

I. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Elektrophysiologische Eigenschaften von kultivierten Perizyten aus dem Rinderherz

Bjarne Krebs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. A. Kastrati
2. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel (em.), Ludwig-
Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 14.07.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.12.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Koronarkreislauf und koronare Herzkrankheit	1
1.2	Lokalisation und Morphologie der Perizyten	2
1.3	Funktion der Perizyten.....	5
1.4	Pathophysiologische Bedeutung der Perizyten	7
1.5	Fragestellung.....	7
2	METHODEN	9
2.1	Isolierung, Identifizierung und Kultivierung der Perizyten	9
2.1.1	Isolierung	9
2.1.2	Kultivierung	10
2.1.3	Identifikation	11
2.2	Elektrische Messungen	13
2.2.1	Allgemeines	13
2.2.2	Patch Clamp Technik.....	14
2.2.3	Versuchsaufbau.....	15
2.2.4	Meßelektroden.....	16
2.2.5	Messtechnik.....	19
2.2.6	Ablauf der Messungen.....	25
2.3	Statistik	29
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Passive elektrische Eigenschaften.....	32
3.1.1	Charakterisierung der Strom-Spannungsbeziehung	32
3.2	Membranströme bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen ...	35
3.3	Der Einwärtsstrom	37
3.3.1	Block des Einwärtsstromes durch Bariumionen.....	37
3.3.2	Charakteristik des Einwärtsstromes	40
3.4	Der Auswärtsstrom	42
3.4.1	Aktivierung des Auswärtsstromes.....	42

3.4.2	Inaktivierung des Auswärtsstromes	44
3.4.3	Spannungsabhängigkeit der Auswärtsstromaktivierung	45
3.4.4	Pharmakologische Charakterisierung des Auswärtsstromes	48
4	DISKUSSION	56
4.1	Limitationen	56
4.2	Passive elektrische Eigenschaften der Perizyten	57
4.3	Der Einwärtsstrom	58
4.4	Der Auswärtsstrom	60
4.5	Ionenströme von Perizyten aus anderen Organen.....	64
4.6	Möglicher Einfluss der gemessenen Ionenströme auf die Regulation des koronaren Blutflusses	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	DANKSAGUNG	78

1 Einleitung

1.1 Koronarkreislauf und koronare Herzkrankheit

Alle größeren Lebewesen benötigen ein Kreislaufsystem. Dieses erlaubt ihnen einen Stoffaustausch zwischen verschiedenen Organen weit über die Möglichkeiten der Diffusion hinaus. So werden bei einem Menschen im Durchschnitt fast 6 Liter Blut pro Minute umgewälzt. Die Pumpe dafür ist das Herz, dessen Leistung und damit die Blutversorgung des Körpers unter Belastung etwa um das Vierfache gesteigert werden kann. Der Herzmuskel benötigt dafür viel Energie, die durch oxidative Phosphorylierung gewonnen wird. Der Sauerstoffbedarf in Ruhe liegt bei ca. 0,08 bis 0,10 ml g⁻¹ Herzmuskel min⁻¹, welcher durch eine im Gegensatz zu anderen Geweben fast maximalen Sauerstoffausschöpfung des Blutes gedeckt wird. Da bereits in Ruhe die Ausschöpfung des Blutsauerstoffs fast ausgereizt ist, kann ein erhöhter Sauerstoffbedarf bei einer Leistungssteigerung nur durch eine Steigerung des Blutflusses gedeckt werden. Diese wird im wesentlichen durch eine Erweiterung der Koronargefäße und damit einer Reduktion des Strömungswiderstandes erreicht [67].

Die Koronargefäße bestehen aus Arterien, die sich weiter in Arteriolen und schließlich in Kapillaren verzweigen, um daraufhin über Venolen und Venen wieder zusammengeführt zu werden. Während die Kapillaren vorwiegend aus einer Röhre von Endothelzellen mit einer Basalmembran bestehen, finden sich in den nächstgrößeren Gefäßen, also den Arteriolen und Venolen, zunehmend kontraktile Zellen, wie glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten. Größere Arterien und Venen zeigen schließlich einen mehrschichtigen Wandaufbau mit elastischen und kollagenen Bindegewebsfasern. Die Arteriolen bilden den größten Strömungswiderstand und beeinflussen deshalb mit ihrem Öffnungsquerschnitt wesentlich den koronaren Blutfluss. Ihre Gefäßweite unterliegt einer komplexen Regulation, die unter anderem eine chemische und elektrische Kommunikation zwischen den Kardiomyozyten und Gefäßwandzellen beinhaltet. Im Vergleich zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen ist über die Funktion der Perizyten bisher noch wenig bekannt.

Der koronaren Herzerkrankung liegt eine Koronarinsuffizienz zugrunde. Das Sauerstoffangebot aus dem koronaren Blutkreislauf kann den Sauerstoffbedarf des Herzmuskels nicht decken. Dies ist auf einen verminderten koronaren Blutfluss durch einen erhöhten koronaren Strömungswiderstand zurückzuführen. Durch arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwände wird sowohl der Öffnungsquerschnitt, als auch die Regulationsfähigkeit reduziert. Wird im Extremfall eine minimal notwendige Blutversorgung des Herzmuskels über längere Zeit unterschritten, treten irreversible Zellschäden auf. Folge einer solchen Ischämie sind unter anderem Myokardinfarkte und Störungen des Reizleitungssystems. Aber auch ohne gravierende Zellschädigungen kann eine Beeinträchtigung der Kontraktilität und Funktion des Herzens auftreten - ausgelöst durch einen wiederholten oder chronischen Sauerstoffmangel.

In Industrienationen wie Deutschland sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache. Sie bestimmen trotz des hohen medizinischen Standard weitgehend die mittlere Lebenserwartung [10,85]. Dementsprechend hoch ist die Aufmerksamkeit, die der koronaren Herzkrankheit, ihrer Erkennung und Behandlung zukommt. Eine Grundlage dazu bildet das Verständnis der physiologischen Regulationsmechanismen der koronaren Durchblutung.

1.2 Lokalisation und Morphologie der Perizyten

Bereits vor über 100 Jahren wurde von Eberth und Rouget erstmalig der Zelltyp der Perizyten beschrieben [14,64]. Zimmermann führte 1923 für diese Zellen den Begriff „Perizyten“ ein. Er schrieb: „Perizyten finden sich angelagert an Kapillaren in einer großen Vielzahl von Geweben verschiedener Spezies, kontinuierlich mit glatten Muskelzellen“ [86]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Perizyten vorwiegend in prä- und postkapillären Gefäßabschnitten lokalisiert sind. Jeder Perizyt besitzt einen Zellkörper mit einem spindelförmigen prominenten Kern und einem schmalen Zytoplasma. Von diesem Zellkörper strecken sich lange Fortsätze aus. Mit neueren Messmethoden konnten pro 100 µm Kapillarlänge etwa 90 dieser Fortsätze gefunden werden. Die Distanz zwischen Zellkörpern

unterscheidet sich in verschiedenen Geweben und liegt bei ungefähr 50 µm bis 70 µm [32].

Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Betrachtung konnten Forbes, Rennels und Nelson 1977 eine detaillierte Beschreibung der Morphologie koronarer Perizyten liefern. Zellkörper und Fortsätze sind in die Basalmembran eingeschlossen. An der äußeren Membran finden sich kernnah vesikelartige Einstülpungen. Neben schmalen Mitochondrien, freien und membranständigen Ribosomen, endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Zentriolen wurden fibrilläre Strukturen wie Mikrotubuli, intermediäre Filamente und Mikrofilamente gefunden [19]. Die Fortsätze der Perizyten penetrieren die Basalmembran und nehmen zu dem direkt darunter liegenden Endothel Kontakt auf und in umgekehrter Weise penetrieren Fortsätze von Endothelzellen die Perizyten [76]. Dabei sind die Perizyten zirkulär ausgerichtet und bilden mit Endothelzellen verschiedene Verbindungen. Die Fortsätze der einen Zelle können in die andere Zelle eingebettet sein („Peg and Socket“ - Invaginationen) [9]. Sowohl in situ [9], als auch in Co-Kultur [21,37] wurden in Kapillaren des zentralen Nervensystems Gap Junctions zwischen Endothelzellen und Perizyten gefunden, die einen Austausch von Ionen und damit eine elektrische Kopplung ermöglichen. Darüber hinaus wurden noch weitere Kontakte zwischen Perizyten und Endothelzellen beschrieben, wie zum Beispiel Desmosomen oder verschiedene andere interzelluläre Verbindungen [70]. Eine beispielhafte Darstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Kapillaren zeigt Abbildung 1 [68]:

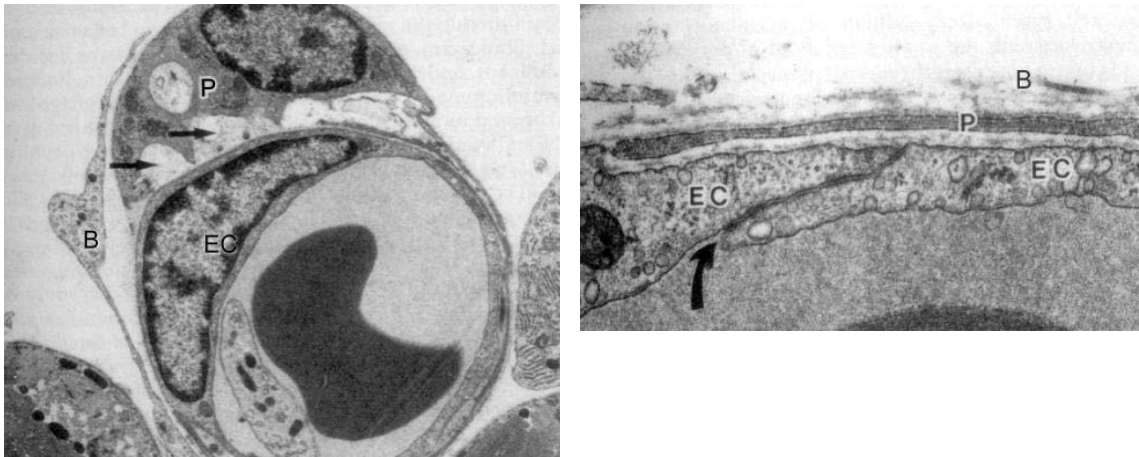


Abbildung 1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Kapillare mit einem Perizyt P und einer Endothelzelle EC, welche in die Basalmembran B eingebettet sind [68].

In den 90er Jahren konnte mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und entsprechender Vorbehandlung (Verdau des umliegenden Gewebes), die dreidimensionale Struktur der Mikrogefäße dargestellt werden (Abbildung 2). Dabei ließ sich folgendes zeigen [68,69]:

Die Perizyten bilden longitudinale Cytoplasmafortsätze, die mehrere Endothelzellen überspannen können. Von diesen Fortsätzen ersten Grades verzweigen sich rechtwinklig Fortsätze zweiten Grades, die das Gefäß zirkulär umfassen. Von dort aus gehen weitere, sehr kleine ($<1 \mu\text{m}$) Fortsätze dritten Grades aus. Es lassen sich drei Typen von Perizyten unterscheiden:

- Typ 1 Perizyten umgeben Kapillaren und haben fusiforme oder polygonale Zellkörper. Ihre longitudinalen Fortsätze ersten Grades sind lang und verzweigen sich in kurze Fortsätze zweiten Grades.
- Typ 2 Perizyten finden sich auf der arteriellen Seite der Kapillaren und bilden starke zirkumferierende, bandartige Fortsätze zweiten Grades.
- Typ 3 Perizyten wurden an Venolen gefunden und haben einen flächenhaften Zellkörper mit unregelmäßigen Fortsätzen.

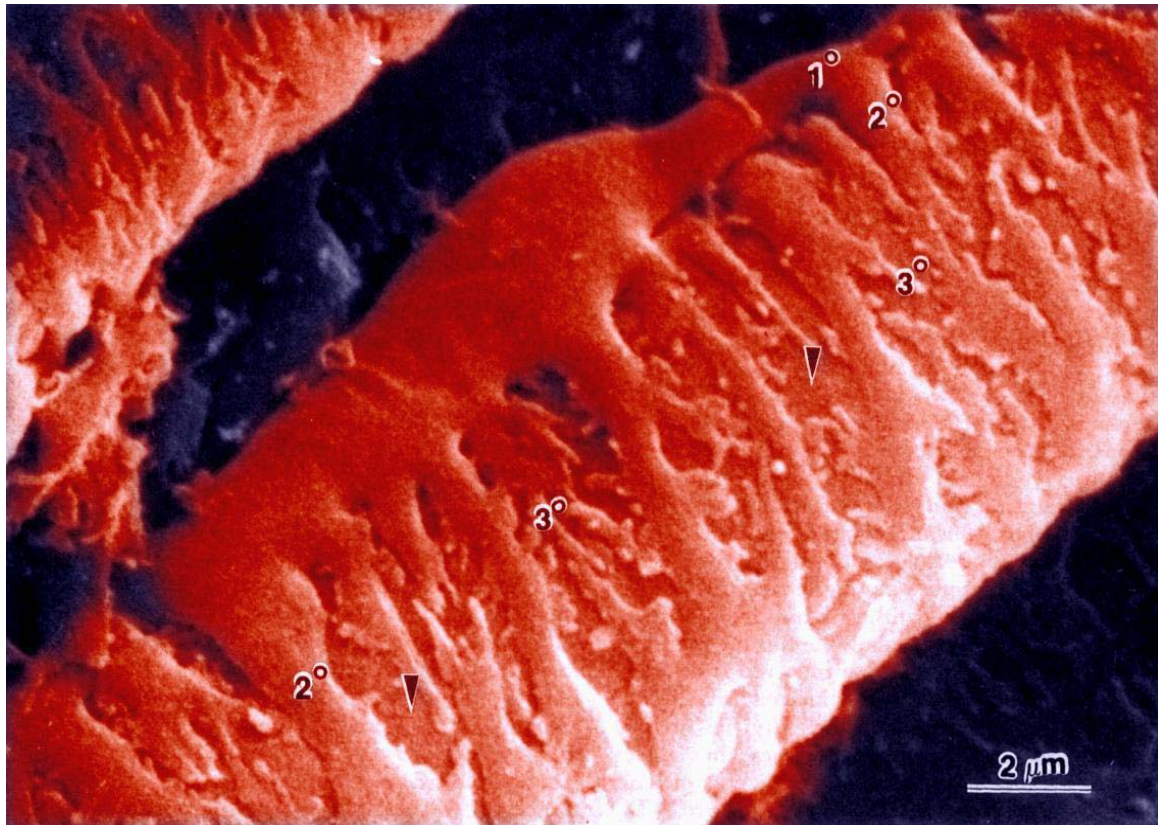


Abbildung 2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kapillare mit einem Perizyt [68].

Wie einige rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen belegen, kann ein Perizyt auch mehr als eine Kapillare umspannen [49,84]. Immunologische Färbetechniken stützen die oben beschriebene morphologische Aufteilung in präkapilläre, kapilläre und postkapilläre Perizyten. Die Mehrzahl der koronaren Perizyten befindet sich am Übergang der koronaren Arteriolen zu den Kapillaren, wo sie die Endothelzellen dicht bedecken. Die Kapillaren selber und die Venolen sind dagegen weniger dicht bedeckt [55,68].

1.3 Funktion der Perizyten

Den Perizyten wird eine Funktion bei der Regulation des Blutflusses zugeschrieben [4,32]. Perizyten umspannen die Gefäßabschnitte mit langen Fortsätzen. Untersuchungen an kultivierten Perizyten aus Rattenkapillaren [53] oder boviner Retina [45-47] konnten auf Silikonprothesen deren

Kontraktionsfähigkeit unter Angiotensin II und deren Relaxation infolge eines erhöhten CO₂-Gehaltes zeigen. Durch zirkumferierende Anordnung der Fortsätze koronarer Perizyten in den terminalen Arteriolen würde eine Kontraktion die Reduktion des Öffnungsquerschnittes und damit die Erhöhung des Strömungswiderstandes bewirken.

Eine besondere Funktion kommt den Perizyten in dem glomerulären Filtrationsapparat der Niere zu. Strukturelle und funktionelle Studien lassen vermuten, dass Perizyten als mesangiäre Zellen sowohl die effektive Filtrationsfläche als auch das intraglomeruläre Blutvolumen regulieren können. Die mesangiale Depolarisation ermöglicht dabei einen intraglomerulären „Stretch Reflex“, der den Filtrationsdruck erhöht und die Kapillaroberfläche reduziert. [74].

Perizyten sind in die Basalmembran eingebettet und produzieren selber Matrixmoleküle. Sie haben deswegen und durch ihre dichte Bedeckung der Endothelröhre große Bedeutung für die Integrität der Gefäße. Die Gefäßentwicklung beginnt mit einer Endothelröhre, an die sich zunehmend glatte Muskelzellen und Perizyten anlagern. Der „Platelet Derived Growth Factor β “ (PDGF- β) aus den Endothelzellen fördert dabei entscheidend diesen Prozess [26]. PDGF- β defizienten Mäusen fehlt die typische Anlagerung von Perizyten und es entwickeln sich bereits in der Embryonalzeit eine große Anzahl mikrovaskulärer Aneurysmen, die noch in der späten Gestationsphase rupturieren [40]. Überdies hinaus scheinen Perizyten nicht nur bei der Gefäßentwicklung, sondern auch bei der myokardialen Neovaskularisation und Angiogenese von Bedeutung zu sein [15].

Weiterhin wurde der Einfluss von Perizyten bei inflammatorischen Prozessen beobachtet. Zytokine bewirken eine morphologische Änderung der Perizytenform und eine Umbildung der endothelialen Kontakte. Die Perizytenfortsätze sind dann vermehrt in der Nähe interendothelialer Lücken zu finden, die für die gesteigerte Gefäßpermeabilität verantwortlich gemacht werden [15,51,71,72]. Im zentralen Nervensystem wurde außerdem an Perizyten die Fähigkeit zur Phagozytose beobachtet [75].

1.4 Pathophysiologische Bedeutung der Perizyten

Im Rahmen der diabetischen Mikroangiopathie kann ein frühzeitiger Verlust von Perizyten beobachtet werden [33,50,54]. Speziell bei der diabetischen Retinopathie kommt es deswegen zur Ausbildung von kleinen Aneurysmen, die im Verlauf platzen können. Eine Folge der dadurch entstehenden retinalen Blutungen kann die Erblindung sein. Untersuchungen an kultivierten retinalen Perizyten zeigten die Induktion von Apoptose durch rasche Änderung der Glukosekonzentration [38,39]. Die pharmakologische Hemmung der Glukoseaufnahme in Perizyten konnte deren Veränderungen, bzw. deren Verlust reduzieren [2,81]. Möglicherweise spielen auch in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie Perizyten eine wichtige Rolle [50].

Bei der arteriellen Hypertonie können strukturelle Veränderungen der Perizyten auftreten. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass zerebrale Perizyten hypertensiver Ratten vierfach so viel α -Smooth-Muscle-Actin exprimierten wie die zerebralen Perizyten der normotensiven Ratten [29]. Ähnliche hypertensive Veränderungen wurden auch an retinalen Kapillaren beschrieben [82].

1.5 Fragestellung

Seit der erfolgreichen Kultivierung von Endothelzellen aus der menschlichen Umbilikalvene und aus der Rinderaorta in den frühen 1970ern hat sich eine Fülle von experimenteller Literatur über Endothelzellen angesammelt. Im Gegensatz dazu ist über die Biologie der Perizyten wenig bekannt. Erst 1983 veröffentlichten Gitlin und D'Amore die Technik der Kultivierung retinaler Perizyten und vor kurzem konnten auch dermale Perizyten isoliert werden [23,27]. Koronare Perizyten sind bislang überwiegend morphologisch untersucht worden, während elektrophysiologische Untersuchungen noch nicht beschrieben wurden. Koronare Perizyten kommen gehäuft an den Widerstandsgefäßen vor und besitzen die Fähigkeit zur Kontraktion und Reaktion auf verschiedene Substanzen. Es ist anzunehmen, dass diese Reaktionen - wie auch in anderen Zellen - Ausdruck im Membranpotential finden. In Perizyten aus anderen Geweben wurden elektrische

Verbindungen zu Endothelzellen gefunden. Die flächige Ausbreitung von Membranpotentialen innerhalb kurzer koronarer Gefäßabschnitte ist eine wesentliche Determinante des koronaren Blutflusses [11,41,52].

Unsere Hypothese war, dass koronare Perizyten in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen ihre Membranpotentiale verändern können. Dabei dürften Depolarisationen zur Kontraktion der Perizyten führen, die dadurch direkt Einfluss auf den koronaren Blutfluss nehmen. Weiterhin nehmen wir an, dass die koronaren Perizyten über Gap Junctions ihr Potential auf die benachbarten Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen fortleiten können und in umgekehrter Weise auch deren Potentialänderungen auf Perizyten übertragbar sind. So würden Membranpotentialänderungen in den Endothelzellen eine Änderung des intrazellulären freien Kalziums ergeben, was wiederum die Freisetzung von Stickstoffmonoxid beeinflusst. Eine Hyperpolarisation der Perizyten lässt demnach eine Relaxation der Gefäße erwarten. Die koronaren Perizyten bilden vermutlich mit den angrenzenden Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen funktionelle Einheiten und sind wesentlich an der Regulation des koronaren Blutflusses beteiligt. Es müssen noch Belege für die bisherigen Vermutungen zu den elektrophysiologischen Eigenschaften koronarer Perizyten gefunden werden. Ein wesentlicher Schritt ist daher die Untersuchung ihrer passiven elektrischen Eigenschaften und der wesentlichen Membranströme, um neue Einblicke in ihre Funktion zu erhalten.

Wir haben deshalb koronare Perizyten kultiviert und deren elektrophysiologische Eigenschaften mittels Patch Clamp Technik untersucht. Dabei sollten die Ionenströme identifiziert werden, die wesentlich an der Regulation des Membranpotentials beteiligt sind.

2 Methoden

2.1 Isolierung, Identifizierung und Kultivierung der Perizyten

2.1.1 Isolierung

Die Isolierung der Perizyten erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Professor S. Nees, Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München:

Die frischen Rinderherzen wurden über den Schlachthof bezogen. Die Herzspitze (ungefähr 3 cm Länge) wurde abgeschnitten und drei bis vier epikardiale Arterien an Perfusionsleitungen angeschlossen. Zuerst wurde das apikale Myokard mit Ca^{2+} -freier Krebs-Henseleit-Lösung 1 bei einem konstanten Druck von 120 mmHg für 15 min. bei 37°C perfundiert. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung 2 (nominell Ca^{2+} -frei), die folgende Zusätze enthielt:

11 mg Dispase I

87 mg Kollagenase D (Boehringer Ingelheim, Germany)

194 mg Rinderalbumin gelöst in 100 ml

Die Krebs-Henseleit-Lösungen wurden auf einen pH 7.4 bei 95% O_2 und 5% CO_2 eingestellt.

Die Perfusion mit der Krebs-Henseleit-Lösung 2 erfolgte über 10 min. mit einem Druck von 50 mmHg und anschließend über 15 min. mit 20 mmHg. Anschließend wurden die angedauten Bereiche des Gewebes mit einem scharfen Löffel herausgelöst, in eine frische Krebs-Henseleit-Lösung 2 überführt und 25 min lang bei 37°C geschwenkt. Die resultierende Suspension enthielt Fragmente kleiner Gefäße und Zellen. Nun erfolgte eine Filtration durch fünf Nylon-Netze abnehmender Porengröße: 300, 200, 100, 60, 30 μm . Die mikrovaskulären

Bestandteile, die sich in den letzten beiden Netzen ansammelten, wurden mit Phosphat-Puffer-Salzlösung (PBS) ausgewaschen und in eine neue Krebs-Henseleit-Lösung 2 (37°C) suspendiert. Die Gewebefragmente wurden über 30 min durch mildes Auf- und Abpipettieren in einer 20 ml Kulturpipette weiter dissoziiert. Anschließend wurde erneut eine Filtration durch ein 30 µm Nylonnetz durchgeführt, um übriggebliebene Mikrogefäße zu entfernen. Das Filtrat enthielt nun eine Mischung aus verschiedenen Einzelzellen der mikrovaskulären Gefäße.

Dieses perizytenreiche Filtrat wurde mit 11 ml isotonischer Percoll-Lösung (Sigma, Deisenhofen Germany) gemischt und über 20 min. bei 400 g zentrifugiert. Der Bodensatz und die obersten 2 ml wurden verworfen. Der Rest wurde 1:2 in PBS verdünnt. Die zellulären Bestandteile wurden über 10 min. bei 400 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in PBS resuspendiert und auf einen linearen Percoll-Dichtegradienten geschichtet (1.026 bis 1.065 g/cm³ bei einem Volumen von 70 ml_{total}). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 30 min mit 1000 g (Zentrifuge: Z323, Hermle, Wehingen). Durch die Dichtegradienten-Zentrifugation sammelten sich in dem Volumen von 22 ml bis 50 ml fast ausschließlich Perizyten (siehe 2.1.3 Identifikation). Dieses Volumen entspricht einer Dichte von 1,038 bis 1,054 g/cm³. Die Perizyten wurden dreimal in PBS gewaschen und zur Kultivierung in das Nährmedium überführt.

2.1.2 Kultivierung

Die Perizyten wurden spärlich in 35 mm Petrischalen ausgesät. Die Petrischalen enthielten zur Kultivierung das Nährmedium (Dulbecco Minimal Essential Medium, ergänzt um 10% fetales Kälberserum, 1 mM Glutamin, 200 I.E. Penicillin/ml und 20 µg Streptomycin/ml). Die Bebrütung erfolgte bei 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ und 100% relative Luftfeuchtigkeit. Die meisten Zellen bildeten nach kurzer Zeit große flache, irregulär begrenzte Zellkörper mit dünnen langen Zytoplasmafortsätzen und hefteten sich am Boden der Schale fest. Diese Morphologie ist typisch für Perizyten. Dicht benachbart liegende Zellen schienen teilweise über dünne Zytoplasmafortsätze Kontakte auszubilden. Die kultivierten

Perizyten proliferierten rasch und konnten schließlich bis zu zehn mal passagiert und subkultiviert werden, ohne dass Zeichen einer Entdifferenzierung oder ein Verlust der charakteristischen Eigenschaften zu beobachten waren. Zur Passagierung wurden die Perizyten vorsichtig mit Trypsin und leichtem Klopfen von dem Boden der Schalen gelöst und unter Zugabe von neuem Kulturmedium wieder ausgesät.

Für alle ausgewerteten Messungen wurden einzelne Perizyten der dritten bis achten Passage verwendet. Die Messungen erfolgten ein bis drei Tage nach der letzten Passagierung. Später, nach mehr als drei Tagen, wurde es zunehmend unmöglich, stabile Gigaseals zu erzeugen. Es ist anzunehmen, dass die Sealbildung wegen der Produktion großer Mengen von Matrixmolekülen gestört wurde [68]. Messungen an Zellverbänden aus koronaren Perizyten zeigten große Membrankapazitäten. Ebenso fielen vergleichsweise große Membranströme auf. Wegen dieser auffallenden Eigenschaften, die auf eine Kopplung zwischen den Zellen hinweisen, wurden für die folgenden Experimente nur streng einzeln gelegene Perizyten verwendet, die in keinem lichtmikroskopisch erkennbaren Kontakt zu anderen Zellen standen. Weiterhin waren vereinzelt kleinere, teils kugelförmige Zellen zu beobachten. Möglicherweise hatten sich diese Zellen nicht oder nur mangelhaft am Boden angeheftet oder waren durch die Strömung losgelöst worden. Wegen der Schwierigkeit, an diesen Zellformen konstante Ableitungen durchzuführen, wurden sie nicht weiter berücksichtigt.

2.1.3 Identifikation

Die verwendeten Perizyten wiesen typische Färbereigenschaften auf. Abbildung 3a zeigt eine Mischkultur aus Perizyten und Endothelzellen. Sie entstand durch Auslassen der Dichtegradienten-Zentrifugation. Mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation konnten nahezu reine Kulturen von Perizyten (Abbildung 3b - blau) und Endothelzellen (Abbildung 3c - rot) gewonnen werden. Die Anfärbung erfolgte mit alkalischer Phosphatase (AP - blau) und Dipeptidyl(amino)peptidase IV (DPP IV - rot) sensitiven Färbemitteln [43]. Zusätzlich konnten Endothelzellen

dadurch identifiziert werden, dass sie farbmarkiertes acetyliertes LDL („Low-Density-Lipoprotein“) aufnehmen konnten. Weiterhin ließen sich in glatten Muskelzellen und, mit geringerer Intensität, in koronaren Perizyten glattmuskuläre Aktinfilamente (α SMA) anfärben. Da sich andere Perizytenmarker als unzureichend erwiesen haben [68] und Färbungen die Möglichkeiten der Untersuchung einschränken, wurden die Experimente an kultivierten Perizyten vorgenommen.

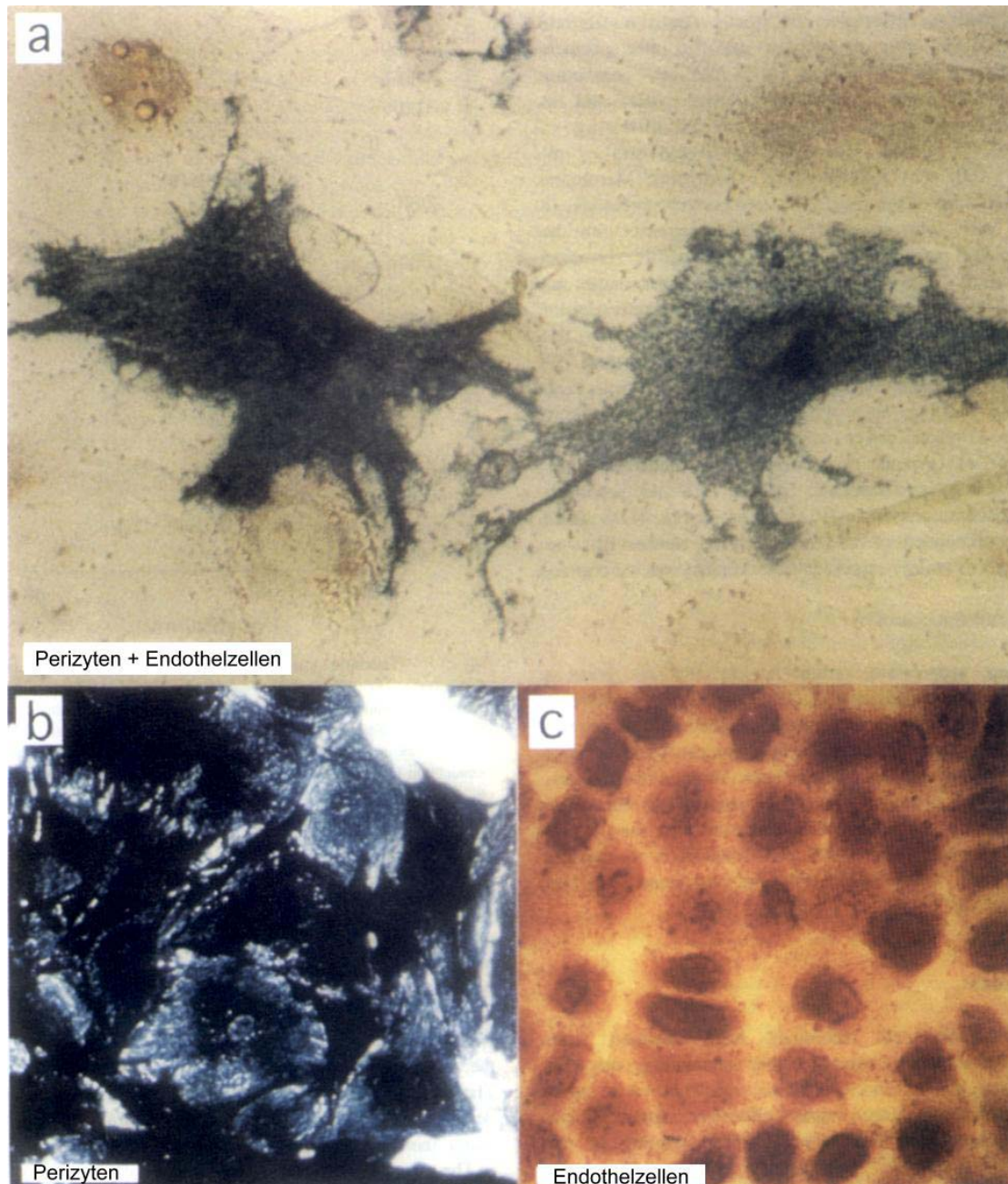


Abbildung 3. Perizyten und Endothelzellen in Kultur: Färbung mit AP und DPP IV

a) Kokultur, b) Perizyten, c) Endothelzellen

2.2 Elektrische Messungen

2.2.1 Allgemeines

Eine Zelle steht mit ihrer Umgebung, dem Extrazellulärraum und den benachbarten Zellen in ständigem Stoffaustausch. So strömen verschiedene Ionen durch die Zellmembran ein und aus und bilden ein dynamisches Gleichgewicht. Dabei ist die Penetration der Ionen durch Ionen-spezifische Kanäle von großer Bedeutung. Die Ionen-spezifischen Kanäle sind transmembranöse Proteine, die einen mit Ladungen und Bindungsstellen besetzten Kanal bilden, der es aufgrund seines Energieprofils nur bestimmten Ionen erlaubt durchzutreten. Dieser Kanal kann richtungsselektiv sein (gleichgerichteter Ionenstrom) und durch rasche Konformationsänderungen seine Permeabilität ändern ('offen' und 'geschlossen'). Die so entstehenden unterschiedlichen Ionenkonzentrationen zwischen Intra- und Extrazellulärraum führen zu einem elektrischen Potential. Aus der intra- und extrazellulären Konzentration eines Ions lässt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung (1888) das Gleichgewichtspotential errechnen. Dies entspricht jenem Potential, bei dem sich der Aus- und Einwärtsstrom die Waage halten.

$$E_{\text{Ion}} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{Ion}]_{\text{extrazellulär}}}{[\text{Ion}]_{\text{intrazellulär}}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Konstante = RT / zF : (allgemeine Gaskonstante x absolute Temperatur / Wertigkeit des Ions x Faradaykonstante)

Das Membranpotential einer Zelle ergibt sich aus den Leitfähigkeiten und der Verteilung aller beteiligten Ionen in einer erweiterten Fassung der Nernst-Gleichung, der ‚Constant Field-Gleichung‘.

2.2.2 Patch Clamp Technik

Mit der Patch Clamp Technik kann man sowohl die elektrischen Eigenschaften der gesamten Zellmembran, aber auch die elektrischen Eigenschaften eines kleinen Ausschnittes untersuchen. Die Flüssigkeit des Extrazellulärraums wird dabei mit der elektrisch neutralen Masse verbunden. Die Messelektrode wird an die Zelle herangeführt und zunächst auf einen kleinen Ausschnitt der Zellmembran – den Patch – aufgesetzt. Die Elektrode besteht aus einer dünnen Glaspipette mit einer sehr kleinen Öffnung (ca. $1 \mu\text{m}^2$) an ihrem spitzen Ende. Um den Strom leiten zu können, ist sie mit einer Salzlösung gefüllt, in die am anderen Ende der Draht des Messverstärkers taucht. Durch den engen Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zellmembran kommt es zu einem Anhaften des Patches an dem Glas. Dabei bildet sich ein Gigaseal: Die elektrische Abdichtung gegenüber der umgebenden Flüssigkeit führt zu einer Widerstandserhöhung in den Gigaohmbereich. Es können nun in dem Patch kleine Ströme als Folge der durch die Membrankanäle tretenden Ionen gemessen werden. Der Patch kann aber auch samt seinen Kanälen aus der Zelle herausgerissen werden oder mit verschiedenen Methoden zerstört werden. Durch die Zerstörung entsteht ein Zugang in den Intrazellulärraum – Pipette und Zelle bilden jetzt ein gemeinsames Kompartiment. Für die Messungen dieser Arbeit wurde mit einem kurzen Sog an der Pipette die empfindliche Zellmembran eingerissen. Über den dadurch entstehenden leitfähigen Zugang in die Zelle werden elektrische Messungen zwischen Intra- und Extrazellulärraum möglich (Whole Cell Recording). Das folgende Schema in Abbildung 4 zeigt die verschiedenen Messkonfigurationen, die mit der Patch Clamp Technik möglich sind:

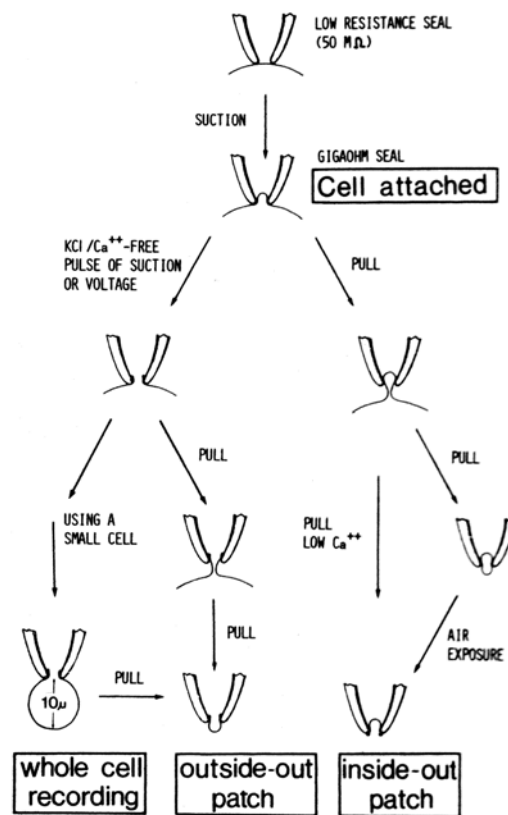


Abbildung 4. Patch Clamp Konfigurationen aus [24].

2.2.3 Versuchsaufbau

Die Petrischale (Durchmesser 35 mm) mit den Zellen befand sich auf dem Objektisch eines invertierenden Durchlichtmikroskops (Leitz DM IL, Wetzlar, Germany). Zur kontrastreicheren Darstellung ließen sich Phasenkontrast (verschiedene Brechungsindizes) oder Dunkelfeld (Beugung) zuschalten. In die Petrischale wurde die Flusskammer mit ihren Anschlüssen positioniert. Mit einem Mikromanipulator konnte der Messkopf mit der Pipette vorsichtig an die Zelle heran geführt werden. Die Gegenelektrode, die breit in die Flusskammer hinein ragte, war mit der geerdeten Masse verbunden. Dieser gesamte Aufbau stand innerhalb eines geerdeten Faraday'schen Käfigs, um elektrische Störeinflüsse zu minimieren. Die mechanische Entkopplung erfolgte durch den Aufbau auf einer gedämpft gelagerten, schweren Granitplatte. Außerhalb des Käfigs befanden

sich Messverstärker mit Interface, Computer, Netzgeräte und eine Absaugpumpe, die über ein Zwischenreservoir zusätzlich elektrisch und mechanisch entkoppelt war (Abbildung 5).

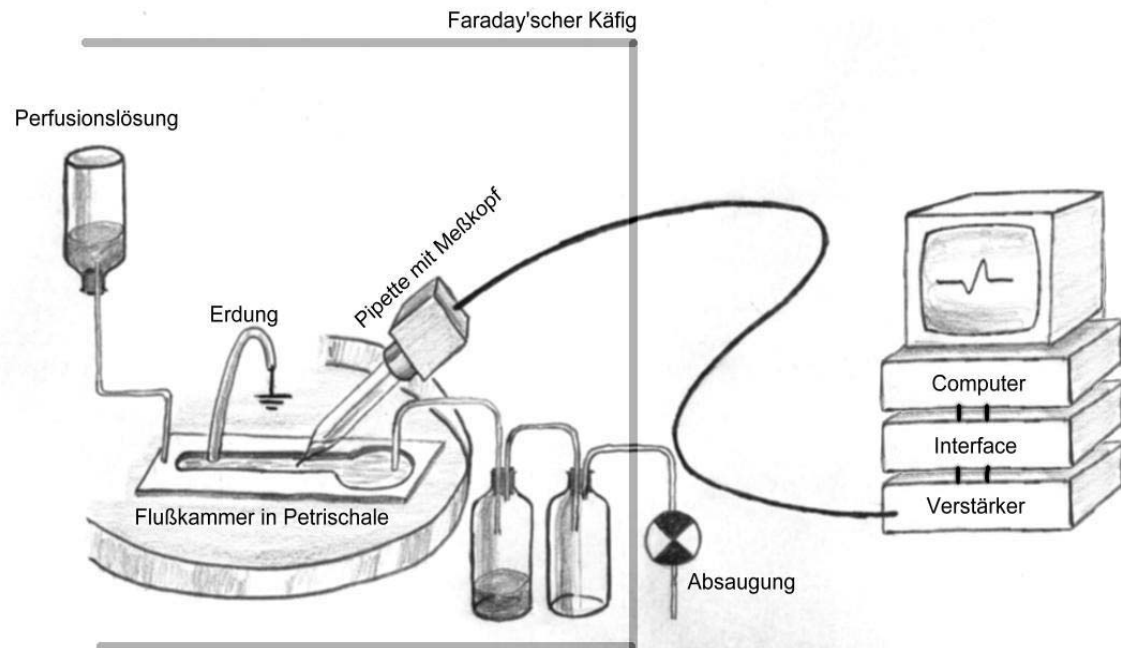


Abbildung 5. Messkammer

2.2.4 Meßelektroden

Herstellung der Pipette

Mit Hilfe des Zieh-Gerätes (Puller) wurden die Pipetten aus dünnwandigen Borosilikatglas-Kapillaren (Schmelztemperatur ca. 1200 °C) unmittelbar vor der Messung gezogen. Die Kapillaren wurden von der Firma Clark, Reading, England bezogen. Der Puller ist ein Gerät mit einem Heizwendel und zwei rechts und links davon befindlichen Einspannvorrichtungen, mit denen die Kapillare gehalten wird. Zwischen den Halterungen kann elektromagnetisch Zug ausgeübt werden (Pull). Eine Prozesssteuerung erlaubt die Programmierung und Steuerung aller relevanten Parameter, wodurch eine hohe Wiederholgenauigkeit erreicht wird.

Die Herstellung der Pipetten erfolgte in drei Schritten:

- 1.) Mit dem ersten langsamen Pull hoher Temperatur wurde die 1,5 mm starke Glaskapillare auf Bruchteile eines Millimeters ausgedünnt. Die dünne Stelle der Kapillare wurde wieder in Position des Heizwendels zentriert.
- 2.) Der zweite Pull riss nach einer kurzen Vorheizzeit mit geringerer Hitze bei definierter Zugkraft die Kapillare in zwei Pipetten auseinander. Jeweils eine Spitze wurde danach wieder in der Heizwendel zentriert.
- 3.) Die Spitze der Pipette wurde nun mit geringer Hitze kurz poliert: Durch das schmelzende Glas entsteht ein glatter Randwulst, der für die Ausbildung und Stabilität eines Gigaseals von Bedeutung ist [66].

Die fertigen, erkalteten Pipetten wurden mit einer gefilterten intrazellulären Lösung gefüllt (IC-Lösung: 125 mM KCl, 20 mM KOH, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl_2 , 2 mM Na_2ATP , 2 mM MgCl_2 , 10mM HEPES; Abgleich auf pH 7,2 mit NaOH. Filter: 45 μm). Anschließend wurden die Pipetten auf den Messkopf montiert.

Für den Widerstand der Pipetten ist die Öffnung der Spitze entscheidend. Es wurden nach dem Eintauchen in die extrazelluläre Lösung Werte von 3,0 bis 5,0 MOhm angestrebt. Das entspricht einer Öffnungsfläche im Bereich von 1 μm^2 [66]. Der wesentliche Parameter für den Pipettenwiderstand ist der Heizstrom von dem zweiten Pull. Das Verhalten von der Stromstärke der Heizwendel und dem Pipettenwiderstand ist in der Abbildung 6 aufgetragen:

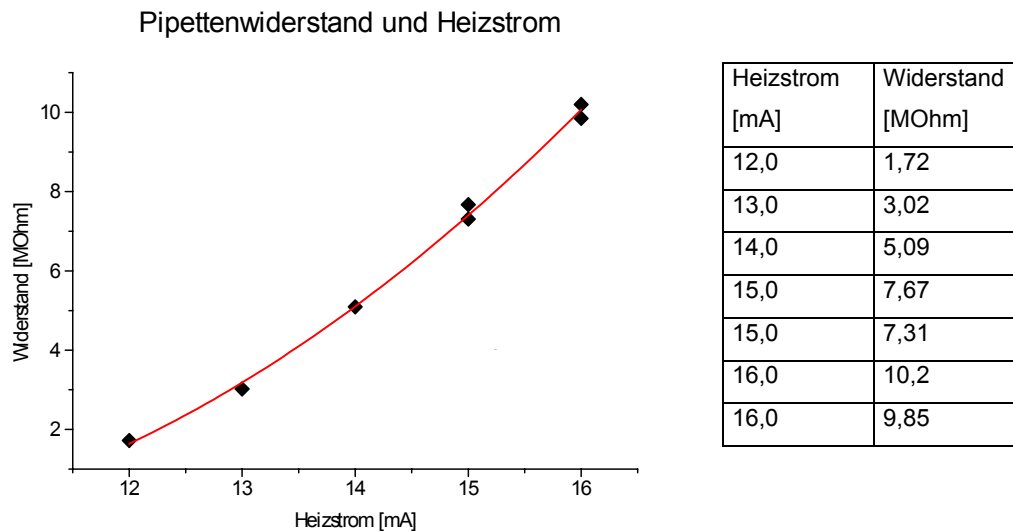


Abbildung 6. Abhängigkeit des endgültigen Pipettenwiderstandes von der Stromstärke der Heizwendel in Pull 2. Der Pipettenwiderstand wurde in 150 mM KCl-Lösung bestimmt.

Anschluss der Pipette an den Messverstärker

Der Messkopf, an dem die Pipette befestigt wurde, enthält einen Vorverstärker, an dessen Eingang eine chlorierte Silberelektrode gelötet war, die mit ihrem anderen Ende in die befüllte Pipette tauchte. Über ein geschirmtes Kabel wurde der Vorverstärker mit dem Verstärker außerhalb des Käfigs verbunden. Dieser war über ein Interface an den Computer angeschlossen. Die Nähe des Vorverstärkers zum Messobjekt reduziert die Störungen. Zur Minimierung und Stabilisierung des galvanischen Potentials erfolgte vor jeder Messreihe eine Chlorierung der Silberelektrode durch Anlegen positiver Spannung in 1 M HCl. Weiterhin bestand ein Sauganschluss am Halter der Pipette, um Unter- und Überdruck in der Pipette erzeugen zu können.

Referenzelektrode

Zur Erdung der die Zellen umgebenden Flüssigkeit, der extrazellulären Lösung, wurde eine ebenso chlorierte Silberelektrode verwendet, die über eine

Flüssigkeitsbrücke breiten Kontakt zur Flusskammer hatte. Die Brücke bestand aus einer 150 mM KCL-Lösung (ähnlich dem Salzgehalt der intrazellulären Lösung) in einem Glasröhrchen, das an seinen Enden mit Agar abgedichtet war. Somit konnte ein galvanisches Potential zwischen Mess- und Referenzelektrode minimiert werden.

2.2.5 Messtechnik

Für die Messungen wurde der Patch Clamp-Verstärker EPC 9 (Firma HEKA, 67466 Lamprecht Deutschland) eingesetzt. In diesem Gerät werden die zunächst schwachen Signale weiterverarbeitet und über ein Interface an einen Computer (Apple-Macintosh) übertragen. Mit dem Computer wurden die gemessenen Signale gespeichert, visualisiert und bearbeitet. Außerdem erfolgten auch die Einstellungen des Vorverstärker und des Verstärkers Software-gesteuert mit den auf dem Computer installierten Programmen (Programmpaket HEKA, Version 7.4).

'Current Clamp'

In diesem Modus wird sehr hochohmig ($R_{in} > 10^{12} \Omega$) das Potential zwischen Referenz- und Messelektrode gemessen. Dazu kommt ein Operationsverstärker mit Feldeffekttransistoreingang zum Einsatz. Prinzipiell verfügt ein Operationsverstärker neben den Anschlüssen für die Versorgungsspannung über zwei hochverstärkende, gegenpolige Eingänge, einen Ausgang und eine Kompensationsmöglichkeit für die Offsetspannung. In diesem Modus wird der Operationsverstärker als „Spannungsfolger“ geschaltet (siehe Abbildung 7): Der nicht-invertierende Eingang E+ ist mit der Messelektrode verbunden („Eingang“). Der invertierende Eingang E- ist über eine einstellbare Dämpfung gegengekoppelt. Wegen der sehr hohen Leerlaufverstärkung von Operationsverstärkern gilt annähernd $U_{E+} = U_{E-}$. Somit ist $U_E = R_1 \times U_{out} / (R_1 + R_2)$. Die Gesamtverstärkung beträgt demnach $V_{ges} = U_{out} / U_E = 1 + 1 / \text{Dämpfung}$.

Das Schaltungsprinzip eröffnet die Möglichkeit einen konstanten Strom - „Current Clamp“ - auf die Messelektrode zu legen, während die dadurch entstehende Spannung gemessen wird (Abbildung 7).

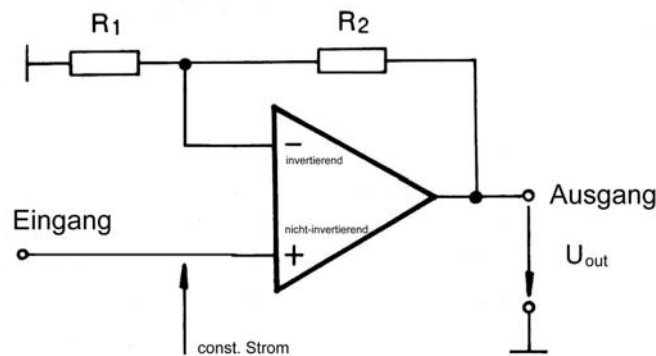


Abbildung 7: Current Clamp: Ein Operationsverstärker wird als Spannungsfolger geschaltet. Durch die Dämpfung des Spannungsteiler R_1 und R_2 wird die Verstärkung der Schaltung bestimmt. Während die Spannung am Eingang gemessen wird, kann dort zusätzlich ein konstanter Strom aufgeschaltet werden.

'Voltage Clamp'

Im Modus ‚Voltage Clamp‘ wird niederohmig der Strom zwischen der Referenz- und Messelektrode gemessen. Dazu kommt ein Operationsverstärker mit Feldeffekttransistoreingang zum Einsatz, der als „Knotenpunktverstärker“ geschaltet wird (siehe Abbildung 8): Sein invertierender Eingang E- ist mit der Messelektrode verbunden („Eingang“), während der nicht-invertierende Eingang E+ auf der Masse liegt. Über einen einstellbaren Widerstand R wird auf den invertierende Eingang E- gegengekoppelt. Wegen der sehr hohen Leerlaufverstärkung von Operationsverstärkern gilt annähernd $U_{E+} = U_{E-}$. Damit $U_{E-} = U_{E+} = 0$ V sein kann, muss ein Strom I_{in} am Eingang stets durch einen Strom $I_{gegen} = U_{out} / R$ kompensiert werden. Daher ist $I_{in} = -U_{out} / R$, bzw. $U_{out} = -(R \times I_{in})$. Der Widerstand R bestimmt also die Empfindlichkeit der Schaltung.

Es besteht die Möglichkeit am nicht-invertierenden Eingang des Operationsverstärkers anstelle der Masse eine konstante Spannung – „Voltage

Clamp“ – anzulegen und damit eine Spannung an der Messelektrode einzustellen (Abbildung 8).

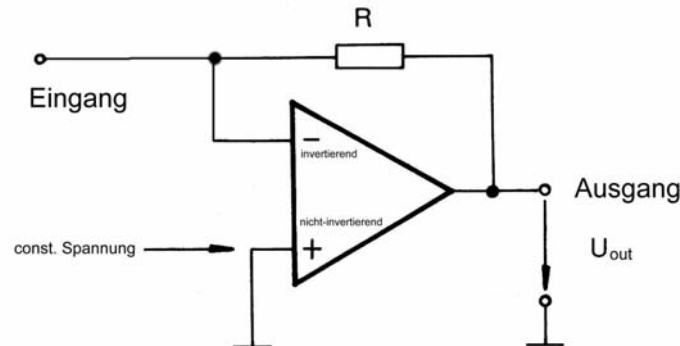


Abbildung 8. Voltage Clamp: Ein Operationsverstärker wird als Knotenpunktverstärker geschaltet. Alle eingehenden Ströme werden durch die Ausgangsspannung über R kompensiert. Bei dieser Konvertierung von Eingangsstrom in Ausgangsspannung bestimmt R die Empfindlichkeit. Die Schaltung erlaubt außerdem eine Spannung an dem Eingang einzustellen, indem anstelle der Masse ein konstante Spannung an den nicht invertierenden Eingang angelegt wird.

Datenaufnahme und Filterung

Zur Digitalisierung des Signals wurde eine Abtastfrequenz (Samplingrate) gewählt, die mindestens dreifach höher als die gewünschte Bandbreite des Messsignals lag. Die Bandbreite wurde mittels zweier Tiefpassfilter auf ungefähr 200 Hz eingeschränkt. Die Filtercharakteristik entsprach dabei zweier in Serie geschalteter Besselfilter 3. und 4. Ordnung, wobei der erste Filter 3. Ordnung höher frequente Störsignale reduzierte, während der fein einstellbare zweite Filter 4. Ordnung die exakte Eingrenzung der Bandbreite vornahm. Der Bessel-Filter (Dämpfung $d \geq \sqrt{3}$) wurde deshalb gewählt, weil er im Vergleich zum Butterworth-Filter (Dämpfung $d = \sqrt{2}$) oder Tschebyscheff-Filter (Dämpfung $d \approx 1$) ein besseres Laufzeit- und Frequenzverhalten zeigt.

Störungen

Die Signalqualität wird durch verschiedene Störungen beeinträchtigt. Durch die elektrische Abschirmung des Messaufbaus mit einem Faraday'schen Käfig, gezielte Erdung der Aufbauten und mechanische Dämpfung konnten äußere Beeinträchtigungen sehr gering gehalten werden. Im Messverstärker selbst und an jedem Widerstand tritt zusätzlich ein thermisch bedingtes Rauschen auf. Durch sinnvolle Eingrenzung der Bandbreite war es möglich, Mess- und Störsignal deutlich zu trennen. Weitere Beeinträchtigungen entstehen durch störende Widerstände und Kapazitäten in der Messanordnung. Verschiedene Ionenkonzentrationen führen außerdem zu störenden Potentialen. Diese wurden gemessen und in der späteren Auswertung berücksichtigt.

Störende Widerstände

Widerstände in der Zuleitung zum Messverstärker oder parallel zur Masse beeinträchtigen die Signalamplitude. Bedeutsam für die Messung sind die folgenden Widerstände: Die Pipette verjüngt sich und weist im Bereich der Spitze mit der kleinsten Öffnungsfläche den größten Widerstand R_{Pipette} auf. Zwischen Zellmembran und Pipettenspitze bildet sich das Gigaseal. Hierbei tritt ein kleiner Leckstrom durch den Widerstand R_{leak} zwischen Pipetteninhalt und Extrazellulärraum auf. Der Zugang zu dem Intrazellulärraum durch das Einreißen des Patches besitzt je nach Öffnung den Widerstand R_{IC} .

Störende Kapazitäten

Eine Kapazität besteht zwischen zwei durch einen Isolator getrennte Leiter. Ihre Größe ist abhängig von der Fläche, dem Abstand und der Dielektrizitätskonstante ϵ . So bildet zum einen die Pipette eine Kapazität C_{fast} zwischen Pipetteninhalt und der Extrazellulärlösung. Zum anderen besteht eine Kapazität C_{slow} an der Zelle zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Diese störenden Kapazitäten führen bei schnellen Spannungsänderungen zu einem kapazitivem Strom durch das extrazelluläre Bad.

Die relevanten Widerstände und Kapazitäten lassen sich in dem folgenden Ersatzschaltbild zusammenfassen (Abbildung 9):

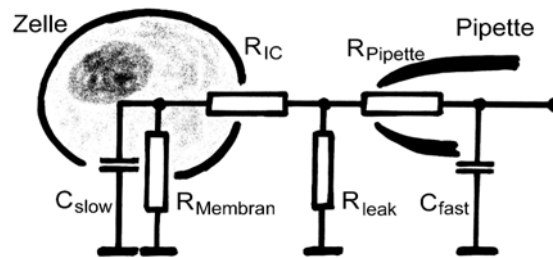


Abbildung 9. Ersatzschaltbild der Messkonfiguration.

Mit Kompensationsschaltungen war es möglich, die Artefakte, die sich aus den störenden Widerständen und Kapazitäten ergeben, größtenteils aus dem Messsignal zu eliminieren. Aus der Messung der Verzerrung eines Rechtecksignals konnten die Zeitkonstanten $T_{fast} = R_{Pipette} \times C_{fast}$ und $T_{slow} = R_{IC} \times C_{slow}$ ermittelt werden. Das Messsignal wurde mit den daraus gebildeten Inversfunktionen korrigiert. Eine vollständige Kompensation der Artefakte war jedoch nicht immer möglich, da die Pipetten und Zellen nicht technisch idealisierten Widerständen und Kondensatoren entsprechen. So ist die Kompensation von C_{fast} um so unvollständiger, je länglicher die Pipettenspitze ist. In ähnlicher Weise verschlechtert auch jedes Abweichen von einer kugelförmigen Zelle die Kompensationsmöglichkeit von C_{slow} . Die untersuchten kultivierten Perizyten bildeten typischerweise lange filigrane Zellfortsätze aus. Dadurch war es schwierig, bei allen Messungen eine ausreichende Kompensation zu erreichen.

Membrankapazität und Zellradius

Die Bestimmung und Kompensation von C_{slow} , der Membrankapazität, erlaubt eine grobe Aussage über die Größe der Zelle. Die dünne Zellmembran entspricht dem Isolator eines Plattenkondensators. Seine Kapazität wird durch folgende Formel berechnet: $C = Q / U = A \epsilon \epsilon_0 / d$. Dabei beschreibt A die Fläche, d die Dicke des Isolators und $\epsilon \epsilon_0$ die spezifische Dielektrizitätskonstante. An einfachen Lipiddoppelschichten wurden ca. $0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ gemessen. Zellmembranen weisen

Kapazitäten von ungefähr $1,0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf [31,66]. Geht man von einer kugelförmigen Zelle aus, beträgt ihre Oberfläche $A = 4\pi r^2$, so dass folgt:

$$C_{\text{Zelle}} = 4\pi\epsilon\epsilon_0 r^2/d \quad (\text{Gleichung 2})$$

Der so errechnete Zelldurchmesser (Bereich 10^{-4} m) war größer als der reale Durchmesser der kultivierten Perizyten. Diese haben aufgrund ihrer langen Fortsätze und der flachen Form eine im Verhältnis zum Durchmesser sehr große Membranoberfläche.

Offset

Der Offset setzt sich aus einer leicht abgleichbaren elektronischen Komponente im Messverstärker und einer Komponente durch Potentiale aus der Messanordnung zusammen. Die Potentiale aus der Messanordnung entstehen zwischen verschiedenen Flüssigkeiten und Metallen:

- Ein galvanisches Potential kann zwischen den zur Ableitung dienenden Metallelektroden entstehen. Beide Elektroden waren daher aus Silber und wurden vor einer Messreihe chloriert. Dadurch wird die Anlagerung von Fremd-Ionen reduziert und das Potential bleibt über lange Zeit stabil.
- Verschiedene Ionenkonzentrationen führen zu konzentrationsabhängigen Potentialen an den Messelektroden. Um diese Potentiale gering zu halten, wurden annähernd gleiche Ionenkonzentrationen für die Elektroden geschaffen: Die Kaliumkonzentration in der Pipette (150 mM K^+) wurde auch an der Erdungselektrode aufrechterhalten. Eine mit Agar abgedichtete Flüssigkeitsbrücke diente der elektrischen Verbindung in die Extrazellulärlösung.
- Es wurden die Flüssigkeitspotentiale an der Pipettenspitze und an der Flüssigkeitsbrücke berechnet und korrigiert. Für die verschiedenen verwendeten extrazellulären Lösungen ergaben sich folgende Korrekturen: -5 mV bei 5 mM K^+ , -6 mV bei 10 mM K^+ und -7 mV bei 60 mM K^+ .

Zur optimalen Korrektur des Offsets wurde vor jeder Messung das Potential nach Eintauchen der Pipettenspitze in die extrazelluläre Lösung mit 5 mM K^+ auf $0,0$

mV abgeglichen. Dieser Abgleich erforderte meist nur eine Korrektur um wenige mV. Um eine mögliche Drift während der Messung zu kontrollieren, wurden nach Abschluss jeder Messung im Current-clamp-Modus Spannungsspurten von der Ablösung der Zelle aufgezeichnet. Bei dem Abheben der Pipette von der Zelle sprang die Spannung vom Membranpotential aus auf geringe negative Potentiale. Wir gehen davon aus, dass hier die Membran in den meisten Fällen mit ausgerissen war und noch die Pipettenspitze bedeckte. Im Folgenden wurde deshalb positiver Druck in der Pipette eingestellt, worauf sich eine Spannung um 0 mV einstellte – entsprechend der aktuellen Offsetdrift. Für die hier ausgewerteten Messungen wurde eine Offset-Drift von maximal ± 3 mV akzeptiert.

2.2.6 Ablauf der Messungen

Für diese Arbeit wurden Perizyten der 3. bis 8. Passage verwendet, die zwei bis drei Tagen zuvor zum letzten mal passagiert worden waren. Die Petrischalen enthielten zunächst das Nährmedium, welches unter Abkühlung auf 21°C Raumtemperatur gegen die extrazelluläre Lösung durch Überschichtung vorsichtig ausgetauscht wurde. Zur Messung wurden die Schalen auf dem Tisch des invertierenden Mikroskops befestigt und die Flusskammer eingesetzt (siehe Abbildung 5). Nach Montage und Abgleich der Elektroden wurde zügig eine Messung angestrebt: Um eine Durchmischung der Pipettenlösung oder die Verlegung der Pipettenöffnung durch Zellreste zu vermeiden, wurde ein leichter positiver Druck von ungefähr 1 cm H₂O (100 Pa) auf die Pipette gelegt. Dadurch strömte stets etwas Flüssigkeit aus der Pipettenspitze. Nach Annäherung an die Zelle wurde der Druck aufgehoben und kurzzeitig leicht gesogen. So bildete sich in vielen Fällen ein Gigaseal. Die Annäherung und Bildung des Seals erfolgte im Modus ‚Voltage Clamp‘ unter der Messung des Pipettenwiderstandes mit einer biphasischen Rechteck-Spannung (Amplitude 10 mV). Die Messung wurde nur fortgeführt, wenn ein stabiles Seal im GigaOhm-Bereich erzielt werden konnte. Dazu ist eine „saubere“ Zelloberfläche Voraussetzung. Auf eine zusätzliche enzymatische Vorbehandlung zur „Säuberung“ der Zelloberfläche jedoch wurde bewusst verzichtet, da diese die Ionen-Kanalfunktion hätte beeinflussen können.

Die Gigaseals wurden an den Zellkörpern großer, flacher, irregulär begrenzter, adhärenter Zellen erzielt, von denen die meisten lange dünne Zellfortsätze aufwiesen. Insgesamt wurden 78 Zellen untersucht. Nachfolgende Abbildung 10 zeigt eine Messung, die während der Ausbildung eines Gigaseals aufgenommen wurde:

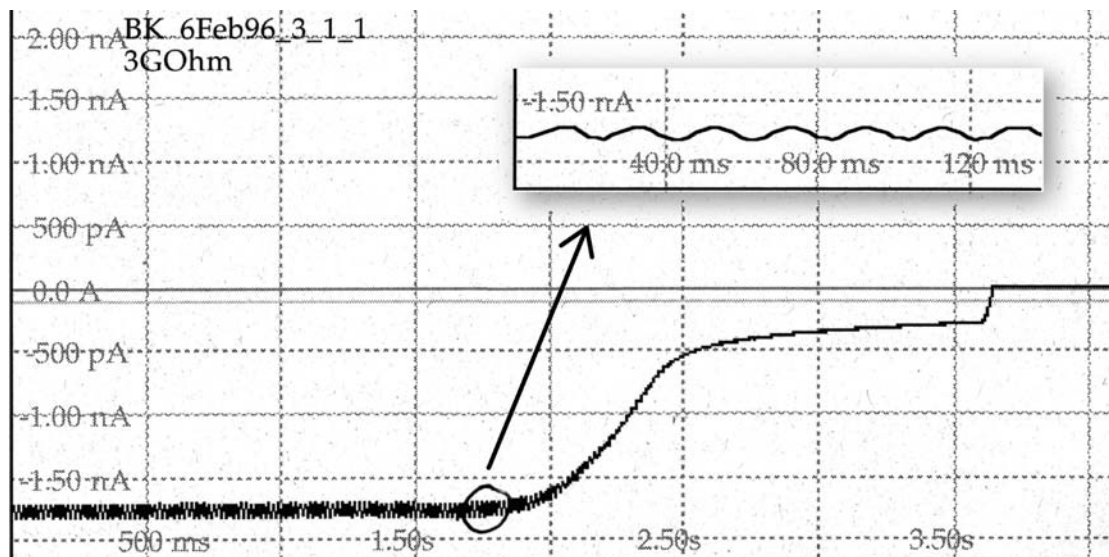


Abbildung 10. Beispielhafte Messung während der Ausbildung eines Gigaseals. Während der Annäherung an die Zelle wurde bei einer konstanten Spannung von -10 mV der Strom gemessen (Modus: Voltage Clamp). Dabei kann deutlich die Annäherung mit einer Plateaubildung von der folgenden sprunghaften Ausbildung des Gigaseals unterschieden werden. Der vergrößerte Ausschnitt aus der Stromkurve zeigt eine Überlagerung durch ein typisches Störsignal mit ungefähr 50 Hz, welches bei Arbeiten in dem nicht vollständig verschlossenen Faraday'schem Käfig auftreten kann.

Um den Widerstand der Pipette abschätzen zu können, wurde im Modus ‚Voltage Clamp‘ an die Messelektrode eine konstante Spannung von -10 mV angelegt und der zugehörige Strom aufgezeichnet. Während der Annäherung der Pipette an die Zelle stieg der Widerstand, bis er schließlich ein Plateau mit Werten um 50 MOhm erreichte. Von dort bildete sich sprunghaft der Übergang in das Gigaseal. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Überlagerung der Stromkurve mit einem Störsignal von 50 Hz. Dieses typische Störsignal konnte häufig bei Arbeiten innerhalb des geöffneten Faraday'schen Käfigs beobachtet werden – in diesem Fall durch die manuelle Bedienung des Mikromanipulators.

Durch die Ausbildung des Gigaseals wurde die kapazitive Stromkomponente C_{fast} demaskiert, welche nun optimal kompensiert werden konnte. Bei entsprechender Verstärkung konnten in diesem Zustand auch Ströme durch vereinzelte Kanäle abgeleitet werden.

Intrazellulärer Zugang

Um einen Zugang in den intrazellulären Raum zu erlangen, wurde gefühlvoll ein kurzer Sog an die Pipette angelegt (ungefähr 30 cm H₂O = 3000 Pa), bis die Membran einriss. Zur Messung dieses Vorgangs wurde der Messverstärker im Modus ‚Voltage Clamp‘ konfiguriert. Der Widerstand wurde kontinuierlich über eine biphasische Rechteck-Spannung mit einer Amplitude von 10 mV gemessen. Die Ruptur des Patches äußerte sich in einer sprunghaften Reduktion des Widerstandes in den 100 MOhm-Bereich und gleichzeitig einem Shift des Stromes durch die selektiven Ionenströme der Zelle.

Perfusion in der Flusskammer

An der eingesetzten Flusskammer war ein zuführendes Röhrchen angebracht, das in eine 1,5 mm breiten und 8 mm lange Rinne mündete. Die Rinne endete in einer runden Erweiterung aus der die Flüssigkeit abgesaugt wurde. Die Zellen in der Rinne wurden superfundiert mit einer Flussrate von ungefähr 5-15 ml/h. Die verwendete Lösung konnte mit einem handgesteuerten Verteilerventil umgeschaltet werden. Zwischen dem Umschalten am Ventil und dem tatsächlichen Erscheinen der Lösung in der Rinne mussten je nach Flussrate ungefähr 20 s berücksichtigt werden. Je nach Fragestellung wurden verschiedene extrazelluläre Lösungen mit einer Osmolarität von 322 mOs vorbereitet: 5, 10, 20, oder 60 mM K⁺-haltige Lösungen (Tabelle 1). Die Lösungen wurden vor ihrer Anwendung auf pH 7,42 bei 21° Raumtemperatur abgeglichen.

Lösung	5K	10K	20K	60K
NaCl [mM]	140	135	125	85
KCl [mM]	5	10	20	60
MgCl ₂ [mM]	1	1	1	1
NH ₂ PO ₄ [mM]	2	2	2	2
CaCl ₂ [mM]	2	2	2	2
HEPES [mM]	10	10	10	10
Abgleich pH 7,42 bei 21°C (ca. 5,5ml 1M NaOH/l)				

Tabelle 1. Zusammensetzung der extrazellulären Lösungen

Messung der Strom-Spannungsbeziehungen

Um zu untersuchen, welche Ströme bei welchen Spannungen auftreten, wurden langsame Spannungsrampen entworfen. Sie definierten in der Voltage-Clamp-Konfiguration die Spannung der Zelle, während gleichzeitig der Strom dazu gemessen wurde. Die Flankensteilheiten wurden so gewählt, dass es zu keinen kapazitiven Signaldeformierungen kam und der gemessene Strom nicht durch die Aktivierungszeit der Kanäle verzögert erschien. Andererseits durften die Spannungsrampen nicht zu langsam sein, da bei länger andauernden depolarisierten Potentialen zunehmende Inaktivierungen der Ströme auftreten können. Deshalb betrug die verwendeten Anstiegsraten (Slew-Rate) 45 mV/s oder 60 mV/s. Die Spannungsrampen starteten vom vordefinierten Membranpotential aus, um bald Werte von -120 mV zu erreichen. Von dieser Hyperpolarisation mit -120 mV begann eine kontinuierliche Depolarisation bis $+60$ mV innerhalb von 3,0 oder 4,0 s. Von dort aus erfolgte in spiegelverkehrter Weise wieder die Repolarisation auf -120 mV und schließlich die Rückkehr zum vordefinierten Membranpotential. In den folgenden Messungen wurde stets die aufsteigende Flanke ausgewertet. Das zur aufsteigenden Flanke symmetrische Verhalten des Stromes in der absteigenden Flanke zeigt eine gute Wahl der Flankensteilheiten bezüglich der obigen Einschränkungen. Um die Inaktivierungen von Strömen zu messen, wurden Spannungssprünge entworfen. Hierbei springt die Spannung ausgehend vom einem Haltepotential für 30 s auf

ein depolarisiertes Potential und schaltet anschließend wieder auf ein repolarisiertes Potential um. In ähnlicher Weise wurden Spannungssprünge für die Messung der Aktivierung von Strömen entworfen.

Die gemessenen Membranpotentiale sind entweder Ruhepotentiale im Modus ‚Current Clamp‘ oder die Umkehrpotentiale im Modus ‚Voltage Clamp‘ während der Applikation von Spannungsrampen. Die angegebenen Widerstände und Kapazitäten wurden im Rahmen ihrer Kompensation ermittelt. Der Leckstrom durch den Widerstand des Gigaseals zwischen der Pipette und der extrazellulären Lösung wurde nicht kompensiert. Die Stromkurven in den Abbildungen sind Originalmessungen ohne Subtraktion eines Leckstroms. Konnte kein stabiles, ausreichendes Gigaseal oder kein guter intrazellulärer Zugang erzielt werden, wurde die Zelle verworfen. Gleiches galt für Zellen, bei denen die Messung nicht abgeschlossen werden konnte. Zur Quantifizierung der Stromreduktion unter extrazellulärem Barium, TEA und den verschiedenen Konzentrationen von 4-AP, wurde die lineare Stromkomponente der Strom-Spannungs-Beziehung im Modus ‚Whole Cell‘ subtrahiert.

2.3 Statistik

Messreihen

Soweit sinnvoll, wurde zu den Ergebnissen einer Messreihe der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und die Anzahl (n) angegeben. Für alle statistischen Analysen wurde zum Vergleich zweier Messreihen der Wilcoxon Test verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied gewertet. Die Analysen wurden mit der Software SPSS, Version 9, und Sigma Stat, Version 2, erstellt.

Analyse der Kurven

Aus den Strom-Spannungs-Beziehungen wurden die spezifischen Leitfähigkeiten $\Delta g = \Delta I / \Delta U$ innerhalb bestimmter Kurvenabschnitte berechnet. Dies erfolgte durch Bildung eines Mittelwertes aus den Einzelleitfähigkeiten g_1, \dots, g_n der Samples in den relevanten Kurvenabschnitten (Einwärtsstrom, Auswärtsstrom und minimale Leitfähigkeit). Die Beziehung zwischen Leitfähigkeit und Spannung wurde mit Hilfe der Boltzmannfunktion beschrieben [31]. Sie beschreibt das Verhältnis offener und geschlossener Kanäle in Abhängigkeit des Membranpotentials.

$$\frac{close}{open} = \exp\left(-\frac{w_0 - w(U)}{Faktor}\right) \quad (\text{Gleichung 3})$$

w_0 = Konformationsenergie beim Öffnen des Kanals ohne Membranpotential

$w(U)$ = Energie der bewegten Ladungen bei einem Potential U , und somit

$w(U) = \text{Anzahl der Ladungen} \times \text{Elementarladung} \times \text{Potentialdifferenz } U$.

Umgeformt und vereinfacht entspricht der Anteil offener Kanäle der normierten Leitfähigkeit g' .

$$\frac{open}{close + open} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{U - U_{1/2}}{k}\right)} = g' \quad (\text{Gleichung 4})$$

Dabei ist $U_{1/2}$ das Potential, bei dem $g' = 0,5$ ist. Der Faktor k bestimmt die Steilheit dieser sigmoiden Beziehung.

Bei Interaktion mit mehreren Bindungsstellen bzw. Durchtrittsmöglichkeiten potenziert sich der Nenner, wie es durch die Boltzmannfunktion n -ten Grades beschrieben wird:

$$g' = \frac{1}{\left[1 + \exp \frac{U - U'}{k} \right]^n} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Die Blockade (B) eines Enzyms, eines Rezeptors oder eines Kanals (A) lässt sich durch eine Sättigungsfunktion beschreiben, analog zu der Michaelis-Menten-Theorie der Enzymkinetik:

$$y = \frac{[AB]}{[AB] + [A]} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Dabei ist $A + B \leftrightarrow AB$ und y der Anteil blockierter A . Die Reaktion erfolgt mit den kinetischen Konstanten k_1 , bzw. k_{-1} , die sich in der Dissoziationskonstante $K_D = k_{-1} / k_1 = [A] [B] / [AB]$ wiederfinden. Der Hill-Koeffizient n modifiziert nun dieses System, indem er die Steilheit der Sättigungsfunktion bestimmt:

$$\text{Anteil freier Kanäle} = 1 - y = \frac{1}{1 + ([B] / K_D)^n} \quad (\text{Gleichung 7})$$

Die Darstellung und Analyse der Kurven mit den oben beschriebenen Gleichungen erfolgte mit Hilfe der Software HEKA, Version 7.4., SPSS Version 9.0. und Sigma Plot 2001, Version 7.

3 Ergebnisse

3.1 Passive elektrische Eigenschaften

Der Widerstand eines stabilen Gigaseals wurde aus der Strom-Spannungsbeziehung bei einer langsamen Spannungsrampe nahe dem Nulldurchgang der Stromkurve ermittelt. Der errechnete Sealwiderstand an 61 Perizyten betrug $12,2 \pm 8,9 \text{ G}\Omega$. Dieser Widerstand zeigte eine lineare Strom-Spannungs-Beziehung.

Das Membranpotential wurde in der Extrazellulärlösung mit $5 \text{ mM } [\text{K}^+]$ gemessen. Bei 78 Zellen betrug es $-46,5 \pm 8,6 \text{ mV}$. Zusätzlich wurde an 40 Perizyten das Membranpotential in Extrazellulärlösung mit $60 \text{ mM } [\text{K}^+]$ bestimmt. Es lag bei $-23,2 \pm 2,2 \text{ mV}$. In einigen Experimenten mit besonders niedrigen Membranleitfähigkeiten wurden außerdem bei $5 \text{ mM } [\text{K}^+]$ Fluktuationen des Membranpotentials zwischen -85 mV und -50 mV beobachtet.

Die Größe der Membrankapazität wurde an 72 koronaren Perizyten ermittelt. Sie betrug durchschnittlich $150 \pm 123 \text{ pF}$.

3.1.1 Charakterisierung der Strom-Spannungsbeziehung

Um zu untersuchen, welche Ströme bei welchen Spannungen vorherrschen, wurden langsame Spannungsrampen in der Voltage-Clamp-Konfiguration appliziert. Die folgende Abbildung 11 zeigt die typische Stromantwort eines Perizyten:

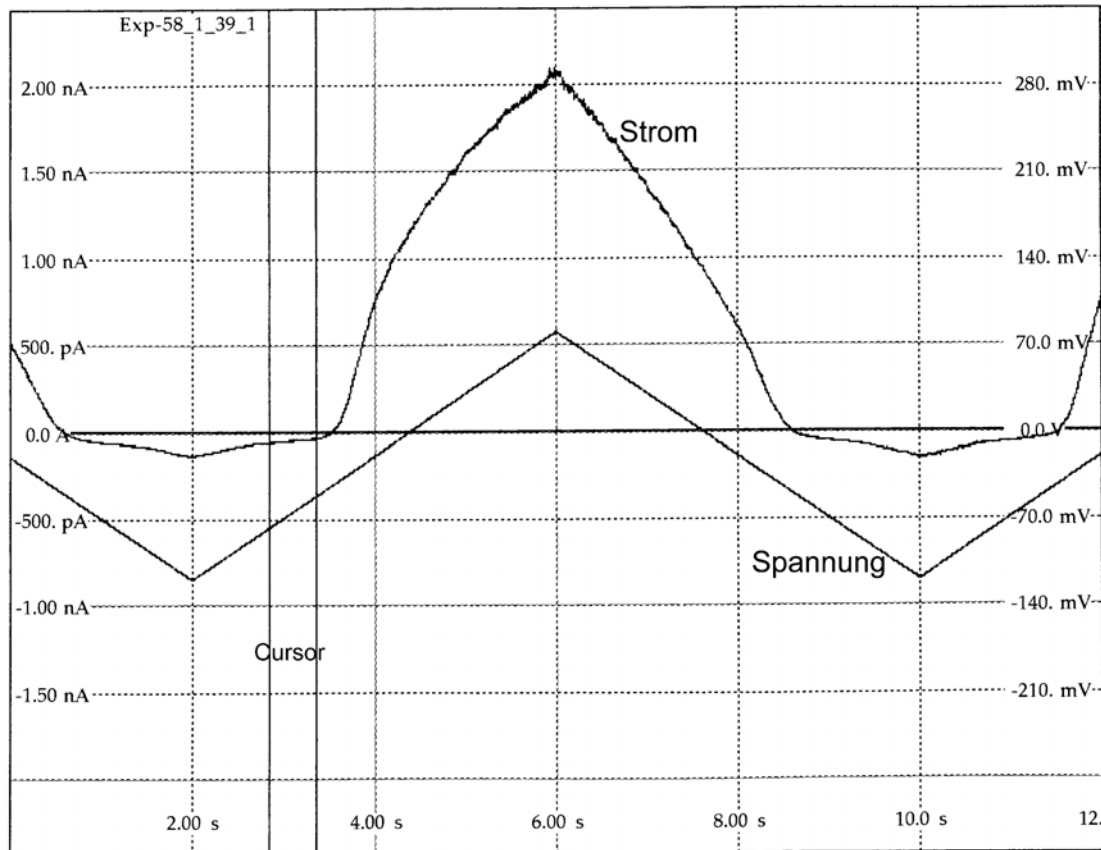


Abbildung 11. Typischer Screenshot der Spannungsrampe mit Stromantwort eines Perizyten. Mit im Bild zu sehen sind zwei Markierungslinien (Cursor), über die der zu analysierende Bereich ausgewählt werden kann.

Um die Abhängigkeit des Stromes von dem vorgegebenen Membranpotential darzustellen (Strom-Spannungs-Beziehung), erfolgte die Auftragung der Strom- und Spannungswerte der aufsteigenden Flanke der Spannungsrampe in einem Strom-Spannungs-Diagramm (U-I-Diagramm, Abbildung 12). Die Steigung eines Abschnittes entspricht der Leitfähigkeit in diesem Abschnitt ($\Delta g = \Delta I / \Delta U$).

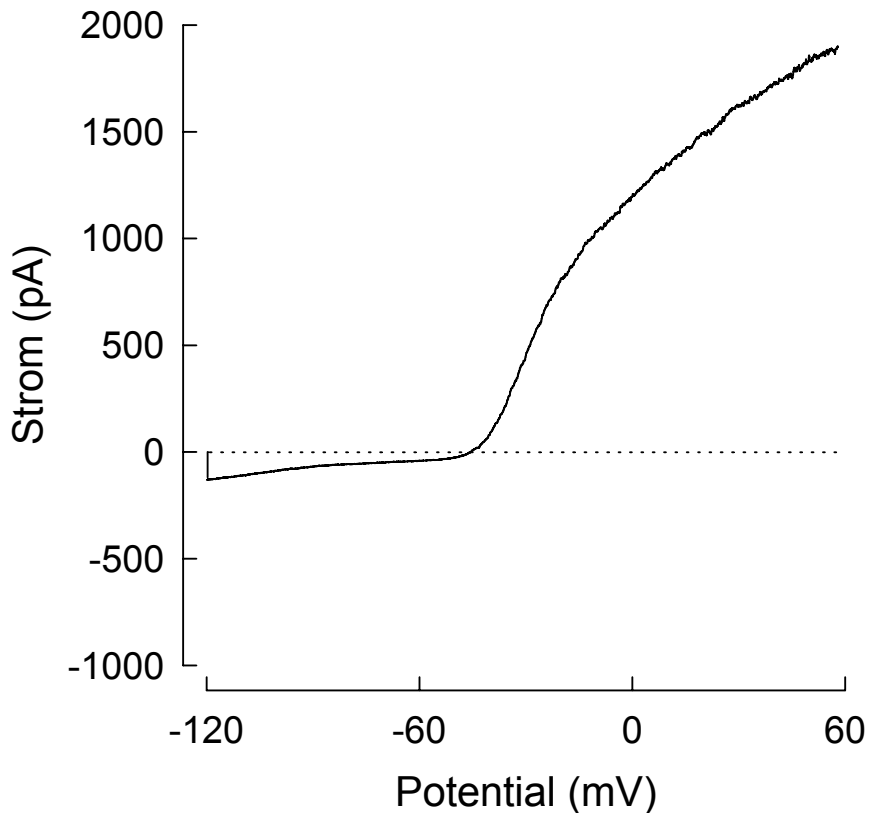


Abbildung 12. Typisches Strom-Spannungs-Diagramm (U-I-Diagramm) eines Perizyten. Die Stromantwort auf die Spannungsrampe ist in Abhängigkeit der Spannung dargestellt.

In der Stromantwort ließen sich im Wesentlichen folgende drei Kurvenabschnitte ermitteln:

Auswärtsstrom

Im Bereich depolarisierter Potentiale ab -55 mV konnte ein großer Auswärtsstrom beobachtet werden. Sein Beginn markiert den positiven Kurvenabschnitt. Wir fanden diesen Auswärtsstrom als meist charakteristischen Strom koronarer Perizyten. Während dieser Strom zunächst steil und annähernd linear anstieg, wurde bei höheren positiven Potentialen ab +20 mV häufig eine Reduktion der Leitfähigkeit gefunden. Die maximale Leitfähigkeit des Auswärtsstromes in 5 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration betrug bei 78 Perizyten $16,6 \pm 15,6$ nS und war im annähernd linearen Anfangsbereich zu beobachten.

Minimale Membranleitfähigkeit

Der mittlere, flachste Kurvenabschnitt entspricht der geringsten Membranleitfähigkeit und wird am wenigsten durch Ionenkanal-Ströme beeinflusst. Die Strom-Spannungs-Beziehung dieser Leitfähigkeit entspricht dem Abschnitt einer Gerade und stellt stets auch einen kleinen Teil von Aus- und Einwärtsstrom dar. Die kleinste Leitfähigkeit wurde bei einem Membranpotential von -90 mV bis -60 mV gefunden. Bei 78 Zellen betrug sie $1,2 \pm 1,3$ nS, entsprechend einem Membranwiderstand von $0,83 \pm 0,77$ G Ω . In manchen Experimenten lag die minimale Leitfähigkeit der Strom-Spannungs-Beziehung bei nur $0,1$ nS. Das entspricht einem Widerstand, der in der Größenordnung des Gigaseals liegt. Ein erheblicher Teil dieser linearen Stromkomponente der Strom-Spannungs-Beziehung wurde vermutlich durch den Leckstrom zwischen Pipette und Extrazellulärraum hervorgerufen.

Einwärtsstrom

In dem negativsten Kurvenabschnitt fand sich ein im Vergleich zum Auswärtsstrom kleiner Einwärtsstrom. Das Verhältnis von Einwärtsstrom und Auswärtsstrom variierte von Zelle zu Zelle. Die maximale Leitfähigkeit des Einwärtsstroms in 5 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration fand sich bei hyperpolarisierten Potentialen zwischen -120 mV und -100 mV und betrug $2,9 \pm 2,8$ nS bei 78 Zellen.

Der Vergleich der Leitfähigkeiten in den Kurvenabschnitten des Einwärts- und Auswärtsstroms zeigte einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

3.2 Membranströme bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen

Die Superfusion der koronaren Perizyten mit verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen ergab auffällige Veränderungen in der Strom-Spannungs-Beziehung. Das Membranpotential verschob sich bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration in Richtung depolarisierter Potentiale

($-48,9 \pm 9,6$ mV bei 5 mM $[K^+]$ und $-23,2 \pm 2,2$ mV bei 60 mM $[K^+]$; $n = 40$). Dies war sowohl als Potential in der Current-Clamp-Konfiguration zu messen als auch aus den Strom-Spannungs-Beziehungen zu ermitteln. Gleichzeitig war bei erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentrationen ein vergrößerter Einwärtsstromes zu beobachten. Die folgende Darstellung (Abbildung 13) zeigt die typischen Veränderungen an einem Perizyten:

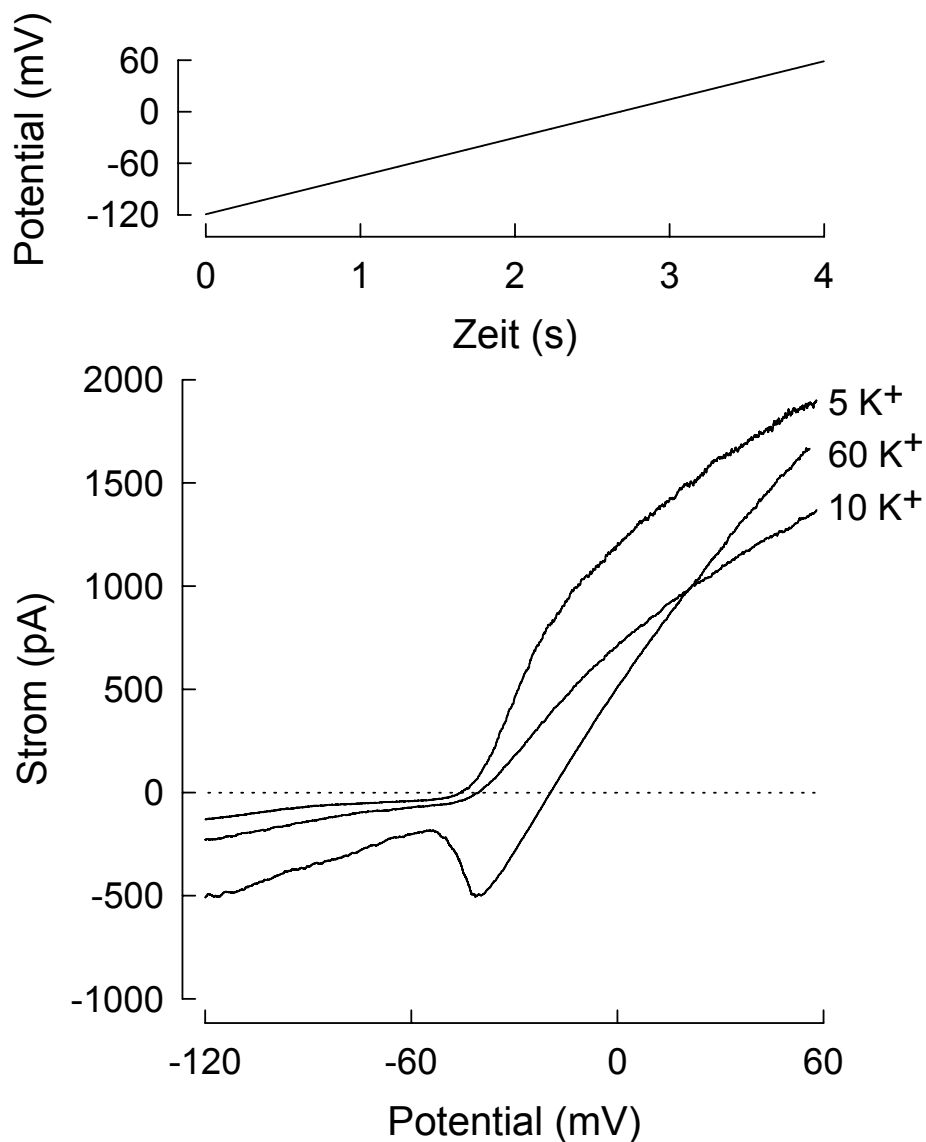


Abbildung 13. Spannungsrampe (oben) und typische Strom-Spannungs-Beziehung (unten) bei 5, 10 und 60 mM $[K^+]$ in der extrazellulären Lösung.

Die obere Kurve zeigt den Spannungsverlauf in der aufsteigenden Flanke der langsamem Spannungsrampe. Der untere Graph stellt die dazugehörige Strom-Spannungs-Beziehung bei 5, 10 und 60 mM $[K^+]$ dar. Die aus dem Nullstromdurchgang ermittelten Membranpotentiale waren -45, -40 und -19 mV. Die Zunahme des Einwärtsstromes mit steigender Kaliumkonzentration führte zu steigenden Leitfähigkeiten in diesem Bereich: 2,5 nS bei 5 mM $[K^+]$, 3,2 nS bei 10 mM $[K^+]$ und 5,4 nS bei 60 mM $[K^+]$. Die minimale Leitfähigkeit lag bei 0,9 nS und die maximale Leitfähigkeit konnte im Auswärtsstrom mit 40,1 nS bei 5 mM $[K^+]$ gemessen werden. Die Zellkapazität betrug 127 pF und damit lag die Stromdichte bei 9,5 pA/pF in 5 mM $[K^+]$ im Nullspannungsdurchgang. Bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 60 mM $[K^+]$ zeigte die Strom-Spannungs-Beziehung außerdem eine Senke des Stroms im Bereich von -50 mV bis -20 mV und die Stromumkehr lag ungefähr im Bereich des Kaliumgleichgewichtspotential E_K . Das Kaliumgleichgewichtspotential $E_K = -58 \text{ mV} \times \log [K^+_{\text{innen}}] / [K^+_{\text{au\ss}en}]$ betrug ungefähr -86 mV in 5 mM $[K^+_{\text{au\ss}en}]$, -68 mV in 10 mM $[K^+_{\text{au\ss}en}]$ und -23 mV in 60 mM $[K^+_{\text{au\ss}en}]$. Der Einwärtsstrom zeigte außerdem eine Gleichrichtercharakteristik. Der Auswärtsstrom zeigte dagegen unabhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration einen Beginn bei ungefähr -55 mV.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein spannungsabhängiger Kaliumkanal K_V (Auswärtsstrom) und ein Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanal K_{IR} (Einwärtsstrom) für die dominierenden Ströme an kultivierten koronaren Perizyten verantwortlich sind. Wir untersuchten diese Ströme im Detail.

3.3 Der Einwärtsstrom

3.3.1 Block des Einwärtsstromes durch Bariumionen

Um die Annahme zu überprüfen, dass der Einwärtsstrom durch Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle hervorgerufen wird, wurde deren Blockierbarkeit durch Bariumionen untersucht. Dazu wurde die extrazelluläre Lösung (5 mM und 60 mM $[K^+]$) mit 50 μM BaCl versetzt. Die folgende Abbildung 14 zeigt die

Spannungsrampe (slew rate 60 mV/s) und darunter die dazugehörige Strom-Spannungs-Beziehung an einer typischen Zelle:

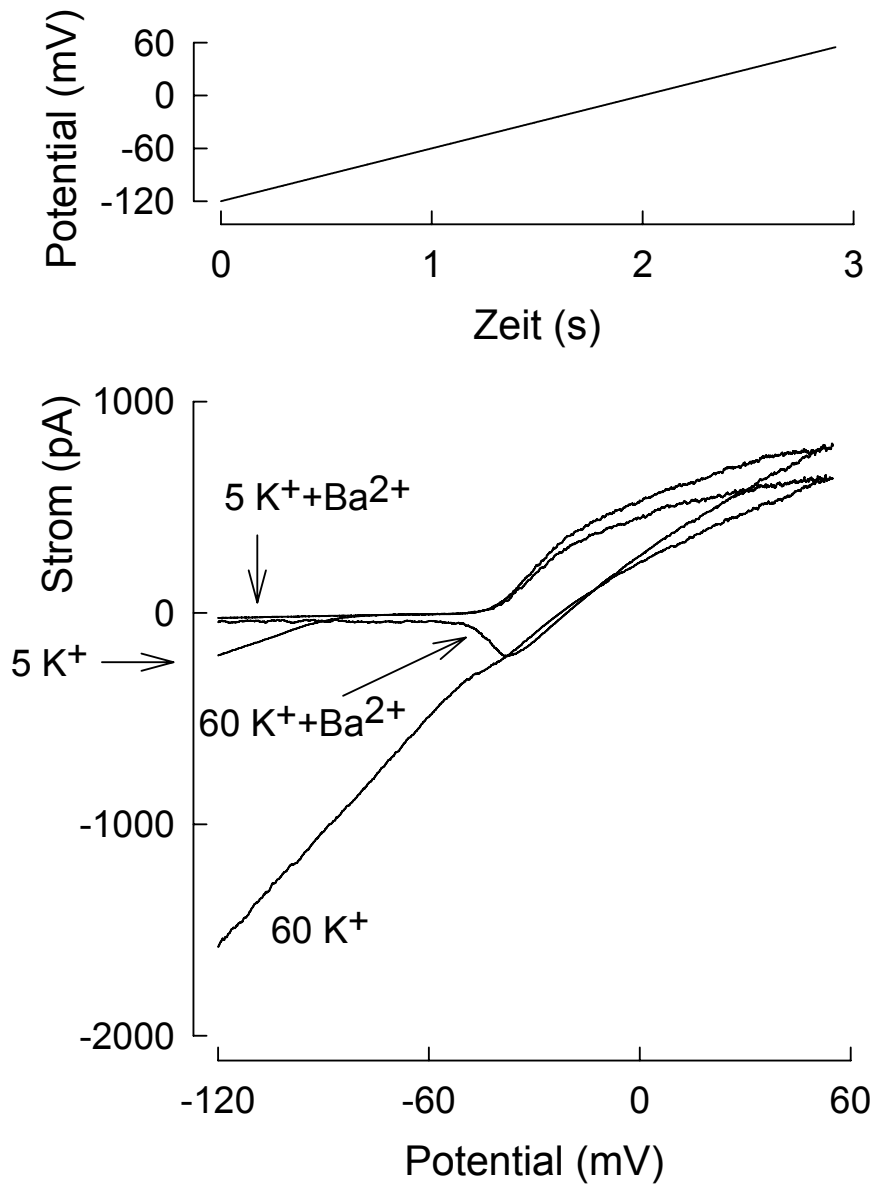


Abbildung 14. Blockade des einwärts gleichrichtenden Kaliumstromes durch 50 μM Bariumchlorid in der extrazellulären Lösung. Die obere Grafik zeigt die angelegte Spannungsrampe, die untere Grafik die dazugehörige Strom-Spannungs-Beziehung für jeweils 5 mM und 60 mM extrazelluläre Kaliumkonzentrationen mit und ohne 50 μM BaCl_2 . Die Leitfähigkeiten des Einwärtsstroms betragen 5,8 nS in 5 mM $[\text{K}^+]$ und 18,2 nS in 60 mM $[\text{K}^+]$ und wurden durch die Zugabe von Bariumionen komplett blockiert.

Die maximale Leitfähigkeit des Einwärtsstromes betrug 5,8 nS bei 5 mM $[K^+]$ und 18,2 nS bei 60 mM $[K^+]$ in der extrazellulären Lösung. Das Nullstrompotential in der 5 mM $[K^+]$ enthaltenden Lösung lag bei $-75,5$ mV und die Membrankapazität betrug 53 pF. Bei Zugabe von Bariumchlorid (50 μ M) in die extrazelluläre Lösung trat sowohl in 5 mM $[K^+]$ als auch in 60 mM $[K^+]$ ein nahezu vollständiger und reversibler Block des Einwärtsstromes auf. Dieser Block des Einwärtsstromes mit 50 μ M $BaCl_2$ war bei allen sieben untersuchten Perizyten zu beobachten. Bei einem Potential von -127 mV betrug der Einwärtsstrom 416 ± 548 pA in der 60 mM $[K^+]$ enthaltenden Lösung. Unter dem selben Potential konnte nach Zusatz von 50 μ M $BaCl_2$ eine signifikante Reduktion des Stromes auf 7 ± 10 pA gefunden werden ($p < 0,02$).

Um nur den auf den Bariumblock sensitiven Strom darzustellen, wurde von der in 5 mM $[K^+]$ und 60 mM $[K^+]$ aufgenommenen Kurve die jeweilige Kurve unter dem Block mit Bariumionen subtrahiert. Die nachfolgende Abbildung 15 zeigt diesen Differenzstrom der oben gezeigten Zelle in jeweils 5 mM und 60 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration.

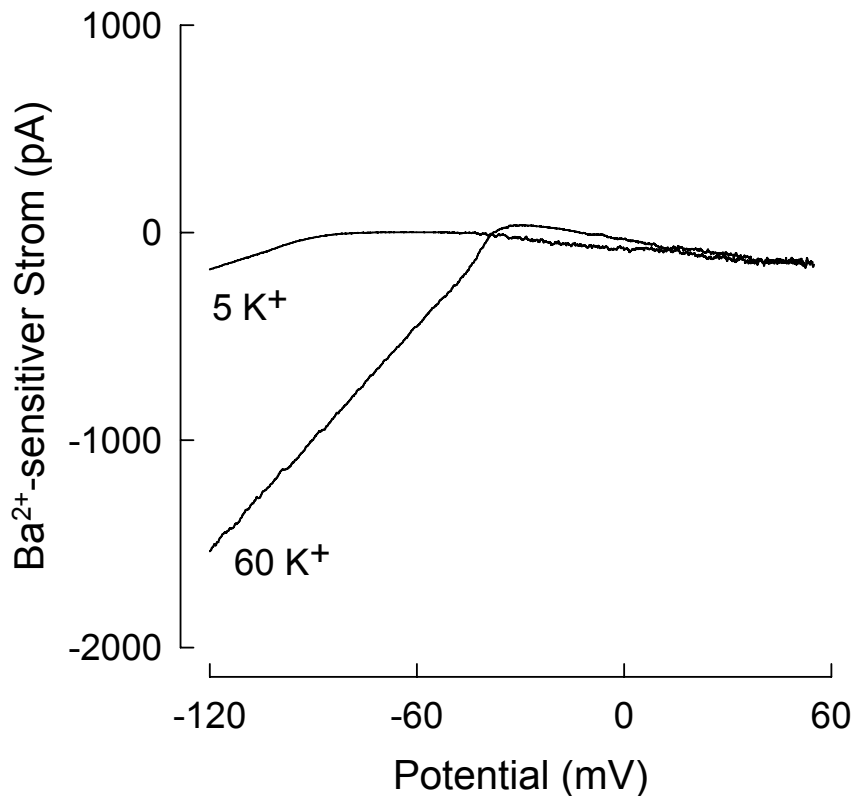


Abbildung 15. Bariumsensitiver Strom. Durch Subtraktion der Stromantworten ohne Barium von der Stromantwort mit 50 μM Bariumchlorid ergibt sich der Barium-sensitive Einwärtsstrom bei 5 mM und 60 mM $[\text{K}^+]$ in der extrazellulären Lösung.

3.3.2 Charakteristik des Einwärtstromes

Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle (K_{IR} -Kanäle) zeigen eine hohe Leitfähigkeit bei Potentialen negativer als das Kaliumgleichgewichtspotential E_{K} . Bei positiveren Potentialen als E_{K} ist der Kaliumstrom auswärtsgerichtet und die Leitfähigkeit verringert sich. Der auswärtsgerichtete Kaliumauswärtsstrom trägt bei Potentialen etwas positiver als E_{K} zur Stabilisierung des Ruhepotentials bei. Um die Stärke des Effekts zu untersuchen wurde bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM die Leitfähigkeit gegen das Membranpotential aufgetragen. Die lineare Stromkomponente der Strom-Spannungs-Beziehung

wurde subtrahiert und die Leitfähigkeit zur besseren Darstellung normalisiert (Abbildung 16).

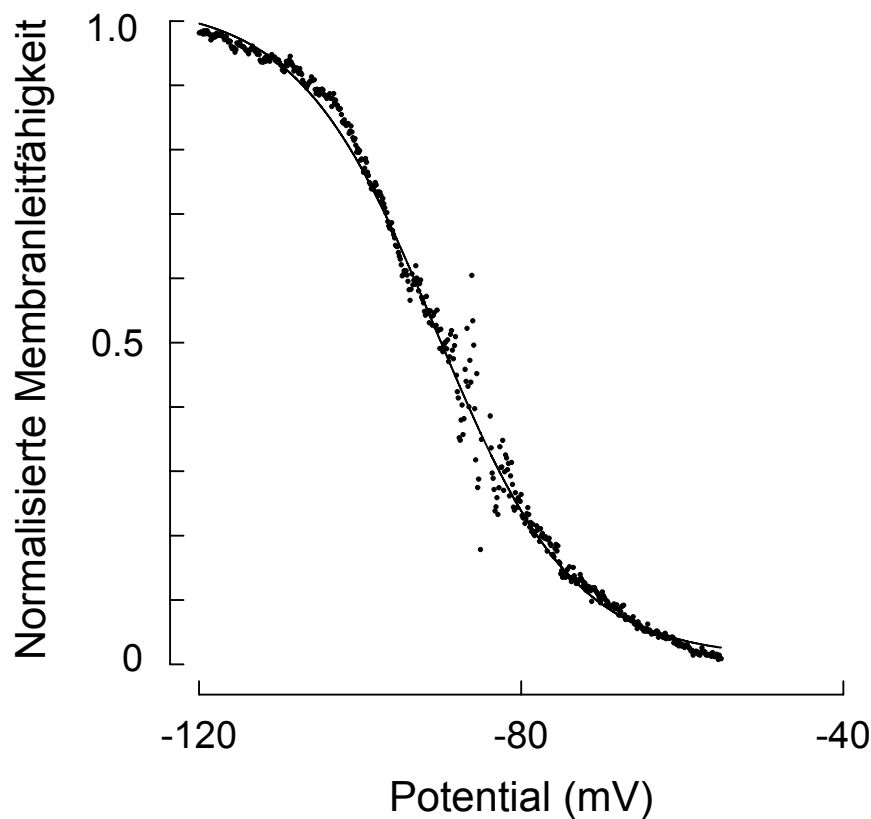


Abbildung 16. Abhängigkeit der normalisierten Leitfähigkeit des Einwärtsstromes von dem Membranpotential bei 5 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration. Die durchgezogene Linie zeigt die angenäherte Boltzmannfunktion erster Ordnung.

Die Kurve zeigt eine deutlich sigmoide Abhängigkeit zwischen der normalisierten Leitfähigkeit und dem Membranpotential. Die Kurve wurde mit einer Boltzmannfunktion erster Ordnung analysiert (aus Gleichung 5):

$$g'_K = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{U - U'}{k}\right)} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Dabei bezeichnet U' die Spannung, bei der die halbmaximale Leitfähigkeit vorliegt und der Slope Factor k bestimmt die Steilheit dieser Beziehung. Aus der obigen Kurve (Abbildung 16) ergibt sich $U' = -90,5 \text{ mV}$ und $k = 8,5 \text{ mV}$. An insgesamt 5 Zellen konnten wir für den Einwärtsstrom in 5 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration einen Slope Factor $k = 6,8 \pm 1,6 \text{ mV}$ berechnen.

3.4 Der Auswärtsstrom

3.4.1 Aktivierung des Auswärtsstromes

Als nächstes wurde der Auswärtsstrom näher untersucht. Hier war ein spannungsabhängiger Kaliumkanal zu vermuten. Um die spannungsabhängige Aktivierung des Auswärtsstroms zu zeigen, wurden in der Voltage-Clamp-Konfiguration depolarisierende Spannungssprünge appliziert und der dazugehörige Strom aufgezeichnet. Die Spannungssprünge starteten jeweils vom Membranpotential aus und bestanden aus einer 100 ms dauernden depolarisierten Spannungsstufe. Das Potential dieser Spannungsstufen wurde in 10 mV Schritten von -55 mV bis $+35$ mV erhöht. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration betrug dabei 5 mM. Die nachfolgende Abbildung 17 zeigt die Whole-Cell-Stromantwort eines typischen Perizyten.

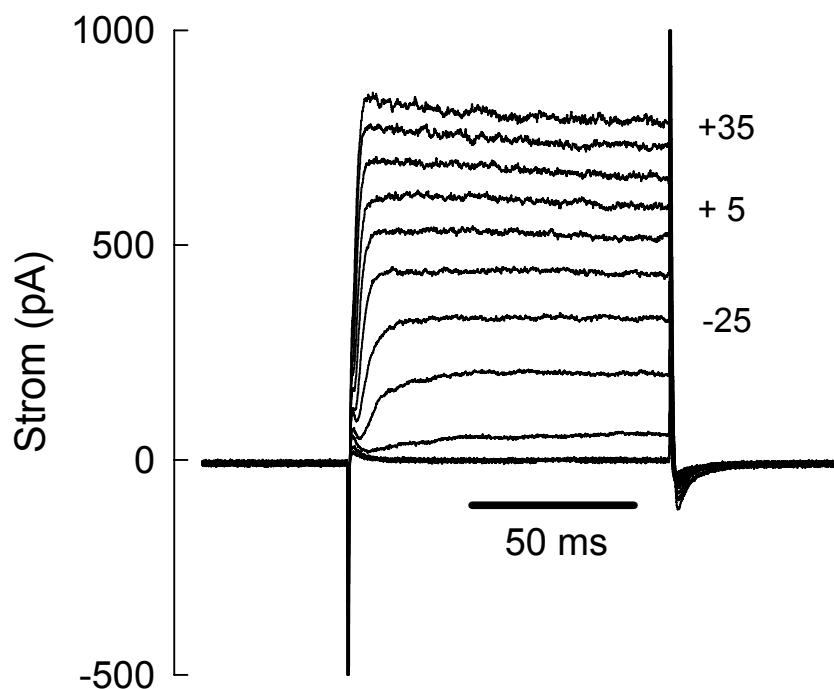


Abbildung 17. Aktivierung des Auswärtsstromes. Dazu wurden 100 ms andauernde Spannungsstufen von -55 mV bis $+35$ mV in 10 mV Schritten abgegeben und die dazugehörige Stromantwort gemessen.

Der Beginn des Stromes bei der plötzlich einsetzenden Depolarisation war unterschiedlich stark verzögert. Die Aktivierung des Stromes wurde mit zunehmender Depolarisation schneller. Bei einer Depolarisation dieses Perizyten auf ein Potential von -5 mV betrug die Zeit bis zum Maximum des Auswärtsstromes 12 ms. Mit dem Ziel einer quantitativen Beschreibung des Aktivierungsvorgangs wurden die Ströme weiterer Perizyten gemessen. Dabei zeigte sich jedoch eine verbleibende, nicht kompensierbare kapazitive Stromkomponente, weshalb die Analyse der Stromaktivierung mit einer Boltzmannfunktion gleich welcher Ordnung nicht möglich war.

Die folgende Abbildung 18 zeigt den Endstrom der Spannungsstufen in Abhängigkeit des Potentials. Dieser Strom wurde auf die Zellkapazität (40 pF) normalisiert. Somit kann die Stromdichte des Auswärtsstromes in Abhängigkeit des Potentials dargestellt werden:

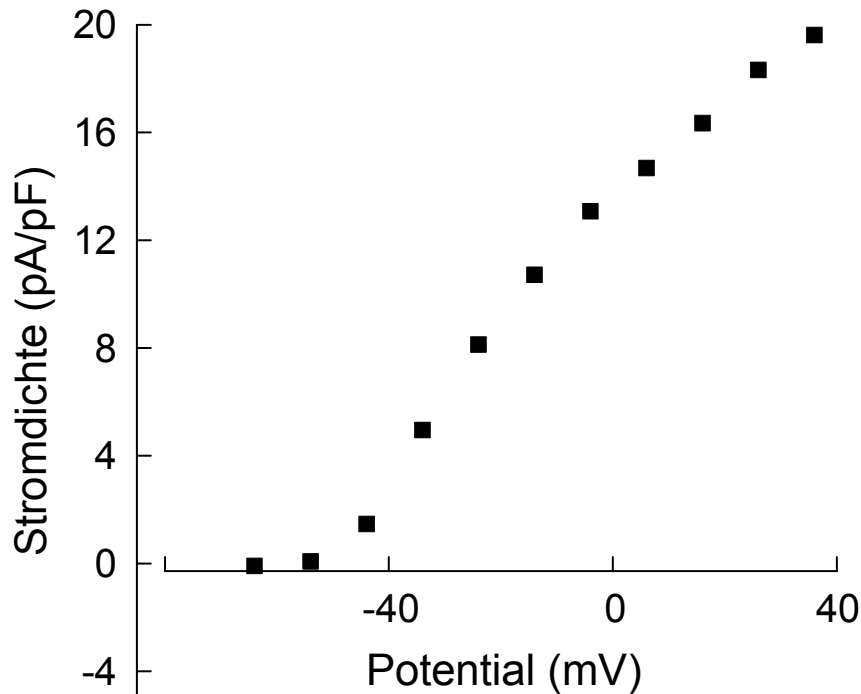


Abbildung 18. Stromdichte (= Strom pro Zellkapazität; hier 40pF) des Auswärtsstromes in Abhängigkeit des Potentials

3.4.2 Inaktivierung des Auswärtsstromes

Wurden länger andauernde depolarisierte Spannungssprünge verwendet, war ein langsamer Abfall des Auswärtsstromes zu beobachten. Um diese Inaktivierung näher zu untersuchen, wurden lange depolarisierte Spannungssprünge mit einer Länge von 30 s verwendet. Die Spannungssprünge starteten bei einem Haltepotential von -75 mV und depolarisierten die Zelle in jeweils 20 mV Schritten gestuft von -25 mV bis $+55$ mV (Abbildung 19).

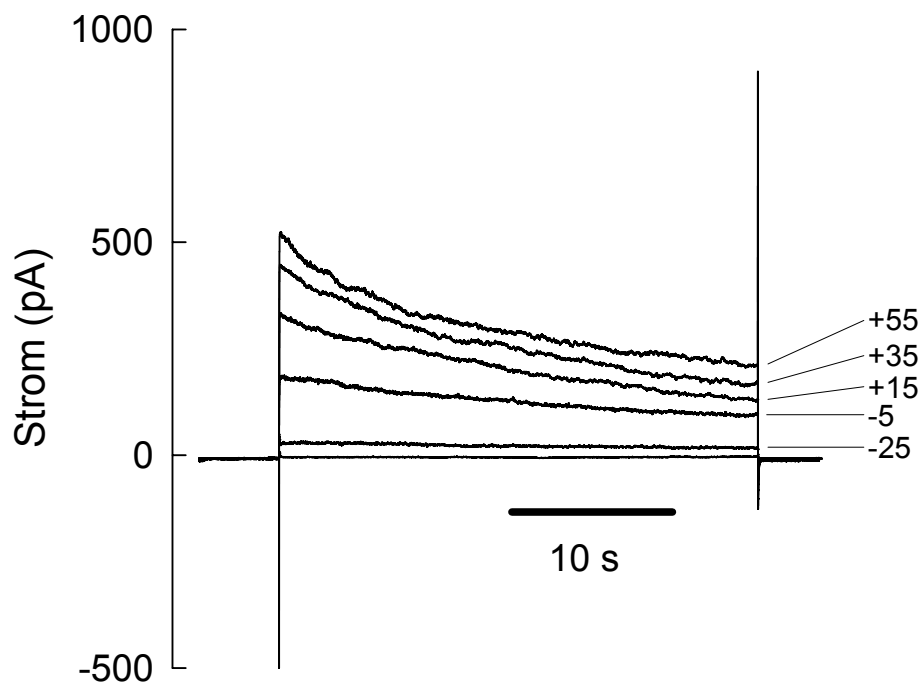


Abbildung 19. Inaktivierung des Auswärtsstromes bei 30 s dauernden Spannungssprüngen von -25 mV bis $+55$ mV. Die Inaktivierung zeigt einen exponentiellen Abfall mit einer Zeitkonstante $\tau = 15,9$ s

Der Auswärtsstrom der dargestellten Zelle betrug bei einem Potential von -5 mV anfangs 182 pA und fiel am Ende des Spannungssprunges nach 30 s auf 95 pA. Dieser Abfall konnte durch eine Exponentialfunktion mit der Formel $I(t) = I_0 \times e^{-t/\tau}$

beschrieben werden. Die daraus errechnete Zeitkonstante betrug $\tau = 15,9$ s. Die Kapazität dieses Perizyten lag bei 235 pF.

Eine Inaktivierung mit der beschriebenen Depolarisation über 30 s auf -5 mV war auch bei den anderen Perizyten beobachten. Das Ausmaß des Abfalls durch die Inaktivierung der Auswärtsströme variierte von Zelle zu Zelle und erreichte auch bei länger andauernder Depolarisation nicht mehr als 50%. Bei negativeren Potentialen war nur eine geringe Inaktivierung zu beobachten. Die Inaktivierung konnte mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben werden. An vier Perizyten ergab sich, ausgehend von einem Potential von -75 mV und folgender Depolarisation auf -5 mV, eine Zeitkonstante $\tau = 12,8 \pm 3,6$ s für den Abfall des Auswärtsstromes.

3.4.3 Spannungsabhängigkeit der Auswärtsstromaktivierung

Um die Abhängigkeit der Aktivierung des Auswärtsstromes von dem Potential zu untersuchen, wurde der Reststrom nach dem Ende eines Spannungssprungs, der sogenannte „Tail Current“ analysiert. Ausgehend von einem Haltepotential von -90 mV wurde der Auswärtsstrom durch verschiedene depolarisierte Spannungsstufen aktiviert. Bei der anschließenden plötzlichen Repolarisation auf -60 mV zeigte sich ein kurzer Tail Current (Abbildung 20). Es ist davon auszugehen, dass die Amplituden dieser Tail Currents dem Anteil der zuvor geöffneten spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V -Kanäle) wiedergeben. Die depolarisierten Spannungsstufen wurden dazu in 5 mV Schritten von -55 mV beginnend bis $+25$ mV erhöht. Die nachfolgende Abbildung 20 zeigt die Tail Currents eines Perizyten.

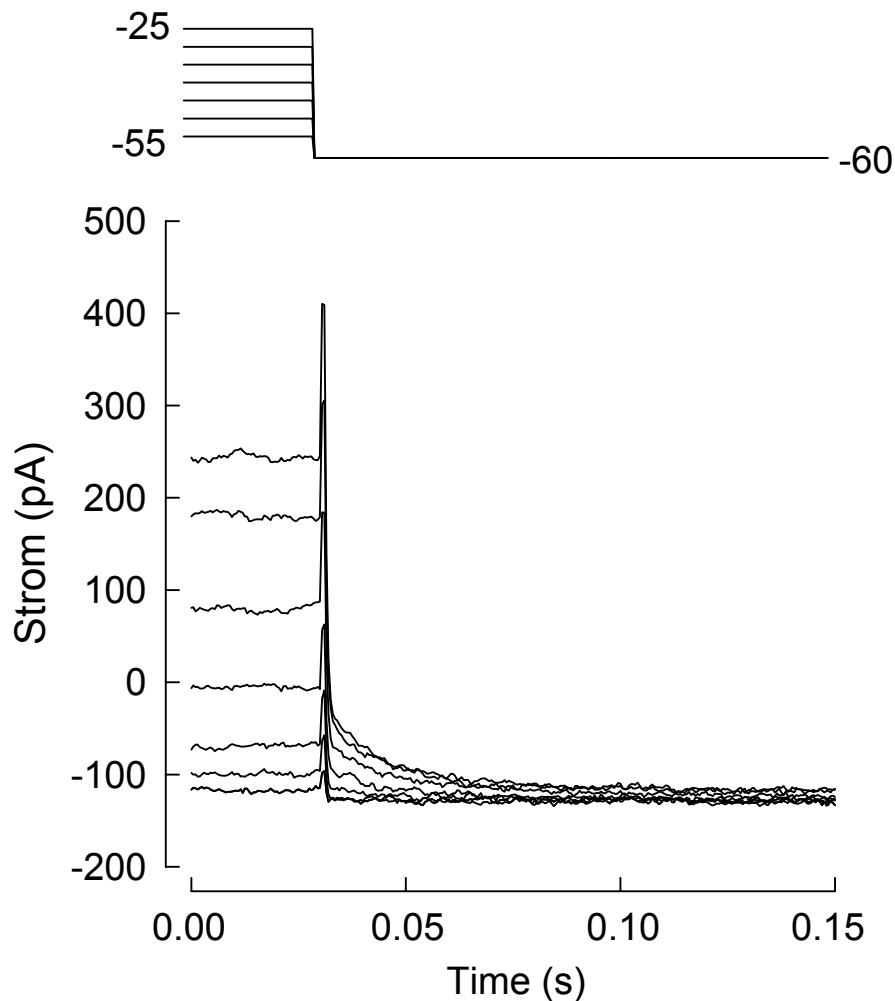


Abbildung 20. „Tail Currents“: Unter den oben abgebildeten Spannungsstufen ergaben sich nach der Repolarisation die darunter aufgetragenen Restströme. Diese nahmen rasch exponentiell ab. Am Ende jeder Spannungsstufe ist ein durch die Zellkapazität artifiziiell hervorgerufener Spike zu erkennen. Der Kurvenabschnitt, der unmittelbar auf diesen Spike folgt, diente der weiteren Analyse.

In der oberen Grafik sind die Enden der 2 s andauernden Spannungsstufen dargestellt. Darunter befinden sich die dazugehörigen Stromkurven. Deutlich ist eine störende kapazitive Komponente zu erkennen, die sich als Spike bei der Beendigung jeder Spannungsstufe darstellt. Die Kapazität des Perizyten lag bei 102 pF. Unmittelbar nach dem Spike folgen die exponentiell abfallenden Tail

Currents. Dieser Kurvenabschnitt des nicht-kapazitiven Reststromes wurde zur weiteren Analyse herangezogen.

Es wurden die Tail Currents von fünf Perizyten untersucht. Der Mittelwert der normalisierten Amplitude der Tail Currents wurde gegen das Potential der vorrausgehenden Spannungsstufe aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Es ergab sich folgende sigmoide Beziehung (Abbildung 21):

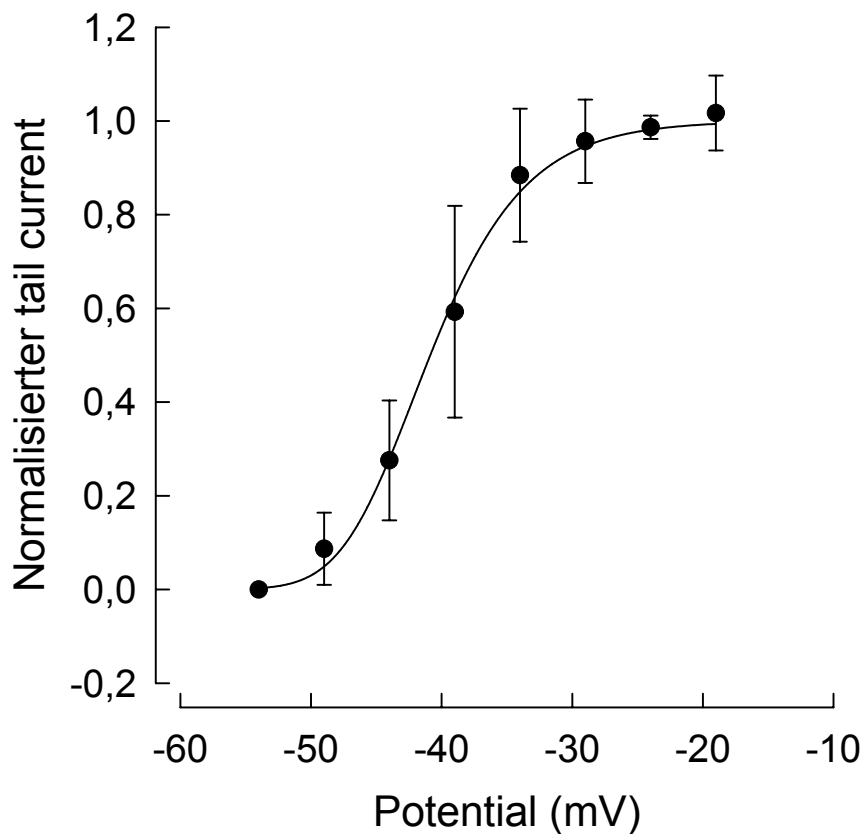


Abbildung 21. Analyse der Tail Currents von 5 Perizyten. Die Punkte geben jeweils den Mittelwert, die Fehlerbalken die Standardabweichung der normalisierten Tail Currents an. Diese Werte wurden mittels einer Boltzmannfunktion vierten Grades weiter analysiert. Die Funktion ist mit der durchgehenden Linie dargestellt.

Die gefundenen Werte wurden mit einer Boltzmannfunktion vierten Grades entsprechend nachstehender Gleichung 9 analysiert:

$$Y = \frac{1}{\left[1 + \exp\left(\frac{U - U'}{k}\right)\right]^4} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Daraus ergibt sich $U' = -48,5$ mV und die halbmaximale Aktivierung tritt bei $U_{1/2} = -40,9$ mV auf. Die Steilheit dieser sigmoiden Beziehung wird durch $k = 4.6$ mV bestimmt. Die Funktion ist mit der durchgehenden Linie dargestellt.

3.4.4 Pharmakologische Charakterisierung des Auswärtsstromes

Mit dem Ziel einer pharmakologischen Charakterisierung des Auswärtsstromes als spannungsabhängiger Kaliumkanal wurde in die extrazelluläre Lösung Tetraethylamonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP) gegeben. Zur Analyse des Auswärtsstromes wurden in der Voltage-Clamp-Konfiguration langsame depolarisierte Spannungsrampen mit einer Flankensteilheit von 60 mV/s angelegt, während der dazugehörige Strom aufgezeichnet wurde.

Inhibierung der Auswärtsströme durch Tetraethylamonium (TEA)

Die Zugabe von 5 mM [TEA] in die extrazelluläre Lösung mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM führte zu einer kompletten Inhibierung des Auswärtsstromes. Die nachfolgende Abbildung 22 zeigt die Strom-Spannungs-Beziehung eines Perizyten vor und nach Zugabe 5 mM [TEA] in die extrazelluläre Lösung.

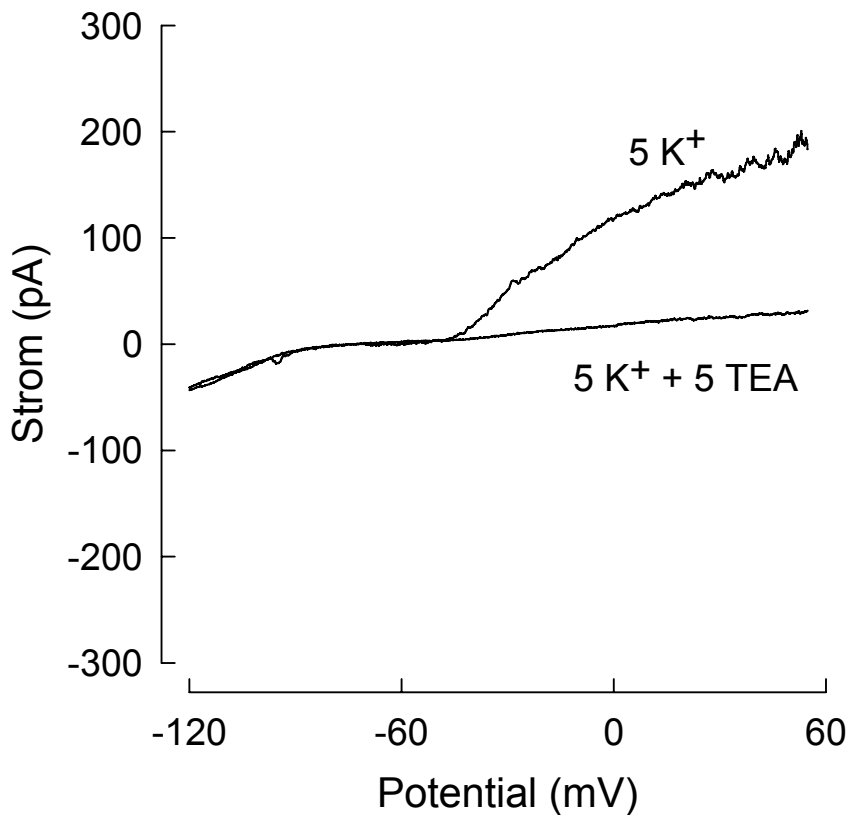


Abbildung 22. Zugabe von 5 mM [TEA] in der extrazellulären Lösung (5 K⁺ + 5 TEA). Der Auswärtsstrom wird komplett inhibiert. Die Membrankapazität dieses Perizyten betrug 85 pF.

Der Auswärtsstrom zeigte eine komplette Inhibierung bis auf die minimale Leitfähigkeit, während der Einwärtsstrom unverändert blieb. Der Block durch TEA war innerhalb weniger Minuten reversibel. An insgesamt 5 Perizyten konnte bei einem Membranpotential von +25 mV eine signifikante Reduktion des Auswärtsstromes durch 5 mM [TEA] von 349 ± 245 pA auf 31 ± 25 pA gefunden werden ($p < 0,04$). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration betrug 5 mM.

Inhibierung der Auswärtsströme durch 4-Aminopyridin (4-AP)

Nach vollständiger Erholung vom TEA-Block zeigte der obige Perizyt bei einer Zugabe von 5 mM [4-AP] in die extrazelluläre Lösung mit einer Kaliumkonzentration von 5 mM die in Abbildung 23 dargestellte Strom-Spannungs-Beziehung. Um ergänzend zu zeigen, inwieweit dabei der Einwärtsstrom beeinträchtigt wurde, wurde die Messung zusätzlich in 60 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration durchgeführt.

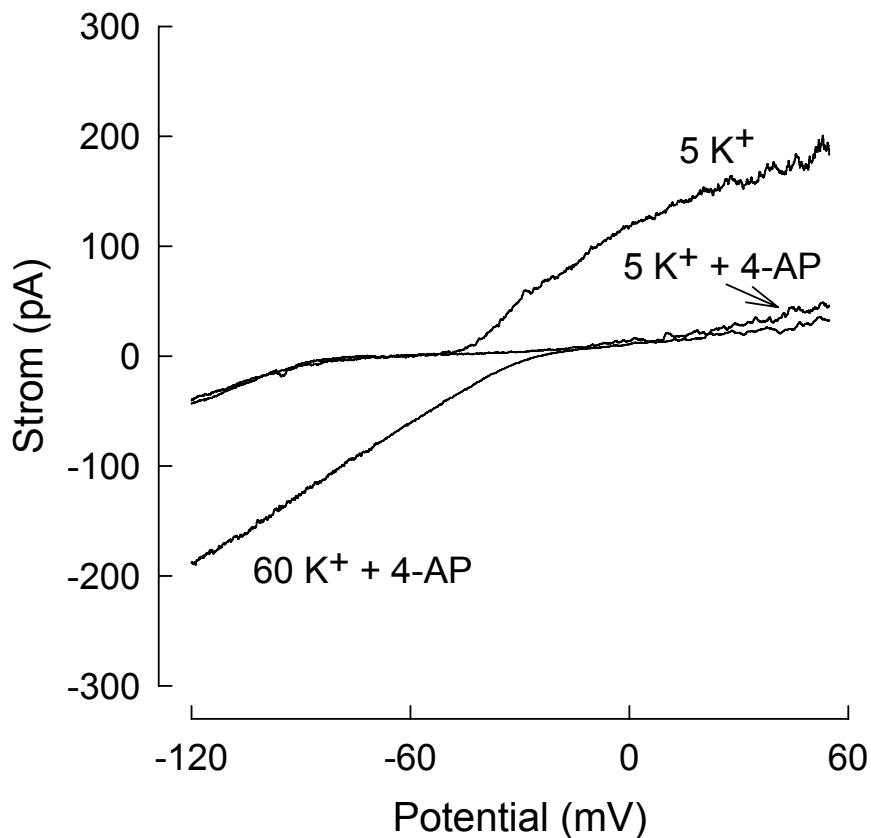


Abbildung 23. Inhibierung der Auswärtsströme durch 5 mM [4-AP]. Der Auswärtsstrom wird sowohl in 5 mM [K⁺] als auch in 60 mM [K⁺] nahezu vollständig inhibiert.

Bei sehr hohen depolarisierten Potentialen ist noch ein kleiner Auswärtsstrom zu beobachten. Der Einwärtsstrom in 5 mM und 60 mM extrazellulärer Kaliumkonzentration zeigt keine Inhibierung. An 8 Perizyten konnte bei einem

Membranpotential von +25 mV eine Reduktion des Auswärtsstromes von 931 ± 840 pA auf 65 ± 67 pA durch den Zusatz von 5 mM [4-AP] gefunden werden ($p < 0,01$). Die extrazelluläre Kaliumkonzentration betrug 5 mM. Während der Block mit TEA innerhalb von Minuten komplett reversibel war, konnte beim Block mit 4-AP auch nach 10 min. bis 15 min. Superfusion mit extrazellulärer Lösung keine komplette Reversibilität gefunden werden.

Dosis-Wirkungsbeziehung von 4-Aminopyridin

Die hohe Sensitivität gegenüber der Inhibierung durch 4-Aminopyridin ist ein wichtiges Charakteristikum von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Deswegen wurde die Dosisabhängigkeit der durch 4-AP induzierten Inhibierung der Ausgangsströme detaillierter untersucht. Je Perizyt wurden 3 aufsteigende Konzentrationen von 4-AP in 5 mM extrazellulärer Kaliumlösung getestet. Die nachfolgende Abbildung 24 zeigt die Strom-Spannungs-Beziehung eines Perizyten ohne und bei Zusatz von 0,001 mM, 0,01 mM und 0,1 mM 4-Aminopyridin während der langsamen Spannungsrampen (60 mV/s).

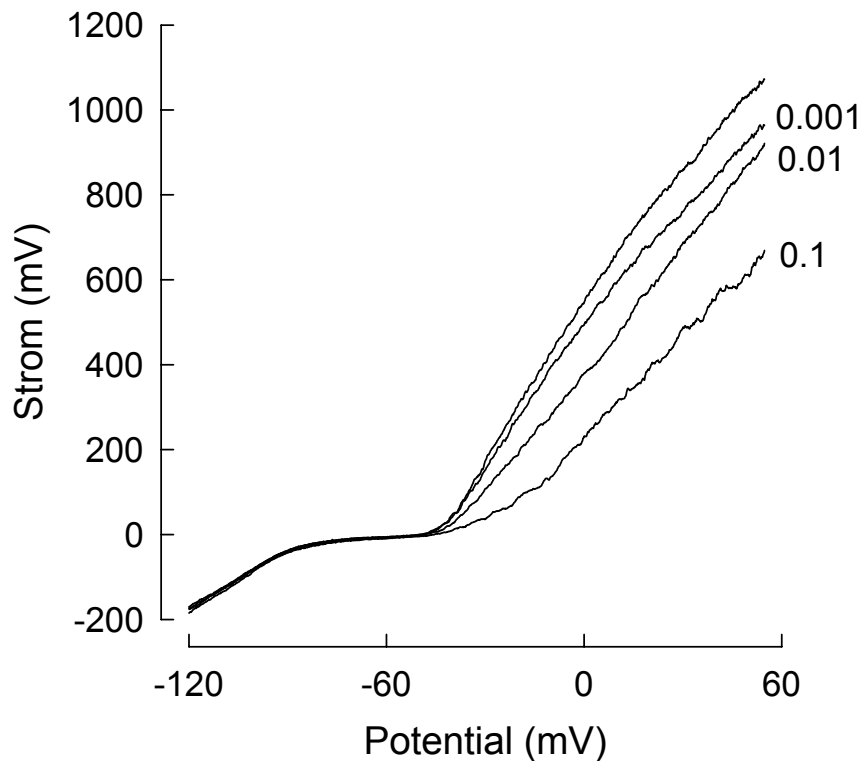


Abbildung 24. Dosisabhängige Inhibierung des Auswärtsstromes durch 0,001 mM, 0,01 mM und 0,1 mM [4-AP]. Der Auswärtsstrom wird durch zunehmende Konzentrationen von 4-AP in der Extrazellulärlösung stärker gehemmt. Die Membrankapazität betrug 235 pF.

Der Auswärtsstrom kann durch eine zunehmende Konzentration von 4-Aminopyridin in der extrazellulären Lösung zunehmend gehemmt werden. Der Einwärtsstrom bleibt unbeeinflusst. An einem zweiten Perizyten mit gleichem Versuchsaufbau wurden die Konzentrationen 0,05 mM, 0,5 mM und 5 mM von 4-Aminopyridin getestet (Abbildung 25).

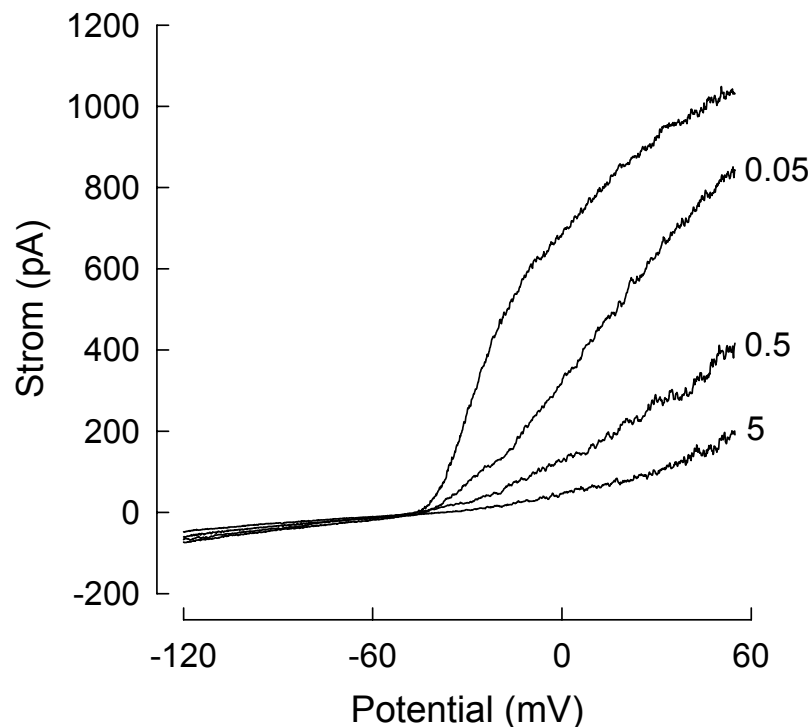


Abbildung 25. Dosisabhängige Inhibierung des Auswärtsstromes durch 0,05 mM, 0,5 mM und 5 mM [4-AP]. Der Auswärtsstrom wird durch höhere Dosen von 4-AP fast komplett inhibiert. Die Membrankapazität betrug 128 pF. Der untersuchte Perizyt zeigte kaum einen Einwärtsstrom.

Eine höhere Konzentration von 4-AP führt zu einer fast kompletten Inhibierung des Auswärtsstromes. Die Stromspuren der beiden untersuchten Perizyten zeigen, dass eine extrazellulär applizierte Konzentration von 4-Aminopyridin die Leitfähigkeit des Auswärtsstromes dosisabhängig reduzierte. Weiterhin war eine Verschiebung der Aktivierung dieses Stromes zu weniger negativen Potentialen zu beobachten.

Mit dem Ziel, die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen, wurden fünf Perizyten mit der Konzentrationsreihen 0,001 mM, 0,01 mM und 0,1 mM und weitere sieben Perizyten mit der Konzentrationsreihen 0,05 mM, 0,5 mM und 5 mM extrazellulärem 4-Aminopyridin analysiert. Die Mittelwerte der Amplituden der Auswärtsströme bei einem Potential von 0 mV wurden gegen die

extrazelluläre Konzentration des 4-Aminopyridin aufgetragen (Abbildung 26). Ein positiveres Potential als Messpunkt ist wegen der variablen Auswärtsrestströme unter dem Block mit 4-Aminopyridin weniger geeignet. Die Werte der Ordinate wurden normalisiert und die Konzentration von 4-Aminopyridin wurde logarithmisch skaliert.

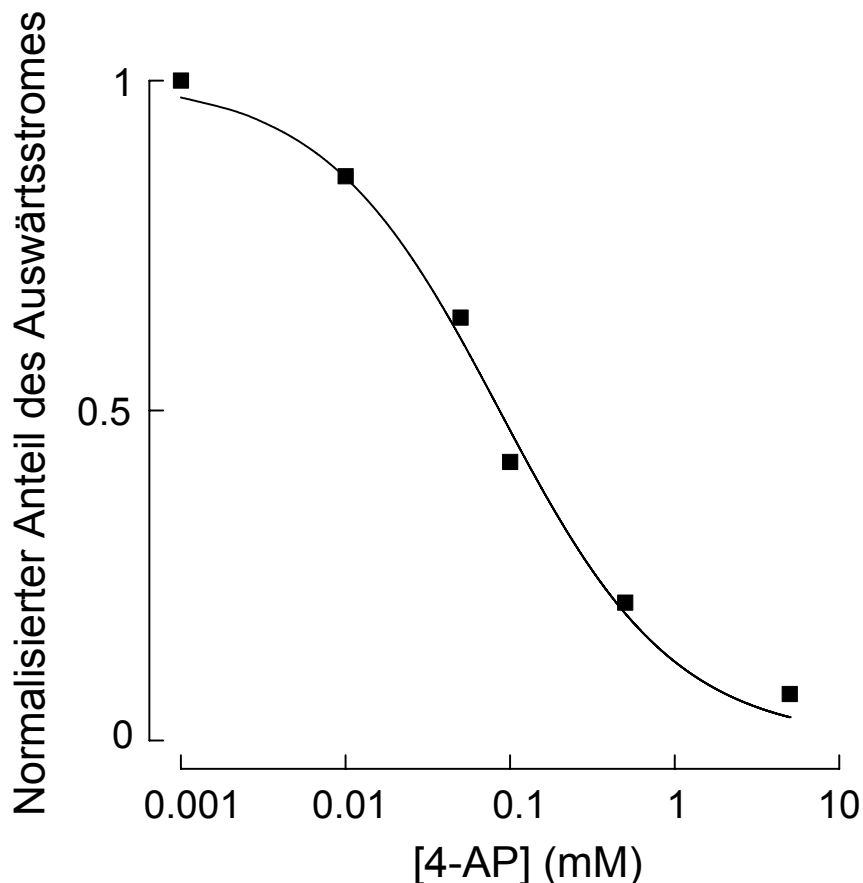


Abbildung 26. Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4-Aminopyridin auf den Auswärtsstrom der untersuchten Perizyten. Die Daten zeigen Mittelwerte des Auswärtsstromes bei einem Potential von 0 mV. Die Mittelwerte wurden bei 0,001, 0,01, 0,1 mM 4-AP aus 5 Zellen bestimmt; bei 0,05, 0,5 und 5 mM 4-AP wurden sie aus 7 Zellen ermittelt. Die Daten werden mit der Hill-Gleichung analysiert: $1=1/1+([4-AP]/K_d)^n$, wobei K_d die Dissoziationskonstante und n der Hill-Koeffizient ist.

Die Darstellung zeigt eine asymptotische Annäherung der beiden Endbereiche bei minimalen und maximalen 4-Aminopyridinkonzentrationen. Die Hill-Annäherung gibt dabei die Steilheit in dieser halblogarithmischen Darstellung an.

Der Wert für die Dissoziationskonstante betrug $K_D = 0,09$ mM und für den Hill-Koeffizienten $n = 0,81$. Bei einer Konzentration von 0,09 mM extrazellulärem 4-Aminopyridin ist also eine halbmaximale Inhibierung der Auswärtsströme zu erwarten.

4 Diskussion

Wir untersuchten die wesentlichen Membranströme an einzelnen, kultivierten koronaren Perizyten, die aus dem Rinderherzen isoliert wurden. Dabei zeigte sich ein einwärts gerichteter Strom bei hyperpolarisierten Potentialen, der bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zunahm. Gleichzeitig war eine Verschiebung des Stroms zu mehr depolarisierten Potentialen zu beobachten. Durch geringe extrazelluläre Konzentrationen von Bariumchlorid konnte der Einwärtsstrom fast vollständig und reversibel inhibiert werden. Die Analyse dieses Stromes zeigte eine steile Gleichrichtercharakteristik. Des Weiteren fand sich ein großer Auswärtsstrom, der bei depolarisierten Potentialen aktiviert wurde. Hierbei war eine steile, sigmoide Abhängigkeit der Aktivierung vom Membranpotential zu beobachten und im weiteren zeitlichen Verlauf unterlag der Auswärtsstrom einer langsamen, inkompletten Inaktivierung. Bei der Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration war eine Umkehr des Stromes nahe des Kaliumgleichgewichtspotentials festzustellen. Der Auswärtsstrom zeigte sich reversibel inhibierbar durch geringe extrazelluläre Konzentrationen von TEA und unvollständig reversibel hemmbar durch niedrige Konzentrationen von 4-AP.

4.1 Limitationen

Die Isolierung und Kultivierung in Petrischalen hat es ermöglicht, an einzelnen koronaren Perizyten elektrophysiologische Messungen durchzuführen. Durch diese Behandlung ist jedoch eine Veränderung der Perizyteneigenschaften möglich.

Zum einen kann sich die Expression von Ionen-Kanälen unter kultivierten Bedingungen ändern. So ist beispielsweise von Endothelzellen bekannt, dass sie sich in Kultur substantiell verändern können, abhängig vom Nährmedium und anderen Faktoren [30]. Von Beckerath et al. fanden in frisch gewonnenen, einzelnen Endothelzellen des Meerschweinchenherzens niedrigere Einwärtsströme durch den Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanal (K_{IR} -Kanal) als

zuvor an kultivierten Endothelzellen beobachtet werden konnten. Daher wurde vermutet, dass in nativen Endothelzellen eine geringere Anzahl relevanter Kaliumkanäle vorliegt [78].

Zum anderen verwendeten wir für unsere Messungen Perizyten in Reinkultur. In vivo stehen jedoch Perizyten mit Endothelzellen in engem Kontakt. Kultiviert man beide Zellarten nebeneinander in Kokultur, so wird ein verstärktes Wachstum von Perizyten auf Kosten der Endothelzellen durch die Freisetzung endothelialer Wachstumsfaktoren beobachtet [32]. Durch den Verlust von Endothelzellkontakten in einer Reinkultur kann eine Veränderung der Perizyten nicht ganz ausgeschlossen werden.

Schließlich wurden die Messungen an einzeln liegenden Perizyten vorgenommen. Die Isolierung war notwendig, da an Zellverbänden keine Voltage Clamp Experimente durchgeführt werden können. Bei länger andauernder Kultivierung der koronaren Perizyten begannen diese in den Petrischalen zu wachsen und lange Fortsätze auszubilden, mit denen sie andere Perizyten kontaktierten. Diese lichtmikroskopischen Beobachtungen wurden durch die Messung auffälliger großer und nicht kompensierbarer Ströme an zusammenhängenden Perizyten gestützt. Es ist davon auszugehen, dass auch in vivo Perizyten interzelluläre Kontakte ausbilden. Die beobachtete elektrische Kopplung zwischen den zusammenhängenden koronaren Perizyten legt die Vermutung der Ausbildung von Gap Junctions nahe, wie sie auch von zerebralen Perizyten bekannt sind [21].

4.2 Passive elektrische Eigenschaften der Perizyten

Die irregulär begrenzte, flache Form der kultivierten, koronaren Perizyten erklärt gut die beobachteten relativ großen Membrankapazitäten. Wir haben weiterhin die Membranpotentiale bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM bestimmt. Im Vergleich zu anderen Autoren [5,25,80] sind die von uns beobachteten Membranpotentiale größer (Tabelle 2).

Autor	Spezies	Herkunft der Perizyten	Spannung (mv)	Anzahl der Experimente
Helbig et al. [25]	Rind	Retina	$31,2 \pm 6,7$	203
Berweck et al. [5]	Mensch	Retina	$29,0 \pm 4,6$	17
Wagner et al. [80]	Ratte	Retina	$37,6 \pm 1,0$	106
Eigene Messungen [79]	Rind	Herz	$46,5 \pm 8,6$	78

Tabelle 2. Ruhepotentiale von Perizyten verschiedener Herkunft.

Bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 60 mM war eine Verringerung des Membranpotentials zu beobachten. Dies ist auf eine Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit und Verschiebung des Kaliumgleichgewichts zurückzuführen.

Als die zwei dominanten Ströme in koronaren Perizyten beobachteten wir bei hyperpolarisierten Potentialen einen einwärtsgerichteten Strom und bei depolarisierten Potentialen einen großen auswärtsgerichteten Strom.

4.3 Der Einwärtsstrom

Die gemessenen koronaren Perizyten zeigten eine Zunahme des Einwärtsstroms bei hyperpolarisierten Potentialen. Durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration fand sich zum einen eine Vergrößerung des Stromes, zum anderen die Verschiebung des Stromes mit dem Kaliumgleichgewichtspotential E_K zu mehr depolarisierten Potentialen. Die Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung mittels der Boltzmannfunktion ergab eine relativ große Steilheit (Slope Factor $k = 6,8 \pm 1,6$ mV), entsprechend einer deutlichen Zunahme der Leitfähigkeit in einem relativ kleinem Spannungsbereich.

Der Einwärtsstrom weist typische Eigenschaften eines Stromes durch Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle (K_{IR} -Kanäle) auf. Eine besondere Eigenschaft der K_{IR} -Kanäle ist ihre Empfindlichkeit gegenüber mikromolaren Konzentrationen

extrazellulärer Bariumionen. Potential- und zeitabhängig kommt es zu einem kompletten Block der K_{IR} -Kanäle. In Endothelzellen war für eine halbmaximale Inhibierung des K_{IR} -Stroms eine Bariumkonzentration von 1 μM bei -70 mV erforderlich [78]. Quayle et al. fanden für den K_{IR} -Strom von glatten Gefäßmuskelzellen eine Konzentration von 2 μM bei -60 mV für die halbmaximale Inhibierung [63]. Die koronaren Perizyten zeigten unter 50 μM extrazellulärer Bariumkonzentration eine komplette Inhibierung der Einwärtsströme.

In einigen Zellen konnte kein Einwärtsstrom aufgezeichnet werden. Insgesamt zeigte sich eine große Variabilität des Einwärtsstromes im Vergleich zum Auswärtsstrom. Dies könnte Ausdruck der unterschiedlichen Lokalisation der Perizyten in der koronaren Mikrozirkulation sein. An koronaren glatten Gefäßmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass Zellen größerer Gefäße im Vergleich zu den Zellisolaten kleinerer und weiter distal gelegener Gefäße einen geringeren K_{IR} -Strom aufweisen. Es ist als wahrscheinlich anzunehmen, dass die kleineren Gefäße mehr K_{IR} -Kanäle exprimieren [6,62]. Trotzdem kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die von uns untersuchten Zellen ohne K_{IR} -Strom noch Kaliumkanäle enthielten, die z.B. durch Dephosphorylierung inaktiviert wurden [59] und deswegen keinen Strom leiteten.

Die Gleichrichtung geklonter K_{IR} -Kanäle (IRK1, HRK1 und BIR 10) konnte auf eine Blockade des Auswärtsstroms bei depolarisierten Potentialen durch intrazelluläre Polyamine wie Spermin und Spermidin zurückgeführt werden. In Abwesenheit solcher intrazellulärer Polyamine konnten auch Mg^{2+} -Ionen für eine milde Einwärtsgleichrichtung verantwortlich gemacht werden [16,17,44]. Die Kaliumleitfähigkeit, vermittelt durch K_{IR} -Kanäle, trägt zum Ruhepotential vieler Zellen bei, wie z.B. in Herzmuskelzellen [34], koronaren glatten Gefäßmuskelzellen [6,62] und koronaren Endothelzellen [78]. Auch in koronaren Perizyten ist von einer entscheidenden Bedeutung der K_{IR} -Kanäle bei der Stabilisierung des Ruhepotentials nahe E_K auszugehen.

Die Eigenschaften des K_{IR} -Stroms koronarer Perizyten entsprechen weitgehend den Eigenschaften von Strömen durch geklonte K_{IR} -Kanäle der K_{IR} 2 Subfamilie.

Im Myokard des Meerschweinchens konnten aus dieser Subfamilie K_{IR} 2.1 bis K_{IR} 2.4 nachgewiesen werden, wobei K_{IR} 2.4 nur in Zellen neuroektodermalen Ursprungs vorkam [42]. Der Typ K_{IR} 2.1 wird weiterhin in glatten arteriellen Gefäßmuskeln der Ratte vermutet, weshalb auch eine Existenz in koronaren Gefäßmuskelzellen nahe liegt. Typischerweise zeigt dieser Kanal eine Verschiebung mit E_K , eine geringe Einzelkanal-Leitfähigkeit, eine spannungsabhängige Inhibierung durch mikromolare Bariumkonzentrationen mit Dissoziationskonstanten $<50 \mu\text{M}$ und eine minimale Inaktivierung bei Hyperpolarisation [6,18]. Daher könnte der geklonte K_{IR} 2.1 Kanal dem an den koronaren Perizyten beobachteten K_{IR} -Kanal entsprechen.

4.4 Der Auswärtsstrom

Der Auswärtsstrom konnte unabhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration bei den selben depolarisierten Potentialen aktiviert werden. Weiterhin zeigte der Auswärtsstrom bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen eine Stromumkehr etwa in Nähe des jeweiligen Kaliumgleichgewichtspotentials. Dies weist auf einen Kalium-Auswärtsstrom durch spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V -Kanäle) hin. Eine nähere Untersuchung zeigte einen verzögerten Beginn des Auswärtsstromes mit einer sigmoiden Aktivierungscharakteristik bei verschiedenen depolarisierten Spannungssprüngen. Die weitere Analyse ergab eine halbmaximale Aktivierung bei Potentialen bei etwa -40 mV . Die dazugehörige Boltzmannfunktion zeigte einen Slope Factor von $k = 4,6 \text{ mV}$. Im Vergleich mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen in glattmuskulären arteriellen Muskelzellen ist die Spannung der halbmaximalen Aktivierung ziemlich negativ (-25 mV bis -45 mV) und der gefundene Slope Factor steil (5 mV bis 11 mV) [56,65]. Die Experimente wurden jedoch bei Raumtemperatur (ca. 21°C) durchgeführt, wodurch die Werte verändert erscheinen können. So wird eine Temperaturabhängigkeit (5°C bis 42°C) verschiedener Eigenschaften von spannungsabhängigen Kaliumkanälen beschrieben, welche besonders bei humanen T-Lymphozyten vorkommen [61,77]. In Anlehnung daran kann in den Perizyten die steady-state-Aktivierung

des Auswärtsstromes steiler und die halbmaximale Spannung negativer als bei physiologischen Temperaturen erscheinen.

Bei lang andauernden Depolarisierungen >10 s war weiterhin eine langsame, monoexponentielle und inkomplette Inaktivierung mit einer Zeitkonstanten von etwa 13 s zu messen. Diese Eigenschaften entsprechen denen von spannungsabhängigen, verzögert gleichrichtenden Kaliumkanälen [56,65]. Die langsame Inaktivierung der K_V -Kanäle ist ebenfalls als temperaturabhängig bekannt und kann von Hunderten ms bei Körpertemperatur bis zu mehreren s bei Raumtemperatur variieren, entsprechend einer Verkürzung der Zeitkonstante bei Erhöhung der Temperatur [65]. Die Inaktivierung des Auswärtsstromes der koronaren Perizyten war bei weitem nicht komplett. Insbesondere bei physiologischen Membranpotentialen konnte kaum eine Inaktivierung beobachtet werden, so dass nach kurzer Beobachtungsdauer ein steady-state-Strom gemessen wurde. Entgegen dieser an koronaren Perizyten gemessenen Inaktivierung des Auswärtsstroms von weniger als 50%, wird die Inaktivierung der meisten anderen beschriebenen spannungsabhängigen Kaliumkanäle mit mehr als 50% angegeben [7,56].

Eine weitere wichtige Eigenschaft spannungsabhängiger Kaliumkanäle ist ihre Inhibierbarkeit durch verschiedene Kanalblocker. TEA ist eine nicht membrangängige Substanz, die extrazellulär in empfindlicher Dosis einige spannungsaktivierbare Kaliumkanäle zu inhibieren vermag. Besonders die Subgruppe nicht-inaktivierender spannungsaktivierter Kaliumkanäle weist eine hohe Sensitivität gegenüber einem Block mit TEA auf. Die untersuchten koronaren Perizyten zeigten bereits unter extrazellulären Konzentrationen von 5 mM TEA eine komplette Inhibierung ihres Auswärtsstromes. Ein weiterer spezifischer Inhibitor spannungsabhängiger Kaliumkanäle ist 4-AP, welches die Zellmembran durchtritt und deshalb von außen und innen effektiv werden kann. Verschiedene Subtypen spannungsaktivierbarer Kaliumkanäle zeigen unterschiedliche Empfindlichkeiten auf 4-AP [56,65]. Bei den untersuchten koronaren Perizyten wurde eine hohe Empfindlichkeit gegenüber der Inhibierung mit einer Dissoziationskonstanten $K_D = 0,1$ mM gefunden.

Vergleicht man die gemessenen mit den bekannten und beschriebenen Kaliumkanälen fallen Ähnlichkeiten des beobachteten Kaliumkanals der koronaren Perizyten mit den spannungsabhängigen Kaliumkanälen in frisch isolierten kapillären Endothelzellen von Meerschweinchenherzen auf [13]. Im Vergleich mit geklonten Kaliumkanälen konnten nur teilweise Ähnlichkeiten gefunden werden. So zeigt der geklonte Kaliumkanal K_V 2.1 ebenfalls eine schnelle Aktivierung und eine langsame Inaktivierung. Dieser Kaliumkanal ist jedoch bei verschiedenen Spezies teils nicht auf 4-AP sensitiv, so dass hier eine Zuordnung trotzdem schwierig erscheint. Weitere Ähnlichkeiten zu bekannten und beschriebenen Kaliumkanälen bestehen zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen vom Shaker-Typ. Mittels geklonter Subtypen war es möglich, die charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften im Detail zu untersuchen. Die Kanäle setzen sich aus vier alpha-Untereinheiten mit je sechs hydrophoben transmembranösen Domänen und dem ionenspezifischen Kanal, sowie einer oder mehrerer, die Kanalfunktion modulierender, beta-Einheiten zusammen. Durch die Anwesenheit der beta-3-Untereinheit wird die Aktivierungsspannung des Kaliumkanals Typ K_V 1.5 auf -24 mV gesenkt. Der spannungsabhängige Kaliumkanal K_V 1.5 wurde zudem im ventrikulären Myokard als „fast delayed rectifier K^+ channel“ mit einer langsamen inkompletten Inaktivierung nachgewiesen, wie sie auch bei unseren Messungen zu beobachten war. Die Inhibierung dieses Kanaltyps erforderte allerdings höhere Konzentrationen von TEA [12,48,73]. Für diesen Kanaltyp wurde eine empfindliche Inhibierung durch 4-AP mit einer halbmaximalen Konzentration $IC_{50} = 0,2$ mM angegeben, die in der Größenordnung unserer Beobachtungen an den koronaren Perizyten ($K_D = 0,09$ mM) liegt [60]. Der Vergleich von nativen mit geklonten Kanälen ist hier aber schwierig, da akzessorische beta-Einheiten und die Bildung von heterogenen Oligomeren die Kinetik der Kanäle verändern können. So lässt sich keiner dieser geklonten Kanäle exakt dem an den koronaren Perizyten beschriebenen spannungsabhängigen Kaliumkanal und seiner Inhibierung zuordnen.

In Zellen, die Aktionspotentiale bilden, spielen die spannungsabhängigen Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei der Repolarisation. Für viele Zellen, unter anderen auch glatte Muskelzellen, konnte gezeigt werden, dass diese

Auswärtsströme wesentlich das Membranpotential beeinflussen können, insbesondere dann, wenn ihre Aktivierungsschwelle an die normalen Membranpotentiale heranreicht. Durch die Eigenschaft der K_V -Kanäle bei depolarisierten Membranpotentialen aktiviert zu werden, regulieren bzw. dämpfen sie die Antwort der Zelle auf depolarisierte Stimuli. In glatten Gefäßmuskelzellen führen solche Depolarisationen durch den zunehmenden Ca^{2+} -Influx zur Kontraktion und dadurch zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes [11,57,77]. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle glatter Gefäßmuskelzellen zeigen eine Reduktion und Inhibierung ihres Stromes durch Angiotensin II über die Proteinkinase C oder durch intrazelluläres Kalzium [7,22]. Dagegen verstärkte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP den Strom durch K_V -Kanäle [1]. Es ist anzunehmen, dass dadurch der Gefäßwiderstand beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang wurde weiterhin eine Inaktivierung des spannungsabhängigen Kaliumstroms unter Hypoxie-Bedingungen gefunden [8]. Wir vermuten, dass auch die von uns beobachteten spannungsabhängigen Kaliumkanäle der koronaren Perizyten dem Einfluss von vasoaktiven Substanzen unterliegen. Dabei limitieren sie nicht nur wesentlich durch ihre negative Aktivierungsschwelle Depolarisationen, sondern haben auch eine grundlegende Bedeutung für das Membranpotential.

Viele Zellfunktionen der Perizyten werden bekanntermaßen durch freies, intrazelluläres Kalzium reguliert, wie z.B. die Synthese vasoaktiver Substanzen oder die Proliferation. Aufgrund der Ähnlichkeiten von Perizyten mit glattmuskulären Zellen, könnte weiterhin spekuliert werden, dass Ca^{2+} durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle in den Intrazellulärraum gelangt. Dann würden die spannungsabhängigen Kaliumkanäle auch den Ca^{2+} -Influx beeinflussen. Unsere Messungen konzentrierten sich aber methodisch nicht auf die Untersuchung von Kalziumströmen. Weiterhin konnte unter dem Block der spannungsabhängigen Kaliumkanäle in variabler Form bei starker Depolarisation noch ein Rest-Auswärtsstrom beobachtet werden, der sich nicht nur als inkompletter Block, sondern auch durch die Existenz weiterer, wenn auch geringerer Auswärtsströme deuten lässt.

4.5 Ionenströme von Perizyten aus anderen Organen

Perizyten kommen in Blutgefäßen verschiedenster Gewebe vor. Die Ionenströme in Mesangium-Zellen und retinalen Perizyten wurden bereits näher untersucht:

Mesangiale Perizyten

Der mesangiale Tonus wird durch vasoaktive Hormone wie Angiotensin II beeinflusst, das in seiner Signalkaskade nichtselektive Chloridkanäle aktiviert, die zur Depolarisation führen. Dadurch kommt es zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium mit Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Als limitierender Faktor dieser Depolarisation wurden kalziumabhängige Kaliumkanäle BK_{Ca} nachgewiesen, die auch in glatten Gefäßmuskelzellen vorkommen [74]. Weiterhin wurden Hinweise für das Vorhandensein von ATP-sensitiven Kaliumkanälen gefunden [3].

Retinale Perizyten

In der Retina bilden Perizyten eine zum Teil dichte Bedeckung der kapillären Endothelröhre. Es wird vermutet, dass diese Perizyten eine wichtige Funktion in der Regulation der retinalen Mikrozirkulation besitzen [20,70]. Die retinalen Perizyten wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen in Hinblick auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften und den Effekt vasoaktiver Substanzen untersucht [83]. Unter der Applikation vasoaktiver Agonisten wie Norepinephrin und Histamin konnten leichte Depolarisationen um einige Millivolt gefunden werden. Die Effekte waren durch den α_1 -Blocker Prazosin, bzw. den H_1 -Blocker Diphenhydramin inhibierbar. Des Weiteren konnte eine Kontraktion kultivierter retinaler Perizyten unter Histamin beobachtet werden [35,53]. Neben diesen Beobachtungen wurden auch Hyperpolarisationen durch Histamin gefunden. Dies wurde als Hinweis für eine Expression des Histamin H_2 -Rezeptors gewertet, welcher häufig muskelrelaxierend wirkt. Der Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitor Quabain führte an retinalen Perizyten nur zu einer geringen Depolarisation, so dass diese elektrogene Pumpe offensichtlich nur wenig zum Ruhepotential beiträgt [25].

An einigen retinalen Perizyten wurden spike-artige Oszillationen beobachtet, die wenige Minuten andauerten und durch extrazelluläre Kalziumdefizienz oder

durch den Ca^{2+} -Blocker Nifedipin inhibiert werden konnten. Weiterhin waren sie durch Norepinephrin und durch Inhibierung des Einwärtsstromes mit Bariumchlorid induzierbar [83]. Solche spike-artigen Depolarisationen wurden auch in Mesangiumzellen und hepatischen Sternzellen beobachtet [28,58]. Dies weist auf eine Beteiligung spannungsabhängiger Kalziumströme hin.

Weder spontane Depolarisationen noch transiente Einwärtsströme konnten in den kultivierten koronaren Perizyten nachgewiesen werden. Das schließt aber die Existenz spannungsabhängiger Kalziumströme nicht aus, sondern die experimentellen Bedingungen waren nicht darauf ausgerichtet, solche Ströme aufzunehmen.

4.6 Möglicher Einfluss der gemessenen Ionenströme auf die Regulation des koronaren Blutflusses

Zwischen koronaren Endothelzellen und Perizyten wird ein elektrisch dichter Kontakt angenommen. Die spannungsabhängigen Kaliumströme der Perizyten könnten damit einen grundlegenden Einfluss auf das Membranpotential der benachbarten Endothelzellen haben. In ähnlicher Weise dürften benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen durch die Perizyten beeinflusst werden. Daher könnte die Hyperpolarisation der koronaren Perizyten das Membranpotential der anliegenden Zellen verstärken und so eine Vasodilatation der nahe anliegenden arteriolen glatten Gefäßmuskelzellen hervorrufen.

Die spannungsabhängigen Auswärtsströme der untersuchten Perizyten limitieren die Membrandepolarisation bereits bei ziemlich negativen Potentialen. Eine Änderung dieser Ströme hat wahrscheinlich einen grundlegenden Einfluss auf das Membranpotential. Es ist anzunehmen, dass die koronaren Perizyten auf verschiedene vasoaktive Agonisten reagieren und dadurch den Gefäßwiderstand regulieren können. Es ist weiterhin denkbar, dass Perizyten auch durch eine direkte Kontraktion Einfluss auf den Gefäßwiderstand nehmen können.

Bei der Messung des Membranpotentials an den koronaren Perizyten konnten manchmal Fluktuationen des Potentials im Bereich von -55 mV bis -85 mV beobachtet werden. Diese Hyperpolarisationen nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential E_K reflektieren höchstwahrscheinlich den Einfluss der Auswärtsströme durch K_{IR} -Kanäle auf das Membranpotential. Die Kaliumleitfähigkeit steigt mit der Zunahme dieser Ströme durch höhere extrazelluläre Kaliumkonzentrationen. Deswegen könnte eine Stabilisierung des Ruhepotentials der koronaren Perizyten durch K_{IR} -Ströme bei der myokardialen Ischämie an Bedeutung gewinnen, da hier extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von 10 mM erreicht werden können [36].

5 Zusammenfassung

Der koronare Blutfluss wird durch den mikrovaskulären Gefäßwiderstand besonders im Bereich des Übergangs von den Arteriolen zu den Kapillaren lokal reguliert. Perizyten, die in diesem Bereich besonders zahlreich vorkommen und zirkuläre Fortsätze bilden, sind in die Basalmembran eingebettet. Sie bilden mit den angrenzenden Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen funktionelle Einheiten, die elektrisch miteinander gekoppelt sind. Weiterhin wurden in Perizyten kontraktile Elemente nachgewiesen und deren Kontraktion in Zellkulturen gezeigt. Es wird angenommen, dass koronare Perizyten wesentlich in die Regulation des koronaren Blutflusses und damit in die Oxygenierung und Energieversorgung des Myokards involviert sind. Deswegen ist es erforderlich die Perizyten dieses Gewebes zu untersuchen. Das Ziel dieser Arbeit war, als ersten Zugang zur Elektrophysiologie der koronaren Perizyten, deren passive elektrische Eigenschaften und hauptsächliche Membranströme zu untersuchen.

Perizyten wurden dazu aus der Apexregion von Rinderherzen mittels eines Verdauungsgelöst und durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Wir kultivierten die gewonnenen Perizyten und untersuchten sie mit der Patch Clamp Technik. Die Messungen erfolgten bei unterschiedlichen extrazellulären Kaliumkonzentrationen und zum Teil unter Zugabe von Kaliumkanalblockern.

Insgesamt wurden 78 einzelne, kultivierte koronare Perizyten untersucht. Die Membrankapazität der Perizyten betrug 150 ± 123 pF ($n = 72$). Das Membranpotential betrug $-46,5 \pm 8,6$ mV ($n = 78$) bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM und $-23,2 \pm 2,2$ mV ($n = 40$) bei 60 mM Kalium in der extrazellulären Lösung. Unter der Applikation langsamer depolarisierender Spannungsrampen zeigten sich als dominante Ströme ein charakteristischer großer Auswärtsstrom, der bei depolarisierten Potentialen aktiviert wurde und ein Einwärtsstrom bei hyperpolarisierten Potentialen. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM auf 60 mM führte zu einer Zunahme des Einwärtsstromes und gleichzeitiger Verschiebung der Stromantwort zu mehr depolarisierten Potentialen mit dem Kaliumgleichgewichtspotential. Außerdem war der Einwärtsstrom sehr sensitiv

gegenüber einer Blockade mit extrazellulären Bariumionen. Somit hatte der Einwärtsstrom Eigenschaften eines Stroms durch Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle (K_{IR} -Kanäle). Die Einwärtsgleichrichtung der Whole Cell Ströme wurde durch eine Boltzmannfunktion beschrieben und zeigte eine steile Steigung (Slope Factor = 6,8 mV). Die maximale Leitfähigkeit des Einwärtsstromes bei hyperpolarisierten Potentialen betrug $2,9 \pm 2,8$ nS und zeigte eine große Variabilität im Vergleich zum Auswärtsstrom. Als Auswärtsstrom fanden wir einen Kaliumstrom, der sich bei Potentialen positiver als -55 mV aktivieren ließ. Diese spannungsabhängige Aktivierung des Auswärtsstromes war mit einem Slope Factor = 4,6 mV ebenfalls relativ steil. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung betrug $-40,9$ mV. Bei andauernder Depolarisation war eine langsame und inkomplette Inaktivierung zu beobachten. Sie ließ sich durch eine monoexponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante von 12,8 s beschreiben. Neben einem kompletten und reversiblen Block des Auswärtsstromes durch 5 mM extrazelluläres Tetraethylammonium konnten wir eine sehr hohe Sensitivität gegenüber einem Block mit 4-Aminopyridin feststellen. Die Analyse ergab eine Dissoziationskonstante $K_D = 0,09$ mM. Die maximale Leitfähigkeit bei depolarisierten Potentialen betrug $16,6 \pm 15,6$ nS.

Wir berichten erstmalig über elektrophysiologische Messungen an koronaren Perizyten. Als dominante Ströme zeigten wir einen Einwärtsstrom durch Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle und einen charakteristischen, großen Auswärtsstrom durch spannungsabhängige Kaliumkanäle. Erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen, wie sie etwa bei der kardialen Ischämie entstehen könnten, verstärken den Strom durch Einwärts-Gleichrichter-Kaliumkanäle nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential und tragen wahrscheinlich deshalb zu einer Stabilisierung des Ruhepotentials bei. Der Auswärtsstrom wirkt ebenfalls Depolarisationen entgegen. Die Ströme der koronaren Perizyten könnten aufgrund der elektrischen Kopplung das Potential der benachbarten Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen beeinflussen. Eine Hyperpolarisation der Perizyten würde so über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus den Endothelzellen zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen und damit zu einer lokalen Vasodilatation führen. Möglicherweise reagieren die koronaren Perizyten selbst auf vasoaktive

Agonisten oder werden durch die angrenzenden Endothelzellen beeinflusst und üben durch eigene Kontraktion Einfluss auf die lokale Durchblutung aus. Perizyten kommen vermehrt an den für den koronaren Strömungswiderstand relevanten Gefäßabschnitten vor und daher ist anzunehmen, dass die koronaren Perizyten an der Regulation des koronaren Blutflusses beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Aiello, E.A., M.P. Walsh, and W.C. Cole, *Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1995. **268**(2 Pt 2): p. H926-34.
2. Ansari, N.H., W. Zhang, E. Fulep, and A. Mansour, *Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina*. J Toxicol Environ Health A, 1998. **54**(6): p. 467-75.
3. Barber, R.D., A.S. Woolf, and R.M. Henderson, *Potassium conductances and proliferation in conditionally immortalized renal glomerular mesangial cells from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1355**(2): p. 191-203.
4. Berne, R.R., *Handbook of Physiology*. Coronary Circulation. 1979.
5. Berweck, S., H. Thieme, A. Lepple-Wienhues, H. Helbig, and M. Wiederholt, *Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993. **34**(12): p. 3402-7.
6. Bradley, K.K., J.H. Jaggar, A.D. Bonev, T.J. Heppner, E.R. Flynn, M.T. Nelson, and B. Horowitz, *Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells*. J Physiol, 1999. **515**(Pt 3): p. 639-51.
7. Clement-Chomienne, O., M.P. Walsh, and W.C. Cole, *Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular myocytes*. J Physiol, 1996. **495**(Pt 3): p. 689-700.
8. Conforti, L. and D.E. Millhorn, *Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia*. J Physiol, 1997. **502**(Pt 2): p. 293-305.
9. Cuevas, P., J.A. Gutierrez-Diaz, D. Reimers, M. Dujovny, F.G. Diaz, and J.I. Ausman, *Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries*. Anat Embryol, 1984. **170**(2): p. 155-9.
10. *Daten des Gesundheitswesens*. Vol. Band 122. 1999: Bundesministerium für Gesundheit.

11. Daut, J., N.B. Standen, and M.T. Nelson, *The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1994. **5**(2): p. 154-81.
12. Deal, K.K., S.K. England, and M.M. Tamkun, *Molecular physiology of cardiac potassium channels*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 49-67.
13. Dittrich, M. and J. Daut, *Voltage-dependent K(+) current in capillary endothelial cells isolated from guinea pig heart*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 2): p. H119-27.
14. Eberth, C.J., *Handbuch der Lehre von Geweben des Menschen und der Thiere*. 1871, Leipzig.
15. Egginton, S., O. Hudlicka, M.D. Brown, L. Graciotti, and A.L. Granata, *In vivo pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle*. Microvasc Res, 1996. **51**(2): p. 213-28.
16. Fakler, B., U. Brandle, E. Glowatzki, S. Weidemann, H.P. Zenner, and J.P. Ruppersberg, *Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine*. Cell, 1995. **80**(1): p. 149-54.
17. Ficker, E., M. Taglialatela, B.A. Wible, C.M. Henley, and A.M. Brown, *Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels*. Science, 1994. **266**(5187): p. 1068-72.
18. Flynn, E.R., C.A. McManus, K.K. Bradley, S.D. Koh, T.M. Hegarty, B. Horowitz, and K.M. Sanders, *Inward rectifier potassium conductance regulates membrane potential of canine colonic smooth muscle*. J Physiol, 1999. **518**(Pt 1): p. 247-56.
19. Forbes, M.S., M.L. Rennels, and E. Nelson, *Ultrastructure of pericytes in mouse heart*. Am J Anat, 1977. **149**(1): p. 47-70.
20. Frank, R.N., T.J. Turczyn, and A. Das, *Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(6): p. 999-1007.
21. Fujimoto, K., *Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries: a fine structural study*. Anat Rec, 1995. **242**(4): p. 562-5.
22. Gelband, C.H. and J.R. Hume, *[Ca²⁺]_i inhibition of K⁺ channels in canine renal artery. Novel mechanism for agonist-induced membrane depolarization*. Circ Res, 1995. **77**(1): p. 121-30.

23. Gitlin, J.D. and P.A. D'Amore, *Culture of retinal capillary cells using selective growth media*. *Microvasc Res*, 1983. **26**(1): p. 74-80.
24. Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth, *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. *Pflugers Arch*, 1981. **391**(2): p. 85-100.
25. Helbig, H., S. Kornacker, S. Berweck, F. Stahl, A. Lepple-Wienhues, and M. Wiederholt, *Membrane potentials in retinal capillary pericytes: excitability and effect of vasoactive substances*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. **33**(7): p. 2105-12.
26. Hellstrom, M., M. Kaln, P. Lindahl, A. Abramsson, and C. Betsholtz, *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. *Development*, 1999. **126**(14): p. 3047-55.
27. Helmbold, P., R.C. Nayak, W.C. Marsch, and I.M. Herman, *Isolation and in vitro characterization of human dermal microvascular pericytes*. *Microvasc Res*, 2001. **61**(2): p. 160-5.
28. Henderson, R.M. and R.D. Barber, *Ion channels in renal glomerular mesangial cells*. *J Membr Biol*, 1998. **163**(1): p. 1-8.
29. Herman, I.M. and S. Jacobson, *In situ analysis of microvascular pericytes in hypertensive rat brains*. *Tissue Cell*, 1988. **20**(1): p. 1-12.
30. Hewett, P.W. and J.C. Murray, *Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1993. **29A**(11): p. 823-30.
31. Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Second Printing ed. Vol. Chapter 1. 1992, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 9, 54-55.
32. Hirschi, K.K. and P.A. D'Amore, *Pericytes in the microvasculature*. *Cardiovasc Res*, 1996. **32**(4): p. 687-98.
33. Imesch, P.D., C.D. Bindley, and I.H. Wallow, *Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities*. *Retina*, 1997. **17**(4): p. 321-9.
34. Ishihara, K., T. Mitsuiye, A. Noma, and M. Takano, *The Mg²⁺ block and intrinsic gating underlying inward rectification of the K⁺ current in guinea-pig cardiac myocytes*. *J Physiol*, 1989. **419**: p. 297-320.

35. Kelley, C., P. D'Amore, H.B. Hechtman, and D. Shepro, *Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro*. *J Muscle Res Cell Motil*, 1988. **9**(2): p. 184-94.
36. Kleber, A.G., *Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts*. *Circ Res*, 1983. **52**(4): p. 442-50.
37. Larson, D.M., M.P. Carson, and C.C. Haudenschild, *Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes*. *Microvasc Res*, 1987. **34**(2): p. 184-99.
38. Li, W., X. Liu, Z. He, M. Yanoff, B. Jian, and X. Ye, *Expression of apoptosis regulatory genes by retinal pericytes after rapid glucose reduction*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998. **39**(9): p. 1535-43.
39. Li, W., X. Liu, M. Yanoff, S. Cohen, and X. Ye, *Cultured retinal capillary pericytes die by apoptosis after an abrupt fluctuation from high to low glucose levels: a comparative study with retinal capillary endothelial cells*. *Diabetologia*, 1996. **39**(5): p. 537-47.
40. Lindahl, P., B.R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz, *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. *Science*, 1997. **277**(5323): p. 242-5.
41. Little, T.L., J. Xia, and B.R. Duling, *Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall*. *Circ Res*, 1995. **76**(3): p. 498-504.
42. Liu, G.X., C. Derst, G. Schlichthorl, S. Heinen, G. Seebohm, A. Bruggemann, W. Kummer, R.W. Veh, J. Daut, and R. Preisig-Muller, *Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes*. *J Physiol*, 2001. **532**(Pt 1): p. 115-26.
43. Lojda, Z., *Studies on dipeptidyl(amino)peptidase IV (glycyl-proline naphthylamidase). II. Blood vessels*. *Histochemistry*, 1979. **59**(3): p. 153-66.
44. Lopatin, A.N., E.N. Makhina, and C.G. Nichols, *Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification*. *Nature*, 1994. **372**(6504): p. 366-9.

45. Matsugi, T., Q. Chen, and D.R. Anderson, *Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(13): p. 2695-701.
46. Matsugi, T., Q. Chen, and D.R. Anderson, *Contractile responses of cultured bovine retinal pericytes to angiotensin II*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(10): p. 1281-5.
47. Matsugi, T., Q. Chen, and D.R. Anderson, *Suppression of CO₂-induced relaxation of bovine retinal pericytes by angiotensin II*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(3): p. 652-7.
48. Mays, D.J., J.M. Foose, L.H. Philipson, and M.M. Tamkun, *Localization of the Kv1.5 K⁺ channel protein in explanted cardiac tissue*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 282-92.
49. Mazanet, R. and C. Franzini-Armstrong, *Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle*. Microvasc Res, 1982. **23**(3): p. 361-9.
50. McLennan, S.V., A.K. Death, E.J. Fisher, P.F. Williams, D.K. Yue, and J.R. Turtle, *The role of the mesangial cell and its matrix in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1999. **45**(1): p. 123-35.
51. Miller, F.N., D.E. Sims, D.A. Schuschke, and D.L. Abney, *Differentiation of light-dye effects in the microcirculation*. Microvasc Res, 1992. **44**(2): p. 166-84.
52. Muller, J.M., M.J. Davis, and W.M. Chilian, *Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 668-78.
53. Murphy, D.D. and R.C. Wagner, *Differential contractile response of cultured microvascular pericytes to vasoactive agents*. Microcirculation, 1994. **1**(2): p. 121-8.
54. Nakamura, M., H. Kitamura, S. Konishi, M. Nishimura, J. Ono, K. Ina, T. Shimada, and R. Takaki, *The endocrine pancreas of spontaneously diabetic db/db mice: microangiopathy as revealed by transmission electron microscopy*. Diabetes Res Clin Pract, 1995. **30**(2): p. 89-100.
55. Nels, D.D., *Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha actin*. J Cell Biol., 1991. **113**(1): p. 147-54.

56. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
57. Nilius, B., G. Schwarz, and G. Droogmans, *Modulation by histamine of an inwardly rectifying potassium channel in human endothelial cells*. J Physiol, 1993. **472**: p. 359-71.
58. Oide, H., M. Tateyama, X.E. Wang, M. Hirose, T. Itatsu, S. Watanabe, R. Ochi, and N. Sato, *Activated stellate (Ito) cells possess voltage-activated calcium current*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1418**(1): p. 158-64.
59. Olesen, S.P. and M. Bundgaard, *ATP-dependent closure and reactivation of inward rectifier K⁺ channels in endothelial cells*. Circ Res, 1993. **73**(3): p. 492-5.
60. Overturf, K.E., S.N. Russell, A. Carl, F. Vogalis, P.J. Hart, J.R. Hume, K.M. Sanders, and B. Horowitz, *Cloning and characterization of a Kv1.5 delayed rectifier K⁺ channel from vascular and visceral smooth muscles*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 1): p. C1231-8.
61. Pahapill, P.A. and L.C. Schlichter, *Modulation of potassium channels in human T lymphocytes: effects of temperature*. J Physiol, 1990. **422**: p. 103-26.
62. Quayle, J.M., C. Dart, and N.B. Standen, *The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle*. J Physiol, 1996. **494**(Pt 3): p. 715-26.
63. Quayle, J.M., J.G. McCarron, J.E. Brayden, and M.T. Nelson, *Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. C1363-70.
64. Rouget, C., *Memoir sur le developement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaries sanguins et lymphatiques*. Arch Physiol Norm Pathol, 1873. **5**: p. 603-663.
65. Rudy, B., *Diversity and ubiquity of K channels*. Neuroscience, 1988. **25**(3): p. 729-49.
66. Sakmann B., N., E., *Single-Channel Recording*. Second Printing ed. 1985, New York, London: Plenum Press. 12-34, 37-51, 113, Chapter 2, Chapter 3.4 Polishing, Chapter 3.5 Filling.

67. Schmidt R. F., G.T., *Physiologie des Menschen*. 24. korr. Auflage ed. 1990, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. 4-5, 491-492, 499-504.
68. Shepro, D. and N.M. Morel, *Pericyte physiology*. *Faseb J*, 1993. **7**(11): p. 1031-8.
69. Shimada, T., H. Kitamura, and M. Nakamura, *Three-dimensional architecture of pericytes with special reference to their topographical relationship to microvascular beds*. *Arch Histol Cytol*, 1992. **55**(Suppl): p. 77-85.
70. Sims, D., *Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease*. *Can J Cardiol*, 1991. **7**(10): p. 431-43.
71. Sims, D.E., *Diversity within pericytes*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000. **27**(10): p. 842-6.
72. Sims, D.E., F.N. Miller, M.M. Horne, and M.J. Edwards, *Interleukin-2 alters the positions of capillary and venule pericytes in rat cremaster muscle*. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1994. **26**(4): p. 507-13.
73. Standen, N.B. and J.M. Quayle, *K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle*. *Acta Physiol Scand*, 1998. **164**(4): p. 549-57.
74. Stockand, J.D. and S.C. Sansom, *Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(3): p. 723-44.
75. Thomas, W.E., *Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells*. *Brain Res Brain Res Rev*, 1999. **31**(1): p. 42-57.
76. Tilton, R.G., C. Kilo, and J.R. Williamson, *Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries*. *Microvasc Res*, 1979. **18**(3): p. 325-35.
77. Volk, K.A., J.J. Matsuda, and E.F. Shibata, *A voltage-dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells*. *J Physiol*, 1991. **439**: p. 751-68.
78. von Beckerath, N., M. Dittrich, H.G. Klieber, and J. Daut, *Inwardly rectifying K⁺ channels in freshly dissociated coronary endothelial cells from guinea-pig heart*. *J Physiol*, 1996. **491**(Pt 2): p. 357-65.
79. von Beckerath, N., S. Nees, F.J. Neumann, B. Krebs, G. Juchem, and A. Schomig, *An inward rectifier and a voltage-dependent K⁺ current in single,*

- cultured pericytes from bovine heart*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(3): p. 569-78.
80. Wagner, U., Keller, S. and Wiederholt, M., *Effect of vasoactive substances on retinal capillary pericytes of RCS and Wistar rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**: p. 1456.
81. Wakisaka, M., M. Yoshinari, S. Nakamura, T. Asano, K. Sonoki, A. Shi, M. Iwase, Y. Takata, and M. Fujishima, *Suppression of sodium-dependent glucose uptake by captopril improves high-glucose-induced morphological and functional changes of cultured bovine retinal pericytes*. Microvasc Res, 1999. **58**(3): p. 215-23.
82. Wallow, I.H., C.D. Bindley, D.M. Reboussin, S.J. Gange, and M.R. Fisher, *Systemic hypertension produces pericyte changes in retinal capillaries*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993. **34**(2): p. 420-30.
83. Wiederholt, M., Berweck, S., Helbig, H., *Electrophysiological Properties of Cultured Retinal Capillary Pericytes*. Progress in Retinal and Eye Research, 1995. **14**(2): p. 437-51.
84. Williamson, J.R., Tilton, R.G., Kilo, C., Yu, S., *Immunofluorescent imaging of capillaries and pericytes in human skeletal muscle and retina*. Microvasc Res, 1980. **20**(2): p. 233-41.
85. *World Health Report*. Statistical Annex ed. Vol. 2000. 2000: World Health Organization.
86. Zimmermann, K., *Der feinere Bau der Blutkapillaren*. A Anat Entwicklungsgesch, 1923(68): p. 29-109.

7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Kastrati und Prof. Dr. F. J. Neumann für die unermüdliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. N. v. Beckerath, der sowohl beim experimentellen Teil meiner Arbeit mit Ideen und Ausdauer zu jeder Zeit tatkräftig zur Seite stand, als mich auch bei der Abfassung dieser Arbeit unermüdlich unterstützt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. A. Nees und seiner Arbeitsgruppe, welche die Gewinnung der Perizyten durchgeführt haben.

Letztendlich möchte ich mich bei allen Mithelfern bedanken, insbesondere meiner Freundin Bernadette Aulinger, die mit Verständnis, Motivation und Beistand wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.