** Cat.No. 12400-054, Gibco™, Invitrogen Corp., Trypsin-EDTA 10x 1:10 verdünnt und aliquotiert, -20 °C

**Fibronektin** Cat.No. F 2006, Sigma  
 1 mg/ml Stammlösung in PBS, 4 °C, bis zu drei Monate  
 10 µg/ml Lösung in Endkonzentration in PBS, 4 °C, nur etwa 1 Woche verwendbar

**NS 4x Stammlösung**

Substanz	Konzentration
NaCl	160 mM
KCl	6.8 mM
CaCl <sub>2</sub>	16.4 mM
MgCl <sub>2</sub>	6.0 mM
HEPES	40 mM

pH7.9 (NaOH), sterilfiltrieren

**NS** Normal Saline, 1 l hergestellt aus 250 ml NS 4x Stammlösung und 750 ml Aqua ad. Sterilfiltrieren!

**ABS** Anti-Biotic Saline, 0.5 l hergestellt aus 0.5 l NS, 10 ml Gentamicin-Stammlösung, 0.75 ml Ampicillin-Stammlösung. ABS wurde als Extrazelluläre Messlösung in den Experimenten mit Wachstumskegeln eingesetzt ( $\rho_E = 165 \Omega \text{ cm}$ ).

**DM**

Substanz	Konzentration
L-15 Leibovitz Medium, modified	500 ml
L-Glutamine	150 mg
D(+)-Glucose	54.05 mg
4x NS Stammlösung	250 ml
Aqua ad	246.4 ml
Gentamicin Stammlösung	3.3 ml
Ampicillin Stammlösung	400 µl

**HODM**

Substanz	Konzentration
DM	20 ml
D(+)-Glucose, 1 M Stammlösung	750 µl

**Ampicillin** Cat.No. 11593-027, Gibco™, Invitrogen Corp., Ampicillin sodium salt 100 mg/ml Stammlösung in Aqua ad, -20 °C

**Gentamicin** Cat.No. G 3632, Sigma-Aldrich, Gentamicinsulfatsalz  
7.5 mg/ml Stammlösung in Aqua ad,  $-20^{\circ}\text{C}$

**Trypsin** Cat.No. T 4665, Sigma, Trypsin Lyophilized Powder  
eingesetzte Endkonzentration: 6 mg/3 ml in DM

**Trypsininhibitor** Cat.No. T9003, Sigma-Aldrich, Trypsin Inhibitor from Glycine max  
in Pulverform, eingesetzte Endkonzentration: 6 mg/3 ml in DM

**PLL** Cat.No. P 1274, Sigma-Aldrich, Poly-L-Lysin, Molekulargewicht 70 000 bis 150 000  
in Pulverform bei  $-20^{\circ}\text{C}$   
1 mg/ml Stammlösung in Tris/HCl-Puffer pH 8.4,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  
Verwendung bis spätestens 2 Wochen

**Tris-Puffer** Cat.No.T 6066, Sigma, Trizma Base  
1.816 g auf 100 ml, pH 8.4, sterilfiltrieren,  $4^{\circ}\text{C}$

### A.4.3 Weitere Stammlösungen

#### CaCl<sub>2</sub>-Lösung

Substanz	Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	2.5 M
in Millipore H <sub>2</sub> O, $4^{\circ}\text{C}$	

**CdCl<sub>2</sub>** Cat.No. C-2544, Sigma-Aldrich  
100 mM in Aqua ad, sterilfiltriert,  $4^{\circ}\text{C}$

**Chloroquin** Cat.No. C-6628, Sigma-Aldrich, Chloroquin diphosphate salt  
25 mM Stammlösung in PBS, Endkonzentration 25  $\mu\text{M}$  in DM

**FPL** Cat.No. F-131, Sigma-Aldrich, FPL 64176  
10 mM Lösung in DMSO,  $4^{\circ}\text{C}$ , täglich frisch eingewogen

**Fura-2** Cat.No. F-1200, Molecular Probes, Invitrogen Corp., Fura-2 pentapotassium salt  
1 mM Stammlösung in Aqua ad,  $4^{\circ}\text{C}$   
eingesetzte Endkonzentration: 500 mM in ICL

**Fura-2 AM** Cat.No. F 1200, Molecular Probes, Invitrogen Corp., Fura-2 Acetomethylester special packaging  
1 mM Stammlösung in DMSO,  $-20^{\circ}\text{C}$   
eingesetzte Endkonzentration Schnecken: 5  $\mu\text{M}$  in ABS  
eingesetzte Endkonzentration HEK-Zellen: 2  $\mu\text{M}$  in DMEM ohne FKS

**HeBS (2x)**

Substanz	Konzentration
NaCl	274 mM
HEPES	40 mM
D(+)-Glucose	12 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4 mM

pH 7.05, in Millipore H<sub>2</sub>O, -20 °C

**Ionomycin** Cat.No. N 407951, Calbiochem, Merck, Ionomycin Free Acid, 1mg in solution

5 mM Stammlösung in DMSO, 4 °C

**Monensin** Cat.No. M 5273, Sigma-Aldrich, Monensin A sodium salt

10 mM Stammlösung in EtOH, -20 °C

**Nifedipine** Cat.No. N 7634, Sigma-Aldrich

10 mM Stammlösung in EtOH, -20 °C

**Nigericin** Cat.No. N 7143, Sigma-Aldrich, Nigericin sodium salt

5 mM Stammlösung in EtOH, -20 °C

**Nitrendipine** Cat.No. N 144, Sigma-Aldrich

1 mM Stammlösung in DMSO, -20 °C

**TE**

Substanz	Konzentration
Tris	1 mM
EDTA	0.1 mM

pH 7.6 (HCl), in Millipore H<sub>2</sub>O, 4 °C

**A.4.4 Messlösungen für Elektrophysiologie und Fluoreszenzmessungen**

**Lösungspaar 1:**

**ECL 1**

Substanz	Konzentration
NMDG	125 mM
BaCl <sub>2</sub>	20 mM
CsCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	5 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4 (CsOH), 307 mOsm/kg,  $\rho = 70 \Omega \text{ cm}$

**ICL 1**

Substanz	Konzentration
CsCl	60 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	11 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Aspartat	50 mM
Glucose	50 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4 (CsOH), 296 mOsm/kg

**Lösungspaar 2:****ECL 2**

Substanz	Konzentration
BaCl <sub>2</sub>	20 mM
CsCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose	205 mM
HEPES	10 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4 (HCl/CsOH), 295 mOsm/kg,  $\rho = 200 \Omega \text{ cm}$

**ICL 2 = ICL 1****Lösungspaar 3:****ECL 3**

Substanz	Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	20 mM
CsCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose	205 mM
HEPES	10 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(HCl), 295 mOsm/kg,  $\rho = 200 \Omega \text{ cm}$

**ICL 3 = ICL 1****Lösungspaar 4:****ECL 4**

Substanz	Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	20 mM
Glucose	200 mM
HEPES	10 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(CaOH, HCl), 304 mOsm/kg,  $\rho = 260 \Omega \text{ cm}$

**ICL 4 a**

Substanz	Konzentration
NMDG	140 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(HCl), 290 mOsm/kg

**ICL 4 b**

Substanz	Konzentration
NMDG	280 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
HEPES	20 mM
Glucose	20 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(HCl), 306 mOsm/kg

Zum Einsatz in simultanen *Patch Clamp*- und Fluoreszenzexperimenten wurde diese 2fach Stammlösung hergestellt (siehe Punkt 3.5.3):

ICL 4 2x wurde 1:1 wurde jeden Tag frisch mit der 1 mM Fura-2 Pentapotassiumsalz Stammlösung gemischt, über Sterilfilter in der Zentrifuge gereinigt und dann verwendet.

**Lösungspaar 5: Physiologische Messlösung**

**ECL 5**

Substanz	Konzentration
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(NaOH), 320 mOsm/kg,  $\rho = 60 \Omega \text{ cm}$

**ICL 5**

Substanz	Konzentration
NMDG	140 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
Fura-2 PPSalz	0.5 mM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(HCl), 306 mOsm/kg

**Lösungen für die Kalibrierung der HEK-Zellen:****ECL 6**

Substanz	Konzentration
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
EGTA	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
Ionomycin	5 µM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(NaOH), 326 mOsm/kg

**ECL 7**

Substanz	Konzentration
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
Monensin	10 µM
Nigericin	5 µM
Ionomycin	5 µM

in Millipore H<sub>2</sub>O, pH7.4(NaOH), 322 mOsm/kg

**Lösungen für die Kalibrierung der Wachstumskegel:****ECL 8**

Substanz	Konzentration
NaCl	40 mM
KCl	1.7 mM
EGTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
HEPES	10 mM
Ionomycin	5 µM

in Aqua ad, pH7.9(NaOH), 115 mOsm/kg

**ECL 9**

Substanz	Konzentration
NaCl	40 mM
KCl	1.7 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
HEPES	10 mM
Monensin	10 µM
Nigericin	5 µM
Ionomycin	5 µM

in Aqua ad, pH7.9(NaOH), 120 mOsm/kg

**A.4.5 Geräte und Verbrauchsmaterial**
**Geräte**

Gerät	Typ	Hersteller
<i>Patch Clamp</i> -Verstärker	EPC10	HEKA, Lambrecht
PC Schnittstellenkarte	PCI-1600	HEKA, Lambrecht
Andor iXon EMCCD Kamera	DV885JCS-VP	BFi OPTILAS GmbH, Puchheim
Controller Karte	CCI-22 PCI	BFi OPTILAS GmbH, Puchheim
Mikroskop	BX 50 WI	Olympus
I/V-Konverter	AD6235	Analog Devices
Monochromator	FL 3095	Spectralytics GmbH, Aalen
Prozessor PC1	AMD Athlon	AMD, USA
Prozessor PC2	Intel(R)Core(TM)	Intel, USA
Pipettenpuller	DMZ Universal	Zeitz Instruments, Martinsried
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore GmbH, Schwalbach
Osmometer	Osmomat 030	Gonotec GmbH, Berlin
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Messgeräte GmbH, Berlin
Leitfähigkeitsmessgerät	InoLab Cond Level 1	WTW, Weilheim

**Mikroskop**

Bauteil	Typ	Hersteller
Auffichtmikroskop	BX50WI	Olympus, Hamburg
Immersionsobjektiv, 40x	LUM Plan Fl 0.80 W	Olympus, Hamburg
Polarisator	U-PO	Olympus, Hamburg
Analysator	U-AN360	Olympus, Hamburg
Wollaston-Prisma	U-DICT	Olympus, Hamburg
Lichtquelle für DIC und YFP	TH3	Olympus, Hamburg
Halogenlampe	HLX64625	Osram, München

**Zellkultur**

Material	Typ	Hersteller
HEK293	-	American Cell Type Culture Collection
Ca <sub>v</sub> 1.2	-	PD Dr. med. Sven Moosmang, TU München
<i>Lymnea stagnalis</i>	-	VU Amsterdam, Niederlande
Präparationsbesteck	-	Fine Science Tools, Heidelberg
Saugpipetten	# TW150-6	WPI, Sarasota, FL, USA
Mikroliterspritze	# 1750LT	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikromanipulator	# 640055	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Stereomikroskop	Wild M3C	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Schwanenhalslampe	KL1500 electronic	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Zellkulturschalen	# 150350	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
	Falcon™ 35-3001	BD Biosciences, Heidelberg

**Elektrophysiologie**

Bauteil	Typ	Hersteller
<i>Patch Clamp</i> -Verstärker	EPC10	HEKA Elektronik, Lambrecht
Ag/AgCl-Badelektrode	EP05	WPI, Sarasota, FL, USA
Mikromanipulator	PatchMan	Eppendorf, Hamburg
Patchpipetten	GB 150-T10	Science Products GmbH, Hofheim
Befüllspitzen	MF34G-5	WPI, Sarasota, FL, USA
Sterilfilter für Zentrifuge	UFC30GV25	Millipore GmbH, Schwalbach

**Chips**

Material	Typ	Hersteller
Zellkulturschalen	# 35-3001	BD Biosciences, Heidelberg
MK3 Kleber	# 53300-04	Sulzer Osypka, Rheinfelden-Herten
Spülmittel	Tickopur R-36	Bandelin, Berlin
Kosmetiktücher	# 140272	SCA Tissue, Neenah, WI, USA
Chipkammern	-	Eigenherstellung aus Polypropylen

**Chemikalien**

Stoff	Art. Nr.	Hersteller
Aceton	1.00014	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aspartat	A93100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad	-	B. Braun AG, Melsungen
BaCl <sub>2</sub>	B-0750	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub>	C-7902	Sigma-Aldrich, Steinheim
CdCl <sub>2</sub>	C-2544	Sigma-Aldrich, Steinheim
CsCl	21000-50G-F	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Glucose	15023-021	Gibco™, Invitrogen Corp.
DMSO	41647	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	E-5134	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA	E-4378	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	32205	Riedel-de Haen
HEPES	05288	BIOMOL GmbH, Hamburg
Isopropanol	1.09634	Merck, Darmstadt
KCl	P-4504	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-15 Leibovitz, modified	21083027	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	G-3126	Sigma-Aldrich, Steinheim
Listerine Original	-	Pfizer Consumer Healthcare, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	M-2393	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	S-5886	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	S-5136	Sigma-Aldrich, Steinheim
NMDG	M-2004	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	4855.2	ROTH
Trizma Base	T-6066	Sigma-Aldrich, Steinheim

**A.4.6 Software**

Funktion	Name	Bezugsquelle
Betriebssystem	Windos XP Prof.	Microsoft, Unterschleißheim
Ansteuerung EPC10	Patchmaster 2.10	HEKA Elektronik, Lambrecht
Datenerfassung	Patchmaster 2.10	HEKA Elektronik, Lambrecht
Datenauswertung	OriginPro 7	OriginLab Corporation, MA, USA
	Igor Pro 5.01	WaveMetrics, OR, USA
Graphiken	CorelDraw X3	Corel, Unterschleißheim
Textlayout	MikTEX 2.7	Freeware, www.miktex.org
	LyX 1.5	Freeware, www.lyx.org
Bildaufnahme	Andor iXon	BFi OPTILAS GmbH, Puchheim
Plasmidkarten	OMIGA 2.0	Oxford Molecular Ltd., Oxford, UK

## A.5 Abkürzungen

ABS	<i>Antibiotic Saline</i>
AP	Aktionspotential
$[Ca^{2+}]_i$	Freie intrazelluläre Calciumkonzentration
CDC	<i>Caudo Dorsal Cells</i>
CGC	<i>Cerebral Giant Cells</i>
DC	<i>Direct Current</i>
df	<i>downstream forward</i>
DHP	Dihydropyridin
DIC	<i>Difference Interference Contrast</i>
DM	Definiertes Medium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dr	<i>downstream reverse</i>
ECL	Extrazellulärlösung
EF	Elektrisches Feld
FKS	Fötale Kälberserum
FPL	FPL 64176
HeBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HODM	Hochosmolares Definiertes Medium
HVA	<i>High Voltage Activated</i>
ICL	Intrazellulärlösung
LVA	<i>Low Voltage Activated</i>
NIF	Nifedipine
NIT	Nitrendipine
NMDG	N-methyl-D-Glutamin
NS	<i>Normal Saline</i>
OPV	Operationsverstärker

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Poly Chain Reaction</i>
PLL	Poly-L-Lysin
QMSDM	<i>Quick Change Multisite Directed Mutagenesis</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
SDM	<i>Site Directed Mutagenesis</i>
TE	Tris-EDTA Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
uf	<i>upstream forward</i>
ur	<i>upstream reverse</i>
VDCC	<i>Voltage Dependent Calcium Channel</i>
WK	Wachstumskegel

# Literaturverzeichnis

- [1] M.T. Alonso, P. Chamero, C. Villalobos, and J. Garcia-Sancho. Fura-2 antagonises calcium-induced calcium release. *Cell Calcium*, 33(1):27–35, 2003.
- [2] T. Angelotti and F. Hofmann. Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel  $\alpha_2/\delta$  subunit. *FEBS Letters*, 397(2-3):331–337, 1996.
- [3] CM Armstrong. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *The Journal of General Physiology*, 70(5):567–590, 1977.
- [4] M. Biel, P. Ruth, E. Bosse, R. Hullin, W. Stühmer, V. Flockerzi, and F. Hofmann. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett*, 269(2):409–12, 1990.
- [5] J. Black, T.J.J.R. Baranowski, and CT Brighton. Electrochemical aspects of d. c. stimulation of osteogenesis. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, 12(3-4):323–327, 1984.
- [6] RM Brawley and MM Hosey. Identification of two distinct proteins that are immunologically related to the alpha 1 subunit of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 267(25):18218–18223, 1992.
- [7] LJ Breckenridge, RJA Wilson, P. Connolly, ASG Curtis, JAT Dow, SE Blackshaw, and CDW Wilkinson. Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in vitro neuronal recording. *Journal of Neuroscience Research*, 42(2):266–276, 1995.
- [8] V. Bugaj, V. Alexeenko, A. Zubov, L. Glushankova, A. Nikolaev, Z. Wang, E. Kaznacheyeva, I. Bezprozvanny, and G.N. Mozhayeva. Functional Properties of Endogenous Receptor-and Store-operated Calcium Influx Channels in HEK293 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17):16790, 2005.
- [9] A.J. Chien, X. Zhao, R.E. Shirokov, T.S. Puri, C.F. Chang, D. Sun, E. Rios, and M.M. Hosey. Roles of a Membrane-localized beta Subunit in the Formation and Targeting of Functional L-type Ca Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50):30036, 1995.
- [10] M.R. Cho, J.P. Marler, H.S. Thatte, and D.E. Golan. Control of calcium entry in human fibroblasts by frequency-dependent electrical stimulation. *Front. Biosci*, 7:a1–a8, 2002.

- [11] CS Cohan, JA Connor, and SB Kater. Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *Journal of Neuroscience*, 7(11):3588–3599, 1987.
- [12] C.S. Cohan, J.L. Karnes, and F.Q. Zhou. Culturing neurons from the snail *Helisoma*. *Methods in cell biology*, 71:157–170, 2003.
- [13] J.A. Connor. Digital Imaging of Free Calcium Changes and of Spatial Gradients in Growing Processes in Single, Mammalian Central Nervous System Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(16):6179–6183, 1986.
- [14] JA Connor, SB Kater, C. Cohan, and L. Fink. Ca<sup>2+</sup> dynamics in neuronal growth cones: regulation and changing patterns of Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell Calcium*, 11(2-3):233–9, 1990.
- [15] RJ Cork, ME McGinnis, J. Tsai, and KR Robinson. The growth of PC 12 neurites is biased towards the anode of an applied electric field. *Journal of neurobiology*, 25(12):1509–1516, 1994.
- [16] RW Davenport and SB Kater. Local increases in intracellular calcium elicit local filopodial responses in *helisoma* neuronal growth cones. *Neuron(Cambridge, Mass.)*, 9(3):405–416, 1992.
- [17] R.W. Davenport and C.D. McCaig. Hippocampal growth cone responses to focally applied electric fields. *Journal of Neurobiology*, 24:89–89, 1993.
- [18] KS De Jongh, C. Warner, AA Colvin, and WA Catterall. Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23):10778, 1991.
- [19] S. Dertinger. *Kontrolle des neuronalen Wachstums durch elektrische Felder auf chemisch mikrostrukturiertem Silizium*. PhD thesis, Technische Universität München, 1998.
- [20] AMC Dreijer and KS Kits. Multiple second messenger routes enhance two high-voltage-activated calcium currents in molluscan neuroendocrine cells. *Neuroscience*, 64(3):787–800, 1995.
- [21] SD Dwyer, Y. Zhuang, and JB Smith. Calcium mobilization by cadmium or decreasing extracellular Na<sup>sup+</sup> or pH in coronary endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 192(1), 1991.
- [22] L. Erskine and CD McCaig. Growth Cone Neurotransmitter Receptor Activation Modulates Electric Field-Guided Nerve Growth. *Developmental Biology*, 171(2):330–339, 1995.
- [23] E.A. Ertel, K.P. Campbell, M.M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T.P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, et al. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron*, 25(3):533–535, 2000.

- [24] DS Faber and H. Korn. Electrical field effects: their relevance in central neural networks. *Physiological Reviews*, 69(3):821–863, 1989.
- [25] M. Fainzilber, J.C. Lodder, R.C. Van der Schors, K.W. Li, Z. Yu, A.L. Burlingame, W.P.M. Geraerts, and K.S. Kits. A novel hydrophobic-conotoxin blocks molluscan dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry*, 35(26):8748–8752, 1996.
- [26] M. Fainzilber, R. van der Schors, J.C. Lodder, K.W. Li, W.P.M. Geraerts, and K.S. Kits. New Sodium Channel-Blocking Conotoxins Also Affect Calcium Currents in *Lymnaea* Neurons. *Biochemistry*, 34(16):5364–5371, 1995.
- [27] J. Fan. The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *The Journal of Cell Biology*, 121(4):867–878, 1993.
- [28] AP Fox, MC Nowycky, and RW Tsien. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *The Journal of Physiology*, 394(1):149–172, 1987.
- [29] D. Freise, B. Held, U. Wissenbach, A. Pfeifer, C. Trost, N. Himmerkus, U. Schweig, M. Freichel, M. Biel, F. Hofmann, et al. Absence of the gamma Subunit of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Increases L-type  $\text{Ca}^{2+}$  Currents and Alters Channel Inactivation Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19):14476–14481, 2000.
- [30] P. Fromherz. *Bioelectronics: From Theory to Applications*, chapter The neuron-semiconductor interface, pages 339–394. Wiley -VCH Verlag, 2005.
- [31] T. Gao, A.E. Cuadra, H. Ma, M. Bunemann, B.L. Gerhardtstein, T. Cheng, R.T. Eick, and M.M. Hosey. C-terminal Fragments of the  $\alpha 1\text{C}$  ( $\text{CaV}1. 2$ ) Subunit Associate with and Regulate L-type Calcium Channels Containing C-terminal-truncated  $\alpha 1\text{C}$  Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24):21089–21097, 2001.
- [32] T. Gao, T.S. Puri, B.L. Gerhardtstein, A.J. Chien, R.D. Green, and M.M. Hosey. Identification and Subcellular Localization of the Subunits of L-type Calcium Channels and Adenylyl Cyclase in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31):19401–19407, 1997.
- [33] L. Garcia, G. D’Alessandro, B. Bioulac, and C. Hammond. High-frequency stimulation in Parkinson’s disease: more or less? *Trends in Neurosciences*, 28(4):209–216, 2005.
- [34] T.M. Gomez and J.Q. Zheng. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2):115, 2006.
- [35] G. Grynkiewicz, M. Poenie, and RY Tsien. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3440–3450, 1985.
- [36] F. Hague, F. Matifat, L. Louvet, G. Brúle, and T. Collin. The carcinogen  $\text{Cd}^{2+}$  activates  $\text{InsP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release through a specific metal ions receptor in *Xenopus* oocyte. *Cellular Signalling*, 12(6):419–424, 2000.

- [37] OP Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and FJ Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2):85–100, 1981.
- [38] JW Hell, CT Yokoyama, ST Wong, C. Warner, TP Snutch, and WA Catterall. Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26):19451–19457, 1993.
- [39] J. Henley and M. Poo. Guiding neuronal growth cones using Ca<sup>2+</sup> signals. *Trends in Cell Biology*, 14(6):320–330, 2004.
- [40] J.R. Henley, K. Huang, D. Wang, and M. Poo. Calcium Mediates Bidirectional Growth Cone Turning Induced by Myelin-Associated Glycoprotein. *Neuron*, 44(6):909–916, 2004.
- [41] M. Hibino, M. Shigemori, H. Itoh, K. Nagayama, and K. Kinoshita. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal*, 59(1):209–220, 1991.
- [42] L. Hinkle, CD McCaig, and KR Robinson. The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field. *The Journal of Physiology*, 314(1):121–135, 1981.
- [43] SY Ho and GS Mittal. Electroporation of Cell Membranes: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 16(4):349–362, 1996.
- [44] L.R. Hochberg, M.D. Serruya, G.M. Friehs, J.A. Mukand, M. Saleh, A.H. Caplan, A. Branner, D. Chen, R.D. Penn, and J.P. Donoghue. Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia. *Nature*, 442:164–171, 2006.
- [45] K. Hong, M. Nishiyama, J. Henley, M. Tessier-Lavigne, and M.M. Poo. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature*, 403(6765):93–98, 2000.
- [46] R. Horn. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *The Journal of General Physiology*, 92(2):145–159, 1988.
- [47] C.Q. Huang, R.K. Shepherd, P.M. Seligman, and G.M. Clark. Reduction in excitability of the auditory nerve following acute electrical stimulation at high stimulus rates: III. Capacitive versus non-capacitive coupling of the stimulating electrodes. *Hearing Research*, 116(1-2):55–64, 1998.
- [48] K. Hui, G.H. Fei, B.J. Saab, J. Su, J.C. Roder, and Z.P. Feng. Neuronal calcium sensor-1 modulation of optimal calcium level for neurite outgrowth. *Development*, 134(24):4479, 2007.
- [49] K. Hui and Z.P. Feng. NCS-1 differentially regulates growth cone and somata calcium channels in *Lymnaea* neurons. *European Journal of Neuroscience*, 27(3):631–643, 2008.

- [50] K. Hui, P. Gardzinski, H.S. Sun, P.H. Backx, and Z.P. Feng. Permeable ions differentially affect gating kinetics and unitary conductance of L-type calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2):783–792, 2005.
- [51] R. Hullin, D. Singer-Lahat, M. Freichel, M. Biel, N. Dascal, F. Hofmann, and V. Flockerzi. Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *The EMBO Journal*, 11(3):885, 1992.
- [52] J.T. Hulme, V. Yarov-Yarovoy, T.W.C. Lin, T. Scheuer, and W.A. Catterall. Autoinhibitory control of the CaV1. 2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *The Journal of Physiology*, 576(1):87–102, 2006.
- [53] LF Jaffe and MM Poo. Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady field. *J Exp Zool*, 209(1):115–28, 1979.
- [54] A. Kameyama, K. Yazawa, M. Kaibara, K. Ozono, and M. Kameyama. Run-down of the cardiac Ca<sup>2+</sup> channel: characterization and restoration of channel activity by cytoplasmic factors. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 433(5):547–556, 1997.
- [55] SB Kater, MP Mattson, and PB Guthrie. Calcium-Induced Neuronal Degeneration: A Normal Growth Cone Regulating Signal Gone Awry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 568(1 Calcium, Membranes, Aging, and Alzheimer’s Disease):252–261, 1989.
- [56] SB Kater and LR Mills. Regulation of growth cone behavior by calcium. *Journal of Neuroscience*, 11(4):891–899, 1991.
- [57] RA Kaul. *Chemical synapses on semiconductor chips*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2007.
- [58] H.J. Kennedy and R.C. Thomas. Intracellular calcium and its sodium-independent regulation in voltage-clamped snail neurones. *The Journal of Physiology*, 484(3):533–548, 1995.
- [59] K. Kinoshita and T.Y. Tsong. Hemolysis of Human Erythrocytes by a Transient Electric Field. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(5):1923–1927, 1977.
- [60] T. Kiss and ON Osipenko. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacological Reviews*, 46(3):245–267, 1994.
- [61] K.S. Kits, J.C. Lodder, R.C. van der Schors, K.W. Li, W.P.M. Geraerts, and M. Fainzilber. Novel [omega]-Conotoxins Block Dihydropyridine-Insensitive High Voltage-Activated Calcium Channels in Molluscan Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 67(5):2155, 1996.
- [62] K.S. Kits and H.D. Mansvelder. Voltage gated calcium channels in molluscs: classification, Ca<sup>2+</sup> dependent inactivation, modulation and functional roles. *Invertebrate Neuroscience*, 2(1):9–34, 1996.

- [63] N. Klauke, G.L. Smith, and J. Cooper. Stimulation of Single Isolated Adult Ventricular Myocytes within a Low Volume Using a Planar Microelectrode Array. *Biophysical Journal*, 85(3):1766–1774, 2003.
- [64] N. Klugbauer, L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom, and F. Hofmann. Molecular Diversity of the Calcium Channel  $\alpha_2\delta$  Subunit. *Journal of Neuroscience*, 19(2):684–691, 1999.
- [65] DL Kunze and D. Rampe. Characterization of the effects of a new  $\text{Ca}^{2+}$  channel activator, FPL 64176, in GH3 cells. *Molecular Pharmacology*, 42(4):666–670, 1992.
- [66] L. Lacinova, RH An, J. Xia, H. Ito, N. Klugbauer, D. Triggle, F. Hofmann, and RS Kass. Distinctions in the Molecular Determinants of Charged and Neutral Dihydropyridine Block of L-Type Calcium Channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3):1472–1479, 1999.
- [67] L. Lacinova and F. Hofmann.  $\text{Ca}^{2+}$ -and voltage-dependent inactivation of the expressed L-type Cav1.2 calcium channel. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 437(1):42–50, 2005.
- [68] A. Lambacher, M. Jenkner, M. Merz, B. Eversmann, RA Kaul, F. Hofmann, R. Thewes, and P. Fromherz. Electrical imaging of neuronal activity by multi-transistor-array (MTA) recording at  $7.8 \mu\text{m}$  resolution. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 79(7):1607–1611, 2004.
- [69] L. Liu, P.K. Gonzalez, C.F. Barrett, and A.R. Rittenhouse. The calcium channel ligand FPL 64176 enhances L-type but inhibits N-type neuronal calcium currents. *Neuropharmacology*, 45(2):281–292, 2003.
- [70] R. Llinas, M. Sugimori, DE Hillman, and B. Cherksey. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci*, 15(9):351–5, 1992.
- [71] R. Llinas, M. Sugimori, J.W. Lin, and B. Cherksey. Blocking and Isolation of a Calcium Channel from Neurons in Mammals and Cephalopods Utilizing a Toxin Fraction (FTX) from Funnel-Web Spider Poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(5):1689–1693, 1989.
- [72] M.P. Maher, J. Pine, J. Wright, and Y.C. Tai. The neurochip: a new multielectrode device for stimulating and recording from cultured neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 87(1):45–56, 1999.
- [73] CD McCaig. Studies on the mechanism of embryonic frog nerve orientation in a small applied electric field, 1989.
- [74] C.D. McCaig, A.M. Rajnicek, B. Song, and M. Zhao. Controlling Cell Behavior Electrically: Current Views and Future Potential. *Physiological Reviews*, 85(3):943–978, 2005.
- [75] EW McCleskey, AP Fox, DH Feldman, LJ Cruz, BM Olivera, RW Tsien, and D. Yoshikami.  $\omega$ -conotoxin: Direct and Persistent Blockade of Specific Types of Calcium

- Channels in Neurons but not Muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(12):4327–4331, 1987.
- [76] S.I. McDonough, Y. Mori, and B.P. Bean. FPL 64176 Modification of CaV1. 2 L-Type Calcium Channels: Dissociation of Effects on Ionic Current and Gating Current. *Biophysical Journal*, 88(1):211–223, 2005.
- [77] NCL McNaughton and AD Randall. Electrophysiological properties of the human N-type Ca<sup>2+</sup> channel: I. Channel gating in Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> containing solutions. *Neuropharmacology*, 36(7):895–915, 1997.
- [78] I.M. Mintz, V.J. Venema, K.M. Swiderek, T.D. Lee, B.P. Bean, and M.E. Adams. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature*, 355(6363):827–829, 1992.
- [79] G. Molnár, J. Salánki, and T. Kiss. Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain Research*, 1008(2):205–211, 2004.
- [80] Y. Mori, T. Friedrich, M.S. Kim, A. Mikami, J. Nakai, P. Ruth, E. Bosse, F. Hofmann, V. Flockerzi, T. Furuichi, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature*, 350(6317):398–402, 1991.
- [81] E. Neher. The use of fura-2 for estimating ca buffers and ca fluxes. *Neuropharmacology*, 34(11):1423–1442, 1995.
- [82] E. Neher and GJ Augustine. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 450(1):273–301, 1992.
- [83] E Neher and B Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers. *Nature*, 260(5554):799–802, 1976.
- [84] M. Nishiyama, A. Hoshino, L. Tsai, J.R. Henley, Y. Goshima, M. Tessier-Lavigne, M. Poo, and K. Hong. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*, 423(6943):990–995, 2003.
- [85] G.J. Obermair, Z. Szabo, E. Bourinet, and B.E. Flucher. Differential targeting of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha1C (CaV1. 2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 19(8):2109–2122, 2004.
- [86] N. Ooashi, A. Futatsugi, F. Yoshihara, K. Mikoshiba, and H. Kamiguchi. Cell adhesion molecules regulate Ca<sup>2+</sup>-mediated steering of growth cones via cyclic AMP and ryanodine receptor type 3. *The Journal of Cell Biology*, 2005.
- [87] S. Papp, M.P. Fadel, M. Michalak, and M. Opas. Analysis of the suitability of calreticulin inducible HEK cells for adhesion studies: microscopical and biochemical comparisons. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1):237–248, 2008.
- [88] N. Patel and MM Poo. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. *Journal of Neuroscience*, 2(4):483–496, 1982.

- [89] NB Patel and MM Poo. Perturbation of the direction of neurite growth by pulsed and focal electric fields. *Journal of Neuroscience*, 4(12):2939–2947, 1984.
- [90] Marban E Perez-Garcia MT, Kamp TJ. Functional properties of cardiac L-type calcium channels transiently expressed in HEK293 cells. Roles of alpha 1 and beta subunits. *The Journal of General Physiology*, 105(2):289–305, 1995.
- [91] MR Plummer, DE Logothetis, and P. Hess. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, 2(5):1453–63, 1989.
- [92] KA Polak, AM Edelman, JW Wasley, and CS Cohan. A novel calmodulin antagonist, CGS 9343B, modulates calcium-dependent changes in neurite outgrowth and growth cone movements. *Journal of Neuroscience*, 11(2):534–542, 1991.
- [93] E. Pravettoni, A. Bacci, S. Coco, P. Forbicini, M. Matteoli, and C. Verderio. Different Localizations and Functions of L-Type and N-Type Calcium Channels during Development of Hippocampal Neurons. *Developmental Biology*, 227(2):581–594, 2000.
- [94] T.S. Puri, B.L. Gerhardstein, X.L. Zhao, M.B. Ladner, and M.M. Hosey. Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels. *Biochemistry*, 36(31):9605–9615, 1997.
- [95] H.W. Querfurth, N.J. Haughey, S.C. Greenway, P.W. Yacono, D.E. Golan, and J.D. Geiger. Expression of ryanodine receptors in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Biochemical Journal-London-*, 334:79–86, 1998.
- [96] D. Ragozzino, B. Barabino, S. Fucile, and F. Eusebi. Ca<sup>2+</sup> permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells. *The Journal of Physiology*, 507(3):749–757, 1998.
- [97] A.M. Rajnicek, L.E. Foubister, and C.D. McCaig. Growth cone steering by a physiological electric field requires dynamic microtubules, microfilaments and Rac-mediated filopodial asymmetry. *Journal of Cell Science*, 119(9):1736–1745, 2006.
- [98] A.M. Rajnicek, K.R. Robinson, and C.D. McCaig. The Direction of Neurite Growth in a Weak DC Electric Field Depends on the Substratum: Contributions of Adhesivity and Net Surface Charge. *Developmental Biology*, 203(2):412–423, 1998.
- [99] M.P. Rols and J. Teissie. Electropermeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration. *Biophysical Journal*, 75(3):1415–1423, 1998.
- [100] WA Sather, T. Tanabe, JF Zhang, Y. Mori, ME Adams, and RW Tsien. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron*, 11(2):291–303, 1993.
- [101] I. Schoen. *Extrazelluläre Stimulation von Ionenkanälen und Nervenzellen mittels Elektrolyt/oxid/silizium-kondensatoren*. PhD thesis, Technische Universität München, 2006.

- [102] I. Schoen and P. Fromherz. Activation of Na channels in cell membrane by capacitive stimulation with silicon chip. *Applied Physics Letters*, 87:193901, 2005.
- [103] I. Schoen and P. Fromherz. The Mechanism of Extracellular Stimulation of Nerve Cells on an Electrolyte-Oxide-Semiconductor Capacitor. *Biophysical Journal*, 92(3):1096, 2007.
- [104] I. Schoen and P. Fromherz. Extracellular Stimulation of Mammalian Neurons Through Repetitive Activation of Na<sup>+</sup> Channels by Weak Capacitive Currents on a Silicon Chip. *Journal of Neurophysiology*, 100(1):346, 2008.
- [105] A. Schuster, L. Lacinová, N. Klugbauer, H. Ito, L. Birnbaumer, and F. Hofmann. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *The EMBO Journal*, 15(10):2365, 1996.
- [106] RK Shepherd, S. Hatsushika, and GM Clark. Electrical stimulation of the auditory nerve: the effect of electrode position on neural excitation. *Hearing research*, 66(1):108–120, 1993.
- [107] D. Singer, M. Biel, I. Lotan, V. Flockerzi, F. Hofmann, and N. Dascal. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, 253(5027):1553–1557, 1991.
- [108] J.D. Spafford, D.W. Munno, P. van Nierop, Z.P. Feng, S.E. Jarvis, W.J. Gallin, A.B. Smit, G.W. Zamponi, and N.I. Syed. Calcium Channel Structural Determinants of Synaptic Transmission between Identified Invertebrate Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6):4258–4267, 2003.
- [109] K. Staras, J. Gyoori, and G. Kemenes. Voltage-gated ionic currents in an identified modulatory cell type controlling molluscan feeding. *European Journal of Neuroscience*, 15(1):109–119, 2002.
- [110] A. Stett, B. Müller, and P. Fromherz. Two-way silicon-neuron interface by electrical induction. *Physical Review E*, 55(2):1779–1782, 1997.
- [111] R. Stewart, L. Erskine, and CD McCaig. Calcium Channel Subtypes and Intracellular Calcium Stores Modulate Electric Field-Stimulated and-Oriented Nerve Growth. *Developmental Biology*, 171(2):340–351, 1995.
- [112] V.A. Straub and P.R. Benjamin. Extrinsic Modulation and Motor Pattern Generation in a Feeding Network: a Cellular Study. *Journal of Neuroscience*, 21(5):1767, 2001.
- [113] JA Strong and SA Scott. Divalent-selective voltage-independent calcium channels in Lymnaea neurons: permeation properties and inhibition by intracellular magnesium. *Journal of Neuroscience*, 12(8):2993–3003, 1992.
- [114] NI Syed, AG Bulloch, and K. Lukowiak. In vitro reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk Lymnaea. *Science*, 250(4978):282–285, 1990.

- [115] NI Syed, H. Zaidi, and P. Lovell. In vitro reconstruction of neuronal circuits: a simple model system approach. *Modern Techniques in Neuroscience Research*. U. Windhorst and H. Johansson, editors. Springer, Berlin, Heidelberg, pages 361–377, 1999.
- [116] SM Sze. Physics of semiconductor devices. *New York, Wiley-Interscience, 1981. 878 p.*, 1981.
- [117] J. Teissie and MP Rols. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65(1):409–413, 1993.
- [118] J. Teissie and T.Y. Tsong. Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry*, 20(6):1548–1554, 1981.
- [119] M.N. Teruel, T.A. Blanpied, K. Shen, G.J. Augustine, and T. Meyer. A versatile microporation technique for the transfection of cultured CNS neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 93(1):37–48, 1999.
- [120] MN Teruel and T. Meyer. Electroporation-induced formation of individual calcium entry sites in the cell body and processes of adherent cells. *Biophysical Journal*, 73(4):1785–1796, 1997.
- [121] TY Tsong. Voltage modulation of membrane permeability and energy utilization in cells. *Biosci Rep*, 3(6):487–505, 1983.
- [122] MH Ulbrich and P. Fromherz. Opening of K<sup>+</sup> channels by capacitive stimulation from silicon chip. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 81(5):887–891, 2005.
- [123] G. Varadi, P. Lory, D. Schultz, M. Varadi, and A. Schwartz. Acceleration of activation and inactivation by the bold beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature*, 352:159–162, 1991.
- [124] F Wallrapp. *Hoch-K-materialien in der Elektrolyt/isolator/silizium-konfiguration: Charakterisierung und Anwendung in der Bioelektronik*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2006.
- [125] F. Wallrapp and P. Fromherz. TiO and HfO in electrolyte-oxide-silicon configuration for applications in bioelectronics. *Journal of Applied Physics*, 99:114103, 2006.
- [126] R. Weis and P. Fromherz. Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E*, 55(1):877–889, 1997.
- [127] E.A. Welnhofner, L. Zhao, and C.S. Cohan. Actin dynamics and organization during growth cone morphogenesis in *Helisoma* neurons. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 37(1):54–71, 1997.
- [128] E.A. Welnhofner, L. Zhao, and C.S. Cohan. Calcium Influx Alters Actin Bundle Dynamics and Retrograde Flow in *Helisoma* Growth Cones. *Journal of Neuroscience*, 19(18):7971–7982, 1999.

- [129] DK Williams and CS Cohan. The role of conditioning factors in the formation of growth cones and neurites from the axon stump after axotomy. *Developmental brain research*, 81(1):89–104, 1994.
- [130] ME Williams, LM Marubio, CR Deal, M. Hans, PF Brust, LH Philipson, RJ Miller, EC Johnson, MM Harpold, and SB Ellis. Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35):22347–22357, 1994.
- [131] K. Yamagami, S. Nishimura, and M. Sorimachi. Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> at micromolar concentrations mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> via the generation of inositol 1, 4, 5-triphosphate in bovine chromaffin cells. *Brain Research*, 798(1-2):316–319, 1998.
- [132] B. Yazejian and L. Byerly. Voltage-independent barium-permeable channel activated in *Lymnaea* neurons by internal perfusion or patch excision. *Journal of Membrane Biology*, 107(1):63–75, 1989.
- [133] SH Young, M. McLoskey, and MM Poo. Migration of cell surface receptors induced by extracellular electric fields: theory and applications. *Receptors. New York: Academic*, 1, 1984.
- [134] DT Yue. Permeation in the dihydropyridine-sensitive calcium channel. Multi-ion occupancy but no anomalous mole-fraction effect between Ba<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *The Journal of General Physiology*, 95(5):911–939, 1990.
- [135] T.K. Zagranichnaya, X. Wu, and M.L. Villereal. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 Proteins Combine to Form Native Store-operated Channels in HEK-293 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33):29559, 2005.
- [136] G.W. Zamponi. *Voltage-Gated Calcium Channels*. Landes Bioscience, 2005.
- [137] G. Zeck. *Halbleiterchip mit einfachem biologischen neuronalen Netz*. PhD thesis, 2002.
- [138] JF Zhang, AD Randall, PT Ellinor, WA Horne, WA Sather, T. Tanabe, TL Schwarz, and RW Tsien. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*, 32(11):1075–88, 1993.
- [139] JQ Zheng. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature(London)*, 403(6765):89–93, 2000.
- [140] F. Zhou and C.S. Cohan. Growth Cone Collapse through Coincident Loss of Actin Bundles and Leading Edge Actin without Actin Depolymerization. *The Journal of Cell Biology*, 153(5):1071–1084, 2001.
- [141] F.Q. Zhou, C.M. Waterman-Storer, and C.S. Cohan. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *The Journal of Cell Biology*, 157(5):839, 2002.
- [142] Z. Zhou and D.M. Bers. Ca<sup>2+</sup> influx via the L-type Ca<sup>2+</sup> channel during tail current and above current reversal potential in ferret ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 523(1):57–66, 2000.

- [143] Z. Zhou and E. Neher. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 469(1):245–273, 1993.
- [144] U. Zimmermann. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *BBA-Reviews on Biomembranes*, 694(3):227–277, 1982.

# Danksagung

Ich möchte mich abschließend herzlich bedanken bei

**Prof. Dr. Peter Fromherz** für die herausfordernde Themenstellung, für seine Betreuung, seine Offenheit und seine Diskussionsbereitschaft.

**Prof. Dr. Benedikt Grothe** und **Prof. Dr. Axel Borst** für die Übernahme des Erst- und Zweitgutachtens.

**PD Dr. Sven Moosmang** für die Plasmide und die  $Ca_v1.2$ -Zellen.

**Carool Popelier** für die unermüdliche Lieferung ganzer Schnecken-Kohorten aus Amsterdam ins winterliche München.

**Frank Wallrapp** für sehr viel mehr als nur das Bereitstellen, Erklären und Betreuen des Setups und der Chips.

**Ingmar Schön** für seine geduldigen und aufschlussreichen Erläuterungen ohne die ich verloren gewesen wäre.

**Alexander Kaul** für seine gewissenhafte Einführung in die Präparationstechnik der Schneckenneurone und für die Starthilfe bei den Messungen mit Neuronen.

**Armin Lambacher** und **Günther Zeck** für das angenehme, fruchtbare und konzentrierte "Raumklima" und ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

**Ingmar Peitz** für die Einführung in die *Patch Clamp*-Technik.

**Marlon Hinner** für die dringend benötigte moralische Unterstützung.

**Christoph Becker-Freyseng** für seine stete Hilfsbereitschaft im Kampf mit dem Textverarbeitungssystem Lyx.

**Martin Wiemhöfer** für seine Hilfe beim Programmieren und seine stete Diskussionsbereitschaft.

**Ralf Zeitler** für das Korrekturlesen der Arbeit und seine Hilfsbereitschaft bei der Neuronenpräparation.

**Michaela Morawetz** für ihre unermüdliche Hilfe in Molekularbiologie und Zellkultur.

**Monika Negenborn** und **Annette Härtel** für ihre Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Belangen.

**Gerd Hübener** für seine Hilfe bei der Auftragsynthese von Peptiden.

**Helge Vogl** für seine stets freundliche und schnelle Hilfe bei allen Computer-Problemen.

**Steffi Stumhofer** und **Christian Stangl** für ihre nie ermüdenden offenen Ohren für all meine Sorgen und Nöte fachlicher und privater Natur.

allen **Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik** für ihre große Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und die tolle Zeit mit Ihnen.

**meiner Mutter, meinem Freund Michi und meinem Vater**, die mir, jeder auf seine eigene Weise, den psychologischen Rückhalt gegeben haben, ohne den die Arbeit nicht zustande gekommen wäre.



# Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe und die vorliegende Arbeit nicht bei einer anderen Hochschule eingereicht habe.

München, 25.02.2009

Kerstin Scheidt