

Oliver Friedrich  
Dr.med.

## **Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp Untersuchungen an intakten und kontrahierenden Skelettmuskelzellen**

Geboren am 19.11.1969 in Mannheim  
Reifeprüfung am 25.4.1989 in Mosbach/Neckarelz  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS1991 bis SS 1997  
Physikum am 23.3.1993 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg, Heiden (Schweiz), Johannesburg (Süd-Afrika)  
Staatsexamen am 21.10.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie  
Doktorvater: Prof.Dr.rer.-nat. R.H.A. Fink

Inhalt der vorliegenden Arbeit war der Aufbau eines elektrophysiologischen Meßstandes und der Aufbau eines experimentellen Settings zur Durchführung von Voltage-Clamp Experimenten mit Hilfe der Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp Technik (2-MVC) an enzymatisch isolierten Einzelskelettmuskelfasern von Amphibien und Säugern.

Dabei wurde deutlich, daß die Methode sich nicht nur eignete, elektrophysiologische Membraneigenschaften von Muskelfasern im relaxierten Zustand der Zellen in hypertonem Milieu zu charakterisieren, sondern über die übliche Vorgehensweise (hypertones Medium) hinaus sogar an aktiv kontrahierenden Fasern unter isotonen Bedingungen Messungen durchzuführen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse halten nicht nur einem Vergleich bisheriger internationaler Standards stand, sondern ermöglichen die Beantwortung bisher ungelöster Fragen zur Elektromechanischen Kopplung (ec-coupling) von Muskelzellen in isotonem Milieu.

Nach Vergleich der Ergebnisse speziell von Natrium- und Kaliumströmen mit Literaturwerten und Diskussion bot sich hierbei weiterführend die Untersuchung der langsam aktivierenden DHP-Rezeptorkanäle und die dabei auslösbaren Ströme ( $I_{Ca}$ ) an.

Für den theoretischen Hintergrund, basierend auf der linearen Kabeltheorie, konnte ein Formalismus abgeleitet werden, mit dem die optimalen Bedingungen zur Angabe einer linearen Membranstromdichte approximiert werden konnten. Für die Güte der Spannungsklemme unter 2-MVC Technik in isotonem und hypertonem Milieu lassen sich somit Kriterien für Faserdimensionen festlegen, wobei als Ergebnis kurze Fasern mit großem Durchmesser zu bevorzugen sind.

In ihrer Aktivierungskinetik zeigten sich sowohl isotone als auch hypertone Fasern nicht wesentlich verschieden, so daß hier keine Beeinflussung der Ionenstrom-Eigenschaften von DHP-Rezeptorkanälen ersichtlich wurde.

Der für die Charakterisierung von L-type Calcium-Summenströme interessantere und wesentlich kontroverser diskutierte Rückgang der Stromamplitude unter anhaltender Depolarisation bei Voltage-Clamp Experimenten konnte deutlich in zwei Anteile aufgespalten werden: Spannungsabhängige Inaktivierung und Verarmung des TTS an Calcium-Ionen (Calcium-Depletion).

Die Existenz beider Faktoren in hypertonen Einzelfasern oder isotonen „*cut-fibres*“ wurde von verschiedenen Autoren unterschiedlich gewichtet. Die dabei auftretende Frage bzgl. der Situation in isotonem Milieu, also unter möglichst physiologischen Bedingungen, konnte hierbei nie zufriedenstellend beantwortet werden.

Mit der vorliegenden Anwendung der 2-MVC Technik lag erstmals die Möglichkeit vor, den zeitlichen Verlauf der langsamen Calcium-Ströme in isotonem Milieu bei voll erhaltener Kontraktionsfähigkeit und intaktem *ec-coupling* der Fasern unter elektrischer Stimulation aufzuzeichnen.

Als Hauptschlußfolgerung der vorliegenden Arbeit läßt sich sagen, daß beide erwähnten Mechanismen zum Verlauf des Stromes unter anhaltender Depolarisation in isotonen Säuger-Skelettmuskelzellen beitragen,  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion dabei zu einem wesentlich höheren Anteil, als bisher angenommen wurde.

Die Anwendbarkeit der vorgestellte Methode läßt sich als Ausblick auf viele weitere Fragestellungen anwenden, in denen eine intakte Elektromechanische Kopplung Voraussetzung für bestimmte Untersuchungen darstellt. So läßt sich die Methode zur Klärung spezieller pathophysiologische Aspekte des *ec-couplings* anwenden, wie z.B. Membranphysiologie von Muskeldystrophien (z.B. DUCHENNE), für welche Skelettmuskelfasern von *mdx*-Mäusen als Modell dienen können. Hypothesen zum Pathomechanismus der Erkrankung können hierbei gestützt oder erweitert werden.