

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

Öffnen von Ionenkanälen durch kapazitive Kopplung in Zellmembranen auf Siliziumchips

Maximilian Ulbrich

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

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

Öffnen von Ionenkanälen durch kapazitive Kopplung in Zellmembranen auf Siliziumchips

Maximilian Ulbrich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

Die Dissertation wurde am 10.07.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Physik am 08.10.2003 angenommen.

Zusammenfassung

Will man Netzwerke aus Nervenzellen auf einem Siliziumchip kontrollieren, muss die Auslösung von Aktionspotentialen durch Stimulation der Zellen vom Chip aus möglich sein. Das Ziel dieser Arbeit ist es, Ionenkanäle in der Membran einer Zelle auf dem Siliziumchip zu öffnen, indem durch kapazitive Kopplung eine extrazelluläre Spannung erzeugt wird.

Als Modellsystem dient eine Zelle, in welcher der rekombinante K^+ -Ionenkanal Kv1.3 exprimiert wird. Die Zelle wächst auf einem Siliziumchip, dessen Stimulationsspot mit einem Dielektrikum mit hoher Dielektrizitätskonstante beschichtet ist. Die elektrische Kopplung lässt sich durch Verwendung eines Bad-elektrolyten niedriger Leitfähigkeit verstärken.

Bei der elektrischen Stimulation entsteht durch Anlegen einer veränderlichen Spannung an den Siliziumchip eine Spannung über die untere Zellmembran. Die Ströme durch die Membran werden mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode gemessen, bei der die Zelle durch eine Mikropipette kontaktiert wird.

Durch eine optische und elektrische Charakterisierung des Chip-Zell-Interfaces werden die Zell- und Kopplungsparameter bestimmt. Die Zeitkonstante im Spalt bestimmt die Stärke der Kopplung und wird durch die gewählten Bedingungen so groß, dass sich durch Anlegen einer Spannungsrampe am Chip die Ionenkanäle öffnen. Dass die gemessenen Ströme tatsächlich auf das Öffnen der K^+ -Kanäle durch die extrazelluläre Spannung zurückzuführen sind, wird durch eine Reihe unterschiedlicher Experimente bestätigt.

Um auch bei der Verwendung eines Badelektrolyten normaler Leitfähigkeit oder Dielektrika geringer Kapazität die Ionenkanäle zu öffnen, wird die Wirkung einer periodischen Stimulationsspannung hoher Frequenz auf die Ionenkanäle berechnet. Die numerische Simulation ergibt, dass sich durch abwechselnde Hyper- und Depolarisation der Membran die Kanäle schrittweise öffnen lassen, obwohl das mittlere Membranpotential auf seinem ursprünglichen Wert verbleibt.

Abstract

In order to control networks of nerve cells growing on silicon chips, it is necessary to elicit action potentials by electrical stimulation of the cells from the chip. It is the aim of this work to open the ion channels in the cell membrane by capacitive coupling from the chip to the cell and hereby generating an extracellular voltage.

The model system is a cell which expresses the recombinant K^+ channel Kv1.3. The cell is growing on a silicon chip which has a stimulation spot coated with a dielectric with a high capacitance. The electrical coupling is enhanced by a bath electrolyte with low conductance.

During electrical stimulation, a voltage across the lower cell membrane emerges from the application of a changing voltage to the silicon chip. The current through the membrane is measured using the patch-clamp method that contacts the cell by a glass micropipette.

The cell and coupling parameters are determined by an optical and electrical characterization of the chip-cell interface. The time constant in the junction cleft controls the strength of the coupling. By the special choice of the conditions, it gets high enough so that the ion channels open when a voltage ramp is applied to the chip. By different experiments it is verified that the measured currents are in fact caused by the opening of the K^+ channels through the extracellular voltage.

In order to open the ion channels even when an electrolyte with physiological conductance or dielectrics with lower capacitance are used, the effect of a high frequency, periodical stimulation voltage on the ion channels is analyzed. In the calculations it can be shown that step-by-step opening of the channels is possible by alternating hyper- and depolarization of the membrane, even if the average membrane potential stays at rest.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Das Modellsystem	4
1.3	Die Spannung im Spalt öffnet die Ionenkanäle	6
2	Theoretische Beschreibung	7
2.1	Das elektrische Modell	7
2.1.1	Das Punktkontaktmodell	7
2.1.2	Voltage-Clamp	9
2.1.3	Elektrodiffusionsmodell	9
2.1.4	Umformulierung für spezifische Größen	11
2.2	Die K^+ -Kanäle in der Zellmembran	12
2.2.1	Aufbau und Funktion der <i>Shaker</i> K^+ -Kanäle	13
2.2.2	Doppelminimumpotential und Ratenkonstanten	15
2.2.3	Ratenkonstanten für reale K^+ -Kanäle	18
2.2.4	Parameterfit für den Kanal Kv1.3	19
2.2.5	Modell für den K^+ -Kanal <i>Shaker</i> 29-4	21
2.3	Eingesetzte Werte	24
3	Die Messapparatur	25
3.1	Der Stimulationschip	27
3.1.1	Aufbau	27
3.1.2	Herstellungsprozess	27
3.1.3	Verschiedene Dielektrika	29
3.1.4	Spannungsabhängige Chipkapazität	30
3.1.5	Rauschen und Leckströme	32
3.1.6	Zersetzung der Chips durch die Zellkultur	34
3.2	HEK293-Zellen	34
3.2.1	Kultur auf Chips	35
3.2.2	Transfektion mit rekombinierter DNA	36
3.3	Intrazelluläre Messung mit Patch-Clamp	36
3.3.1	Die Patch-Clamp-Methode	36
3.3.2	Single Electrode Voltage Clamp (SEVC)	37

4	Öffnen der Kanäle durch die extrazelluläre Spannung	41
4.1	Prinzip des Öffnens	41
4.2	Charakterisierung des Adhäsionsbereichs – optisch	46
4.2.1	Abstandsbestimmung der Zellen vom Substrat mit FLIC	46
4.2.2	Oberflächengeometrie der Zellen	47
4.2.3	Messung der Spannung mit spannungsabhängigen Farbstoffen	49
4.3	Charakterisierung des Adhäsionsbereichs – elektrisch	53
4.3.1	Gleichzeitige intra- und extrazelluläre Stimulation	53
4.3.2	Berechnung der Leitfähigkeit und Spannung im Spalt	57
4.3.3	Experimentelle Durchführung	59
4.3.4	Auswertung der Daten	60
4.3.5	Kanalreicherung in der Junctionmembran	61
4.3.6	Berücksichtigung der Elektrodifffusion	61
4.4	Öffnen der Kanäle	63
4.4.1	Messung und Simulation	63
4.4.2	Blockierung der Kv1.3-Kanäle mit Margatoxin	69
4.4.3	Messung der Gatingkurve durch extrazelluläre Stimulation	70
4.4.4	Nachträgliches Öffnen durch intrazelluläre Spannung	71
4.4.5	Messung des Schließens der Kanäle	72
4.4.6	Variation des Haltepotentials	72
5	Periodische Stimulation der Zellen	75
5.1	Prinzip der periodischen Stimulation	75
5.1.1	Erzeugung einer Rechteckspannung im Spalt	75
5.1.2	Öffnen des Modellkanals mit periodischer Stimulation	80
5.1.3	Hochfrequenter Grenzfall $T \rightarrow 0$	82
5.1.4	Allgemeiner Fall für beliebige Frequenzen	84
5.2	Anwendung auf Kanalmodelle mit mehr als zwei Zuständen	86
5.2.1	Vereinfachung der Differentialgleichungen für stückweise konstante, periodische Spannungen	87
5.2.2	Hochfrequenter Grenzfall $T \rightarrow 0$	88
5.2.3	Periodische Stimulation des Kanals <i>Shaker</i> 29-4 – Simulation	89
5.2.4	Abhängigkeit des Öffnungszustands von den Stimulationsparametern	90
5.3	Einschränkungen bei der experimentellen Umsetzung	94
5.3.1	Abweichung der Stimulationsspannung von der Rechteckform durch Chip-Bad-Filterung	94
5.3.2	Veränderung der Spannung im Spalt beim Öffnen der Kanäle	95
5.3.3	Periodische Stimulation im Current-Clamp	96
5.3.4	Unbekanntes Gatingverhalten der Kanäle bei hohen Spannungen und Frequenzen	97
6	Ergebnisse und Ausblick	99
A	Verwendete Materialien	101
A.1	Geräte	101
A.2	Lösungen	102
A.3	Bezugsquellen	103

Kapitel 1

Einführung

1.1 Motivation

Die Kontrolle von Netzwerken aus Nervenzellen ist ein wichtiger Schritt, um den Aufbau und die Funktionsweise des Gehirns zu verstehen (Abbildung 1.1). In der Abteilung Membran- und Neurophysik des Max-Planck-Instituts für Biochemie wird deshalb daran gearbeitet, das Wachstum und die Kopplung von Nervenzellen mit dem Substrat gezielt zu beeinflussen. Die Wahl von Silizium als Substrat bietet gegenüber herkömmlichen Methoden erstens den Vorteil, dass die Fortschritte der Halbleitertechnologie zur Herstellung dieses Zelle-Chip-Interfaces genutzt werden können und damit eine Sensordichte erreicht werden kann, die der Dichte der Zellen entspricht. Zweitens ist diese Methode nichtinvasiv, wodurch Langzeitmessungen mit minimaler Beeinflussung der Zellen durch die Messapparatur ermöglicht werden.

Die Kommunikation zwischen Chip und Zellen geschieht in beide Richtungen. Zur Messung der Aktionspotentiale (APs) liegen an der Chipoberfläche Feldeffekttransistoren, die

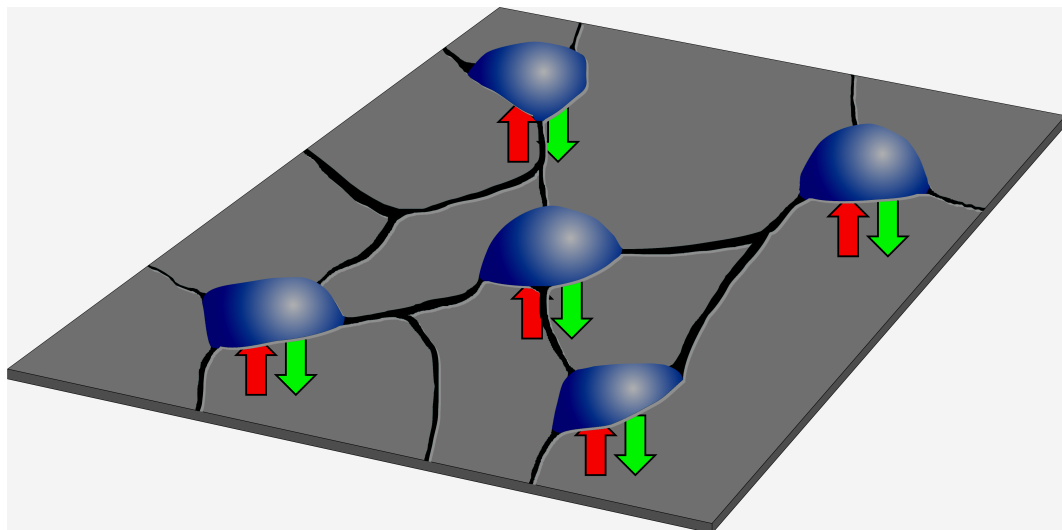


Abbildung 1.1: Um Netzwerke aus Nervenzellen kontrollieren zu können, muss ein Interface zwischen dem Substrat und der Zelle geschaffen werden, welches eine Kommunikation in beide Richtungen zulässt.

elektrische Felder durch das Gateoxid hindurch registrieren. Um APs auszulösen, wird an die Reizspots auf dem Chip eine Spannung angelegt. Der Gedanke, der hinter der elektrischen Stimulation einer Nervenzelle steckt, lässt sich in einem Vergleich mit einer Synapse erläutern (Abbildung 1.2).

Der Großteil der Signale im Nervensystem wird über chemische Synapsen zwischen den Nervenzellen übertragen. Die Auslösung eines APs an einer chemischen Synapse geschieht, indem in der präsynaptischen Zelle aufgrund eines Aktionspotentials (symbolisiert durch den blauen Blitz) Vesikel mit der Membran fusionieren und einen Botenstoff in den synaptischen Spalt ausschütten. Dieser öffnet Rezeptoren der postsynaptischen Zelle und löst dadurch einen Ionenstrom aus, der von der Synapse über den Dendriten in das Zellsoma fließt und dort das Membranpotential anhebt. Dadurch wiederum wird in der postsynaptischen Zelle die Entstehung eines neuen APs begünstigt.

In der Kopplung zwischen Chip und Zelle wird die chemische Übertragung durch eine elektrische ersetzt. Die Kopplung wird durch ein dünnes Dielektrikum vermittelt, mit dem der Chip beschichtet ist. Durch eine Spannungsänderung am Chip wird eine Spannung im Spalt erzeugt. Sie bewirkt eine Kraft auf geladene Aminosäuren in spannungabhängigen Ionenkanälen in der unteren Zellmembran. Dadurch öffnen sich die Kanäle, und Ionen strömen in die Zelle. Analog zur chemischen Synapse depolarisiert die transportierte Ladung die Membran und ermöglicht so die Entstehung eines neuen APs.

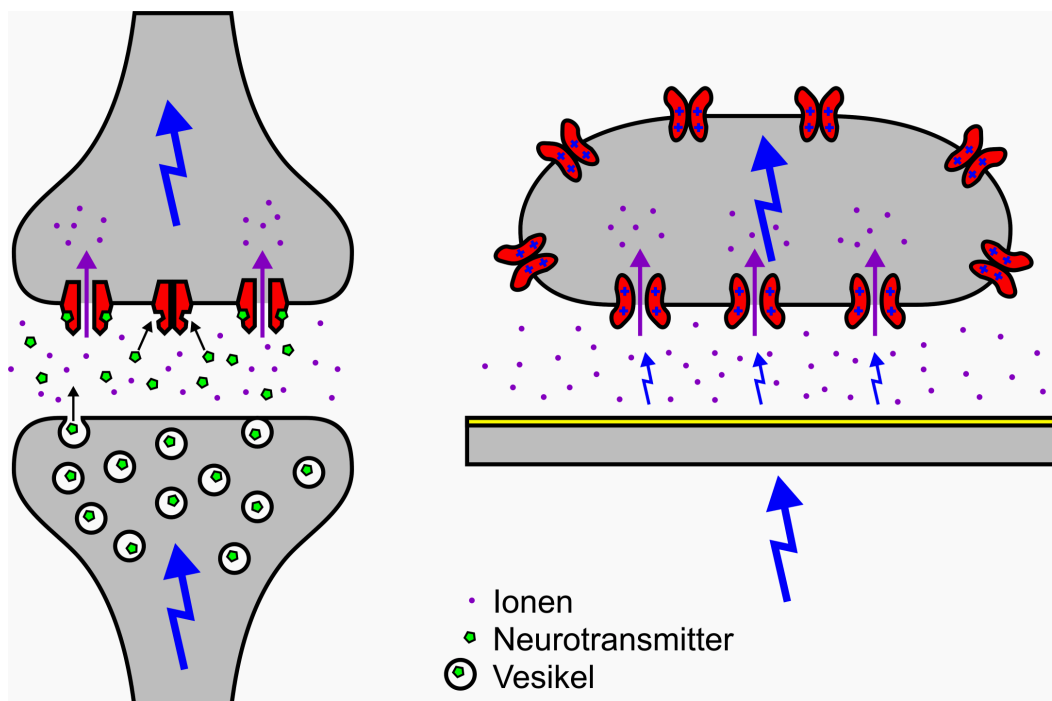


Abbildung 1.2: Links: Erreicht ein AP in der präsynaptischen Zelle (unten) eine chemische Synapse, werden Neurotransmitter aus Vesikeln freigesetzt. Sie binden an ligandengesteuerte Ionenkanäle (rot), die sich öffnen und Ionen in die Zelle strömen lassen. Der von ihnen getragene Strom fließt durch den Dendriten in das Soma der Zelle und begünstigt die Entstehung eines neuen APs. Rechts: Eine Spannungsänderung am Chip erzeugt über das Dielektrikum (gelb) eine Spannung im Spalt zwischen Chip und Zelle. Diese koppelt an geladene Aminosäuren in spannungsgesteuerten Ionenkanälen (rot). Durch den Strom, der in die Zelle fließt, wird ein AP ausgelöst.

Die wichtigsten Ionen für die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen sind Na^+ und K^+ [Hod52]. Für die Auslösung eines APs ist eine Erhöhung des Potentials in der Zelle über einen Schwellwert notwendig. Dies kann nur durch den Einstrom von Na^+ -Ionen geschehen, weil Na^+ außerhalb und K^+ innerhalb der Zelle stark angereichert ist. Die Na^+ -Kanäle öffnen sich bei einer Depolarisation der Zellmembran; soll diese durch eine Veränderung des extrazellulären Potentials im Spalt erreicht werden, ist hierfür eine negative Änderung der Spannung am Chip notwendig.

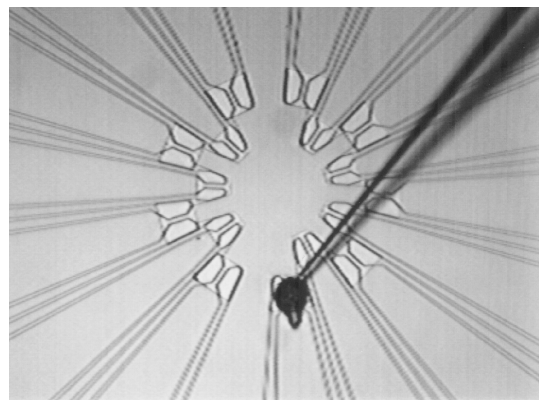
In Experimenten mit Nervenzellen von Invertebraten (Blutegel, Schnecken) wurde versucht, mit unterschiedlichen Spannungspulsen am Chip ein AP in der Zelle auszulösen. Entgegen der Erwartung ließ sich dies durch Spannungsstufen mit positivem Vorzeichen am leichtesten erreichen [Fro95, Ste97]. Theoretisch wird die Membran dabei jedoch hyperpolarisiert und die Na^+ -Ionenkanäle bleiben geschlossen. Scheinbar ist also ein anderer Mechanismus als das Öffnen der Kanäle für die Anhebung der Membranspannung über den Schwellwert und die Auslösung eines Aktionspotentials verantwortlich.

Durch die Kombination von Stimulationsspots und Feldeffekttransistoren in einem bidirektionalen Silizium-Neuron-Interface (siehe Abbildung 1.3) konnte dieser Widerspruch aufgelöst werden. An der Form des im Transistor gemessenen Signals lässt sich das Übertragungsverhalten von der Zelle in den Chip bestimmen [Wei97, Jen97]. Es ließ sich feststellen, dass durch die Stimulation der Nervenzelle mit Spannungsstufen die Leitfähigkeit der unteren Membran stark erhöht wird [Ulb99].

Die Schlussfolgerung ist, dass der Mechanismus der Stimulation durch Spannungsstufen in der Elektroporation der unteren Zellmembran besteht, d. h. durch die Spannung über die Zellmembran bilden sich Löcher in der Membran, die sich nach einiger Zeit wieder teilweise schließen. Durch die Löcher fließen Ionen in die Zelle, die die Membranspannung über die Schwellspannung heben und so ein AP auslösen. Dass dies mit positiven Spannungsstufen am ehesten gelingt, lässt sich dadurch erklären, dass sich eine im Spalt erzeugte positive Spannung dasselbe Vorzeichen aufweist wie das Ruhepotential der Zelle (ca. -80 mV) und sich ihre Beträge somit addieren. Die Elektroporation der Membran findet bei einer Membranspannung von etwa $\pm 300\text{ mV}$ statt.

Damit ist der Zweck – die Auslösung eines APs – zwar erfüllt, doch nur durch die Beeinträchtigung der unteren Zellmembran bei der Elektroporation. Das eigentliche Ziel, durch die Spannung zwischen Chip und Zelle die spannungsabhängigen Ionenkanäle der unteren

Abbildung 1.3: Ein bidirektionales Silizium-Neuron-Interface [Ulb99]. Auf einer von 16 kombinierten Reiz- und Messstrukturen liegt die Nervenzelle eines Blutegels, die mit einer Mikropipette angestochen wird. Durch die Feldeffekttransistoren lassen sich Aktionspotentiale messen, durch die Reizspots lassen sie sich auslösen.



Membran zu öffnen, ist damit aber verfehlt. Es stellt sich also die Frage, ob bzw. wie es möglich ist, die extrazelluläre Spannung so gezielt zu steuern, dass die für die Auslösung eines APs relevanten Ionenkanäle ohne die Zerstörung der Membran durch Elektroporation geöffnet werden.

Ein weiteres Problem war in bisherigen Experimenten die Auslösung von APs in Säugerzellen. In Nervenzellen von Invertebraten (Schnecken, Blutegel) ist dies dank der größeren Zeitkonstante im Spalt unproblematisch [Fro95, Ste97], konnte in Rattenzellen aber erst vor kurzem erreicht werden. Da die Zeitkonstanten in Spalt bei den Säugerzellen etwa um den Faktor 10 geringer sind, ist die Stimulation zusätzlich erschwert.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb anhand eines Modellsystem folgende Fragen untersucht:

- Unter welchen Umständen lassen sich durch Spannungspulse am Chip die Ionenkanäle in der Zellmembran öffnen?
- Ist es möglich, auch bei niedrigen Zeitkonstanten (Säugerzellen) die Kanäle zu öffnen?
- Welche mathematische Beschreibung ist für die Kopplung von Chip und Zelle geeignet?

1.2 Das Modellsystem

Gegenüber dem System mit Nervenzellen auf kombinierten Mess- und Reizstrukturen wurden zwei wesentliche Vereinfachungen durchgeführt: Die Nervenzellen wurden durch Zellen mit einer einzigen Ionenkanalorte ersetzt, und die Strukturen auf den Chips auf ein Mindestmaß reduziert (siehe Abbildung 1.4).

Die Aktionspotentiale in Nervenzellen werden durch Öffnen und Schließen von Ionenkanälen weitergeleitet, welche in die Zellmembran eingelagert sind. Dabei spielen verschiedene Na^+ - und K^+ -Kanäle eine Rolle, welche in jeder Zelle nach einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Muster exprimiert werden. Um ein einfacheres Modellsystem zu schaffen, bringt man die DNA für einen bestimmten Ionenkanal in Zellen ein, die in unverändertem Zustand keine Kanäle exprimieren. Die Zellen behandeln die fremde DNA wie eigene DNA und beginnen, die Ionenkanäle in die Zellmembran einzubauen. Durch die Patch-Clamp-Technik, bei der eine Zelle mit einer Mikroelektrode aus Glas kontaktiert wird, lassen sich die durch die Ionenkanäle fließenden Ströme messen. Die konkrete

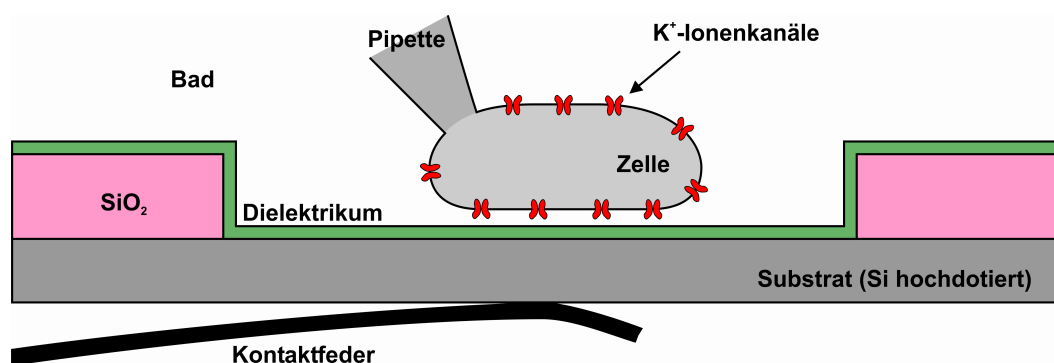


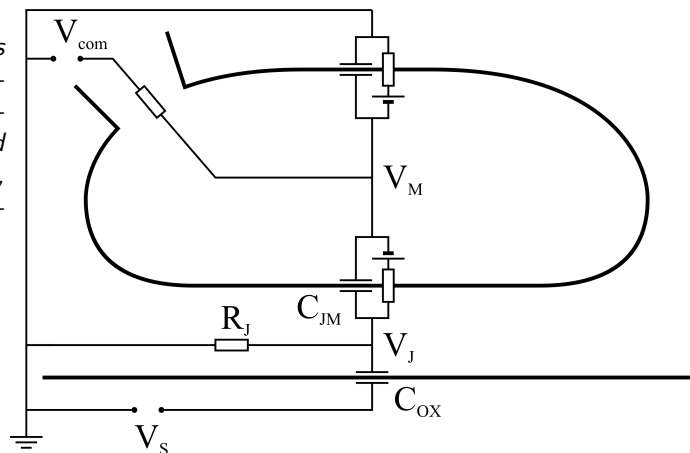
Abbildung 1.4: Das Modellsystem zur Untersuchung der kapazitiven Stimulation von Zellen durch den Siliziumchip. In die Membran einer HEK293-Zelle werden K^+ -Ionenkanäle eingebaut. Der Chip besteht aus leitendem Substrat mit einer dünnen dielektrischen Schicht.

Wahl fiel auf HEK293-Zellen und den K^+ -Ionenkanal mit der Bezeichnung Kv1.3. Na^+ -Kanäle wurden deshalb nicht verwendet, weil sie eine starke Inaktivierung zeigen und die Expression in der Zelle sich schwieriger gestaltet als bei K^+ -Kanälen.

Der Aufbau des Messchips ist sehr einfach: Da keine Transistoren auf den Chips notwendig sind, kann hochdotiertes, leitendes Silizium als Substrat verwendet werden. Die Mikrostrukturierung der Chips beschränkt sich auf einen runden freigeätzten Reizspot, auf dem die Zellen kultiviert werden. Die Kontaktierung des Chips geschieht durch eine Metallfeder, die an die Rückseite des Chips gedrückt wird. Auf dem Reizspot ist eine dünne dielektrische Schicht (ca. 10 nm) aufgebracht, durch welche hindurch die kapazitive Kopplung der Pulse vom Chip in die Zelle hinein stattfindet (Kapitel 3).

Eine einfache mathematische Beschreibung des Systems liefert das Ersatzschaltbild in Abbildung 1.5, in dem die Zellmembran als Parallelschaltung von Kapazität und Leitfähigkeit und der Spalt zwischen Zelle und Chip als Widerstand behandelt werden. Die Kopplung der Spannung V_S vom Chip über die Kapazitäten C_{OX} und C_{JM} des Dielektrikums und der unteren Membran und den Spaltwiderstand R_J lässt sich durch ein einfaches Differentialgleichungssystem beschreiben. Berücksichtigt man zusätzlich den Fluss der Ionen und die damit verbundene Ionenanreicherung im Spalt, die spannungsabhängige Leitfähigkeit der Ionenkanäle und Kapazität des Chips, so erhält man komplexere Gleichungen (Kapitel 2).

Abbildung 1.5: Ersatzschaltbild für das System Chip–Zelle. Die obere und untere Membran werden als Parallelschaltung aus Kapazitäten (Membran) und Leitfähigkeiten (Ionenkanäle) dargestellt, der Spalt zwischen Chip und Zelle als Widerstand.



Die Stärke der Kopplung zwischen Chip und Zelle wird von der Zeitkonstante $\tau_{OX} = C_{OX}R_J$ bestimmt. Damit die extrazelluläre Spannung V_J im Spalt groß genug zum Öffnen der Ionenkanäle in der unteren Zellmembran wird, ist eine hohe Zeitkonstante erforderlich. Dies wird erreicht durch einen hohen Widerstand R_J und eine hohen Spotkapazität C_{OX} .

Einen hohen Widerstand R_J kann man erhalten, indem ein Badelektrolyt mit so wenig Ionen wie möglich verwendet wird. Da nur die K^+ -Ionen für die Funktion der Ionenkanäle relevant sind, wird im extrazellulären Medium NaCl (welches den größten Beitrag zur Leitfähigkeit bildet) durch Glucose ersetzt. Der Widerstand des Elektrolyten erhöht sich dadurch um den Faktor 5 bis 10.

Eine hohe spezifische Spotkapazität lässt sich durch die Verwendung spezieller Dielektrika für die Beschichtung des Reizspots erreichen. Statt SiO_2 wird TiO_2 mit einer Zwischenschicht aus Si_3N_4 verwendet und die Kapazität damit um den Faktor 5 erhöht.

1.3 Die Spannung im Spalt öffnet die Ionenkanäle

Die für die Weiterleitung von Nervensignalen verantwortlichen Ionenkanäle haben die Eigenschaft, dass sie in Abhängigkeit von der Spannung, welche über die Membran anliegt, ihre Konformation verändern. Befindet sich das Zellinnere gegenüber dem Äußeren auf einer Spannung von etwa -80 mV , so sind die Ionenkanäle geschlossen. Steigt diese Spannung über ca. -40 mV , so öffnen sich die Kanäle mit einer von der Spannung abhängigen Rate und lassen die Ionen passieren.

Legt man am Chip eine Stimulationsspannung V_S an, so fließt über die Kapazität C_{OX} des Dielektrikums und den Spaltwiderstand R_J ein Strom, welcher eine Spannung V_J im Spalt erzeugt (vgl. Abbildung 1.5). Hält man die Spannung V_M in der Zelle mittels des Patch-Clamp-Verstärkers konstant, öffnen bzw. schließen sich die Kanäle der unteren Membran (je nach Vorzeichen von V_J).

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Ansätze zur Umsetzung dieser Idee verfolgt:

1. Die Zeitkonstante, die die Stärke der Kopplung zwischen Chip und Zelle bestimmt, wird so weit vergrößert, dass die Spannung lange genug aufrecht erhalten werden kann, um mittels eines einzigen Spannungspulses am Chip die Kanäle der unteren Membran zu öffnen (Kapitel 4). Dies wird erreicht durch eine Vergrößerung der Kapazität der dielektrischen Schicht und Verwendung einer Badlösung mit geringer Leitfähigkeit.
2. Durch Anlegen vieler aufeinander folgender Pulse am Chip werden die Kanäle stückweise immer weiter geöffnet (Kapitel 5). Wird diese periodische Stimulation mit einer geeigneten Spannung durchgeführt, sollte ein Öffnen der Kanäle auch mit einer geringeren Kapazität des Dielektrikums und einem physiologischen Badelektrolyten möglich sein. Die entsprechenden Simulationen wurden durchgeführt, Experimente sind bisher aber noch nicht gelungen.

Kapitel 2

Theoretische Beschreibung

Die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildet das System aus der Zelle und dem Siliziumchip. In diesem Kapitel werden die Differentialgleichungen hergeleitet, die das System beschreiben. Zuerst wird der Teil der Gleichungen erläutert, der für die Kopplung zwischen Chip und Zelle relevant ist (Abschnitt 2.1). Die Leitfähigkeit der Zellmembran, welche in diese Gleichungen eingeht, wird durch die Anzahl der geöffneten Ionenkanäle bestimmt. Die Differentialgleichungen für das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle in Abhängigkeit von der Membranspannung werden in Abschnitt 2.2 hergeleitet.

2.1 Das elektrische Modell

Der erste Schritt der Modellierung des Systems besteht darin, die verschiedenen Komponenten der Ströme zu bestimmen und ein elektrisches Ersatzschaltbild aufzustellen. Dabei werden die Zellmembran und die isolierende Oxidschicht auf dem Chip als Kapazitäten beschrieben, der Elektrolyt im Spalt und die Ionenkanäle in der Membran als Widerstände.

2.1.1 Das Punktkontaktmodell

Die einfachste Möglichkeit, die elektrischen Vorgänge bei der Stimulation der Zellen vom Chip aus zu beschreiben, bietet das Punktkontaktmodell. Es leitet sich aus dem Flächenkontaktmodell ab, welches aber nur verwendet werden muss, wenn lokale Größen im Spalt gemessen werden, z. B. Fluoreszenz (zweidimensional im Mikroskop) oder die Spannung im Spalt (eindimensional mit Transistorarray).

Im Flächenkontaktmodell (Abbildung 2.1) werden Membran und Spalt in differentiell kleine Flächen zerlegt. Die für die Vorgänge im Spalt relevanten Größen sind die Kapazitäten von Membran und Oxid und die Leitfähigkeiten der Membran und des Elektrolyten im Spalt. Die Spannungen am Chip (V_S), in der Zelle (V_M) und im Bad (Masse) werden als jeweils räumlich konstant und nur zeitlich variabel angenommen, dagegen variiert die Spannung V_J im Spalt sowohl zeitlich als auch in den Koordinaten x und y horizontal zu Membran und Chip.

An jedem Punkt (x, y) zwischen Zelle und Chip lassen sich das Kirchhoffsche und Ohmsche Gesetz anwenden, und man erhält die zweidimensionale Kabelgleichung, da es sich hier um einen Kern-Mantel-Leiter handelt. Eine mathematische Behandlung dieses Problems findet sich in [Wei97, Bra00].

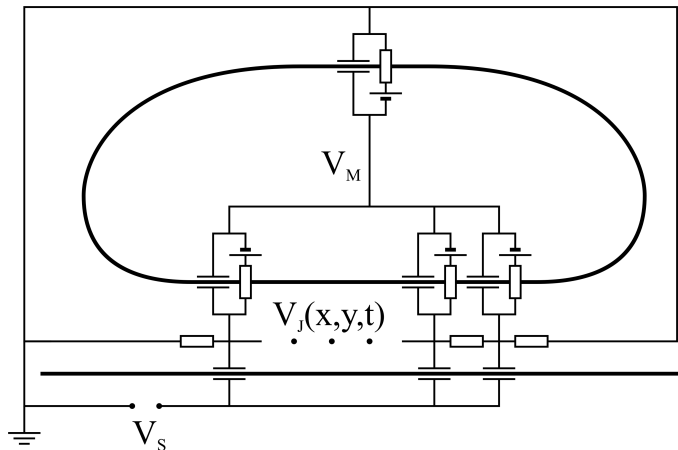


Abbildung 2.1: Im Flächenkontaktmodell wird der Übergang Chip-Zelle an jedem Punkt (x, y) der Adhäsionsfläche berechnet.

Eine Vereinfachung vom Flächenkontaktmodell bildet das Punktkontaktmodell (Abbildung 2.2). Hier wird die Spannung V_J über die Fläche des Kontakts zwischen Chip und Zelle gemittelt, und die differentielle Behandlung der Kapazitäten und Leitfähigkeiten wird durch diskrete Elemente ersetzt.

Um den Widerstand des Spalts R_J zu bestimmen, wird angenommen, der Kontakt beschränkt sich auf einen Ring mit dem Radius $\frac{2}{3}a_J$, wobei a_J den Radius der Adhäsionsfläche bezeichnet (dort liegt bei einer Aufteilung der kreisförmigen Adhäsionsfläche in infinitesimal kleine Kreissektoren der Schwerpunkt der Flächenstücke). Daraus ergibt sich nach [Wei97] bei einem Flächenwiderstand r_J im Spalt ein Wert von

$$R_J = \frac{r_J}{5\pi}$$

Aus Abbildung 2.2 lassen sich direkt die Differentialgleichungen aufstellen:

$$\begin{aligned} \frac{V_J}{R_J} + C_{OX} \cdot \frac{d(V_J - V_S)}{dt} &= C_{JM} \cdot \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i G_{JM}^i \cdot (V_M - V_J - V_0^i) \\ &= -C_{FM} \cdot \frac{dV_M}{dt} - \sum_i G_{FM}^i \cdot (V_M - V_0^i) \end{aligned} \quad (2.1)$$

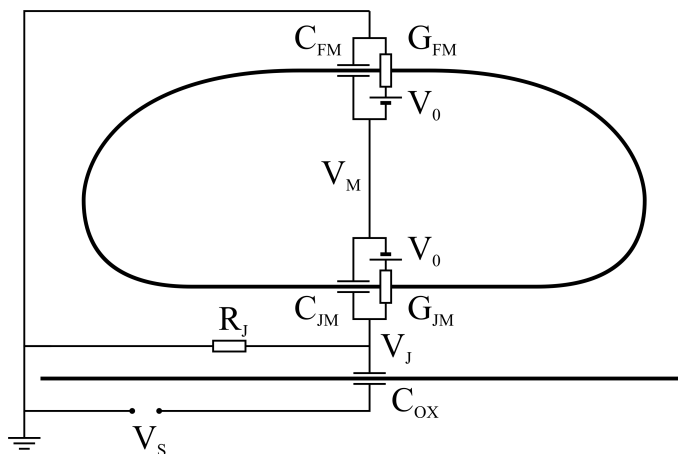


Abbildung 2.2: Im Punktkontaktmodell wird der Kontakt über die Adhäsionsfläche integriert und zu einem einzelnen Punkt zusammengefasst.

Der Index i der Summe über die Leitfähigkeiten bezieht sich auf die unterschiedlichen Ionen- bzw. Kanalsorten. Es werden nur die K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Leitfähigkeiten berücksichtigt, da im Elektrolyten hauptsächlich diese Ionen enthalten sind. Die Differentialgleichungen für die Leitfähigkeiten G_{FM}^K und G_{JM}^K , welche sich aus dem Verhalten der K^+ -Ionenkanäle ergeben, müssen natürlich zusätzlich berechnet werden (siehe Abschnitt 2.2). Die Na^+ - und Cl^- -Leitfähigkeiten sind Leckleitfähigkeiten und werden als konstant angenommen.

2.1.2 Voltage-Clamp

Im Voltage-Clamp-Modus des Patch-Clamp-Verstärkers lässt sich die Spannung im Zellinneren steuern (siehe Abbildung 2.3). Mittels eines speziellen Regelkreises injiziert der Verstärker über die Mikropipette einen Strom in die Zelle, der proportional zur Abweichung der Spannung V_M in der Zelle von einer Sollspannung V_{com} ist, die von außen vorgegeben wird. Der hierbei verwendete Proportionalitätsfaktor wird als *Gain* bezeichnet und lässt sich am Gerät einstellen. Er trägt die Einheit nA/mV und entspricht daher einer Leitfähigkeit. Der Verstärker kann die vorgegebene Spannung V_{com} also nicht immer exakt einstellen; vielmehr scheint das Zellinnere über einen Widerstand R_{GAIN} zu der Spannung V_{com} verbunden zu sein. Je höher der Gain-Faktor gewählt wird, desto geringer wird die Differenz der geklemmten Spannung V_M im Zellinneren und dem Sollwert V_{com} . Falls in der Simulation die Spannung V_M ohne Umweg über die Strominjektion vorgegeben wird, können die Fehler durch unvollständigen Voltage-Clamp nicht reproduziert werden. Zusätzlich können in diesem Fall die kapazitiven Ströme nicht berechnet werden.

In diesem Fall lautet die unterste Zeile der Differentialgleichung 2.1:

$$\dots = -C_{FM} \cdot \frac{dV_M}{dt} - \sum_i G_{FM}^i \cdot (V_M - V_0^i) - G_{GAIN} \cdot (V_M - V_{com})$$

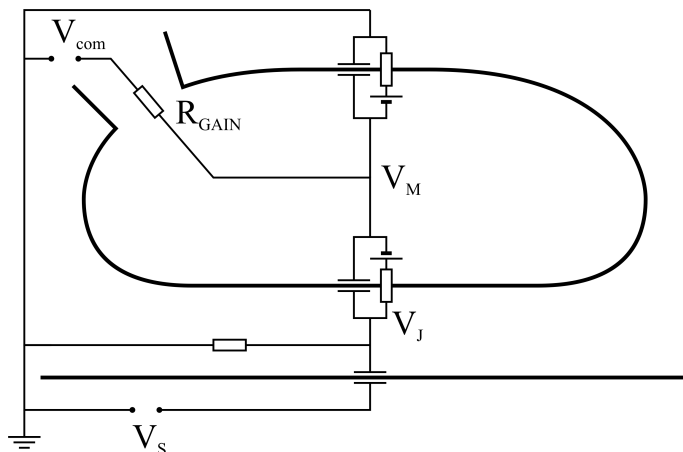


Abbildung 2.3: Im Voltage-Clamp-Modus versucht der Patch-Clamp-Verstärker, die Spannung V_M über einen einstellbaren Gain auf eine Sollspannung V_{com} zu regeln.

2.1.3 Elektrodifusionsmodell

Die in Abschnitt 2.1 vorgestellten Modelle für die Ströme im System Chip-Zelle nehmen einen konstanten Widerstand des Elektrolyten im Spalt zwischen Chip und Zelle als Grundlage an. Dabei wird nicht berücksichtigt, dass sich durch ein- und ausströmende

Ionen die spezifische Leitfähigkeit des Elektrolyten ändert (siehe Abbildung 2.4) [Str01]. Zusätzlich verändern sich durch die variablen Ionenkonzentrationen die Umkehrpotentiale für die unterschiedlichen Ionensorten $i \in \{K^+, Na^+, Cl^-\}$.

Um die Differentialgleichungen bei diesem Modell zu erhalten, müssen die Ein- und Ausströme von Ionen der Konzentrationsänderung im Spalt gegenübergestellt werden.

Die Umkehrpotentiale $V_{J_0}^i$ und V_0^i für die verschiedenen Ionensorten bezüglich der Adhäsionsmembran und freien Membran sind

$$V_{J_0}^i = -\frac{k_B T}{z^i e_0} \cdot \ln\left(\frac{c_J^i}{c_{out}^i}\right) \quad \text{und} \quad V_0^i = -\frac{k_B T}{z^i e_0} \cdot \ln\left(\frac{c_{in}^i}{c_{out}^i}\right)$$

wobei z^i die Valenz des betreffenden Ions ist und c_J^i bzw. c_{out}^i die Konzentrationen im Spalt bzw. im Bad. Der Strom aus der Zelle in den Spalt beträgt

$$I_{JM}^i = G_{JM}^i \cdot ((V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J_0}^i)),$$

und derjenige vom Spalt in das Bad (d_J Abstand Zelle-Chip, λ^i molare Leitfähigkeit)

$$I_J^i = 5\pi d_J \cdot \lambda^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J_0}^i).$$

Der Faktor 5π ergibt sich aus dem Vergleich mit dem elektrischen Modell unter Vernachlässigung der Diffusion. Mit der Nernst-Einstein-Gleichung [Atk98]

$$\lambda^i = (z^i)^2 \cdot D^i \cdot \frac{e_0^2}{k_B T},$$

in der D^i die Diffusionskonstante für die Ionensorte i bezeichnet, ergibt sich dann

$$I_J^i = 5\pi d_J \cdot (z^i)^2 \cdot D^i \cdot \frac{e_0^2}{k_B T} \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J_0}^i).$$

Die Differenz der beiden Ströme ist über die Ladung pro Mol im Spaltvolumen mit der Änderung der Konzentration verknüpft:

$$I_{JM}^i - I_J^i = z^i e_0 d_J A_J \cdot \frac{dc_J^i}{dt}$$

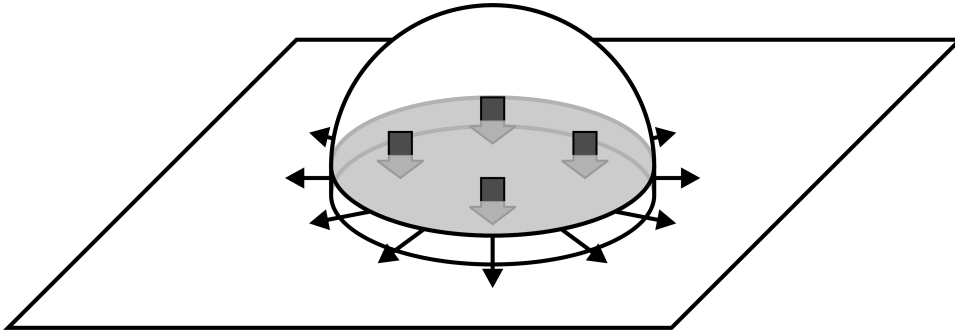


Abbildung 2.4: Im Elektrodifusionsmodell werden die Ionenströme von der Zelle in den Spalt (dicke Pfeile) und aus dem Spalt heraus ins umgebende Medium (dünne Pfeile) berücksichtigt. Dies ändert die spezifische Leitfähigkeit und die Umkehrpotentiale im Spalt.

Mit den Abkürzungen

$$Q_J^i = z^i e_0 d_J A_J \quad \text{und} \quad B^i = 5\pi d_J \cdot (z^i)^2 \cdot D^i \cdot \frac{e_0^2}{k_B T}$$

ergibt sich

$$Q_J^i \cdot \frac{dc_J^i}{dt} = G_{JM}^i \cdot ((V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J0}^i)) - B^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J0}^i).$$

In den Gleichungen 2.1 erscheint statt des Ausdrucks

$$\frac{V_J}{R_J}$$

also nun

$$\sum_i B^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J0}^i),$$

und insgesamt ergibt sich das Differentialgleichungssystem 2.2:

$$\begin{aligned} & C_{OX} \cdot \frac{d(V_J - V_S)}{dt} + \sum_i B^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J0}^i) \\ &= C_{JM} \cdot \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i G_{JM}^i \cdot ((V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J0}^i)) \\ &= -C_{FM} \cdot \frac{dV_M}{dt} - \sum_i G_{FM}^i \cdot (V_M - V_0^i) \end{aligned} \quad (2.2)$$

$$Q_J^i \cdot \frac{dc_J^i}{dt} = G_{JM}^i \cdot ((V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J0}^i)) - B^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J0}^i)$$

$$\forall i \in \{K^+, Na^+, Cl^-\}$$

2.1.4 Umformulierung für spezifische Größen

Da die meisten in den Differentialgleichungen verwendeten Leitfähigkeiten und Kapazitäten Eigenschaften der Zellmembran widerspiegeln, ändern sie sich in Abhängigkeit von der Fläche der Membran. Besser geeignet für eine Charakterisierung der Kopplung Chip-Zelle sind die jeweiligen spezifischen Größen:

$$\begin{aligned} c_{JM} &= \frac{C_{JM}}{A_J} & g_{FM} &= \frac{G_{FM}}{A_F} \\ c_{FM} &= \frac{C_{FM}}{A_F} & b^i &= \frac{B^i}{A_J} \\ c_{OX} &= \frac{C_{OX}}{A_J} & q^i &= \frac{Q^i}{A_J} \\ g_{JM} &= \frac{G_{JM}}{A_J} & g_J &= \frac{G_J}{A_J} = \sum b^i c_J^i \end{aligned} \quad (2.3)$$

Die Differentialgleichungen können mit den Umformungen 2.3 auch für spezifische Größen formuliert werden, wobei $\beta = \frac{A_J}{A_F}$ gilt:

$$\begin{aligned}
 & c_{OX} \cdot \frac{d(V_J - V_S)}{dt} + \sum_i b^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J0}^i) \\
 = & c_{JM} \cdot \frac{d(V_M - V_J)}{dt} + \sum_i g_{JM}^i \cdot ((V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J0}^i)) \\
 = & -\frac{1}{\beta} c_{JM} \cdot \frac{dV_M}{dt} - \frac{1}{\beta} \sum_i g_{JM}^i \cdot (V_M - V_0^i)
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

$$q_J^i \cdot \frac{dc_J^i}{dt} = g_{JM}^i \cdot ((V_M - V_0^i) - (V_J - V_{J0}^i)) - b^i \cdot c_J^i \cdot (V_J - V_{J0}^i)$$

$$\forall i \in \{K^+, Na^+, Cl^-\}$$

2.2 Die K^+ -Kanäle in der Zellmembran

Ionenkanäle sind Membranproteine, die einen Ionenfluss zwischen dem Inneren und dem Äußeren einer Zelle ermöglichen. Dies geschieht durch eine kleine, mit Wasser gefüllte Pore hindurch. Ursprünglich wurden Ionenkanäle in der Zellmembran postuliert, um die Na^+ - und K^+ -Ströme in den klassischen Experimenten von Hodgkin und Huxley [Hod52] erklären zu können. Inzwischen weiß man, dass Ionenkanäle in der Natur eine Vielzahl von Aufgaben übernehmen, deren bedeutendste natürlich die Weiterleitung und Erzeugung von elektrischen Signalen wie in Nerven oder im Herzmuskel ist. Ionenkanäle sind aber auch an der Regulation des pH-Wertes der Zelle, der Ausschüttung von Hormonen oder der Steuerung der Cilienbewegung von Einzellern beteiligt. Es wird unterschieden zwischen liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanälen. An der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen sind nur die Ca^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Ionenkanäle von Bedeutung.

Ein Ionenkanal, der sich gut für die Untersuchung der kapazitiven Kopplung zwischen Chip und Zelle verwenden lässt, sollte folgende Eigenschaften aufweisen:

- Expression in der Zellmembran durch einfache gentechnische Methoden
- leichte Kontrollierbarkeit des Gatingverhaltens durch Patch-Clamp-Technik
- hohe Leitfähigkeiten der Zellen
- Literaturangaben zum Gatingverhalten der Kanäle

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Experimente der K^+ -Kanal mit der Bezeichnung Kv1.3 verwendet. Die Simulationen wurden für den Kanal *Shaker 29-4* durchgeführt, für den von Schoppa und Sigworth ein Modell mit genauer mathematischer Beschreibung aufgestellt wurde [Sch98a, Sch98c].

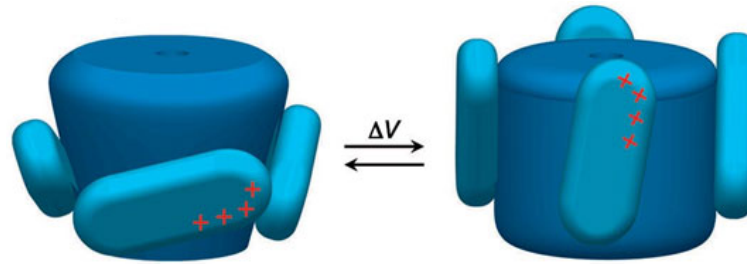


Abbildung 2.5: Die Struktur des K⁺-Ionenkanals KvAP wurde 2003 von Jiang et al. aufgeklärt [Jia03] und daraus auf den Gatingmechanismus geschlossen. Während das positiv geladene S4-Segment durch die Membranspannung eine Drehung ausführt, verändert sich die Konformation des gesamten Proteins und schließt bzw. öffnet die Pore, durch welche die Ionen strömen. Die große Sequenzübereinstimmung macht diesen Gatingmechanismus auch bei den Shaker-Kanälen wahrscheinlich.

2.2.1 Aufbau und Funktion der *Shaker* K⁺-Kanäle

Bereits 1936 wurde bei Mutationen von Fruchtfliegen der Gattung *Drosophila* ein Merkmal beobachtet, das sich durch ein Zittern der Beine in der Narkose ausprägte und deshalb die Bezeichnung *Shaker* erhielt [Lüe36, Cat44]. 1983 konnte Salkoff zeigen, dass es sich bei der *Shaker*-Mutation um eine Mutation eines Ionenkanals handelt, indem er Voltage-Clamp-Messungen an Rückenmuskeln von *Drosophila melanogaster* durchführte [Sal83]. Im Jahr 1987 wurde das entsprechende *Shaker*-Gen geklont und sequenziert [Kam87, Pap87, Tem87] und daraufhin auch in Oozyten (unbefruchtete Eier) des Kralenfrosches *Xenopus* exprimiert und elektrophysiologisch untersucht [Gur83, Tim88]. In den darauf folgenden Jahren wurden immer weitere Kanal-Gene gefunden, die dem des Shaker-Kanals sowohl in ihren Eigenschaften als auch in der Sequenz sehr ähnlich sind. Diese werden heute als Unterfamilie 1 der spannungsabhängigen K⁺-Kanäle zusammengefasst und werden mit Kv1.1 bis Kv1.7 bezeichnet. Von den K⁺-Kanälen ist dies die am besten untersuchte Gruppe.

Da in der Abteilung Membran- und Neurophysik bereits Untersuchungen mit dem Kanal Kv1.3 angestellt wurden, entschloss ich mich, auch in meiner Arbeit diesen Kanal der *Shaker*-Familie zu verwenden. Die oben genannten Bedingungen sind für diesen Kanal weitgehend erfüllt:

- das genetische Material liegt schon eingebaut in ein geeignetes Plasmid vor
- Patch-Clamp-Experimente an K⁺-Kanälen wurden in unserer Abteilung bereits erfolgreich durchgeführt
- die Leitfähigkeiten der Zellen sind sehr hoch (bis über 100 nS), da das verwendete Trägerplasmid (pcDNA3) den Kanal stark exprimiert
- Literaturangaben zum Gatingverhalten des Kv1.3-Kanals liegen zwar nicht vor, aber es wurde ein anderer Kanal der *Shaker*-Familie sehr ausführlich untersucht [Sch98a, Sch98b, Sch98c].

Der Aufbau aller Kanäle aus der *Shaker*-Familie sowie der vieler anderer K⁺-Kanäle ist bereits gut erforscht. Ein einzelnes Kanalprotein besteht aus einer etwa 500 Aminosäuren langen Kette. Entlang dieser Kette liegen mehrere lipophile Regionen, die bei der Faltung des Proteins an die Zellmembran binden und als Transmembransegmente S1 bis S6 bezeichnet werden. Zwischen den Segmenten S5 und S6 liegt eine Aminosäuresequenz, die

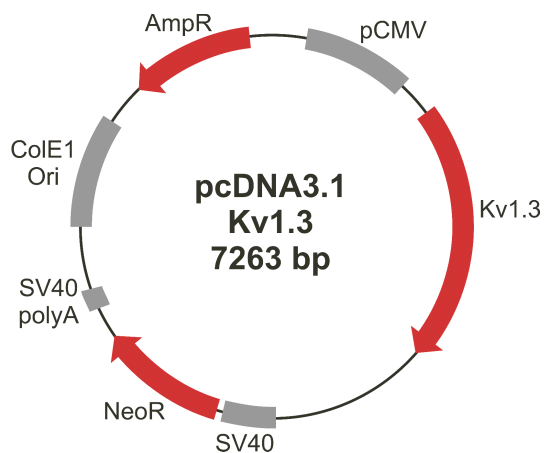


Abbildung 2.6: Die DNA für den Kv1.3-Kanal wurde in das pcDNA3.1-Plasmid integriert. Rot: codierende Sequenzen für den Kanal und zwei Antibiotikaresistenzen. Grau: nicht codierenden Bereiche (Ursprung für die Plasmidvermehrung, Promotoren u.ä.).

im gefalteten Zustand eine Pore bildet und die Passage der K^+ -Ionen durch die Membran ermöglicht. Das S4-Segment ist beweglich an die anderen Segmente gebunden und bewirkt durch mehrere positive Ladungen die Spannungsabhängigkeit des Kanals (siehe Abbildung 2.5). Am N-Terminus des Proteins befindet sich die sog. Tetramerisierungsdomäne, die für eine Zusammenlagerung von mehreren Kanalproteinen zum kompletten Kanal notwendig ist. Erst nach dieser Verbindung kann der Kanal seine Aufgabe in der Membran erfüllen. In Laborexperimenten, in denen nur eine einzelne Sorte Kanalprotein von der Zelle exprimiert wird, besteht ein Kanal aus vier identischen Untereinheiten.

Der für diese Arbeit verwendete Kv1.3-Kanal stammt von der Ratte *Rattus norvegicus*. Die Sequenz wurde zuerst von Stühmer et al. [Stü89] veröffentlicht (damals unter dem Namen *RCK3*) und kann im Internet eingesehen werden [Seq]. Die cDNA wurde uns freundlicherweise von Dr. Len Kaczmarek und Dr. Mark Tanouye zur Verfügung gestellt. Um eine Expression in HEK293-Zellen zu ermöglichen, wurde die DNA mittels gentechnischer Methoden von Dr. Jürgen Kupper in das Plasmid pcDNA3.1 der Firma Clontech integriert, jedoch an den Übergangsstellen um nicht übersetzte Bereiche ergänzt, die eine erhöhte Expressionsrate bewirken (Abb. 2.6). Das so entstandene DNA-Plasmid wird mittels einer sog. Transfektion (Abschnitt 3.2.2) in den Zellkern eingeschleust und sorgt dort für die Produktion der Ionenkanäle.

Die elektrischen Eigenschaften des Kv1.3-Kanals lassen sich mittels der Patch-Clamp-Technik bestimmen. Dabei wird durch Spannungspulse eine mit dem Kanal transfizierte Zelle depolarisiert und der durch die gesamte Zellmembran fließende Strom gemessen. Aus den so gewonnenen Transienten und aus Einzelkanalmessungen, bei denen nur ein winziger Membranfleck mit genau einem Kanal vermessen wird, lassen sich eine Vielzahl von Parametern ableiten. In [Con99, Hil01] kann man folgende für den Kanal Kv1.3 bestimmte Eigenschaften nachlesen:

Einzelkanalleitfähigkeit Λ	12–14 pS
Gatungsspannung V_g	6.6 mV
Ionenselektivität Na^+/K^+	< 0.03
Spannung $V_{0.5}$	–25 mV

Der Vergleich mit eigenen Messungen zeigt jedoch, dass sich diese in Oozyten des Frosches *Xenopus laevis* gemessenen Werte von den in HEK293-Zellen bestimmten deutlich unterscheiden. Diese Abweichung der in unterschiedlichen Expressionsumgebungen gemessenen

elektrischen Eigenschaften von Ionenkanälen ist bekannt [Cla00]. Die Bestimmung der Parameter, die den Kanal Kv1.3 in den HEK293-Zellen beschreiben, geschieht in Abschnitt 2.2.4.

2.2.2 Doppelminimumpotential und Ratenkonstanten

Um das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle bei Spannungsänderungen zu verstehen und zu berechnen, ist ein Modell notwendig, welches die Vorgänge in einem Kanal sowohl anschaulich als auch mathematisch beschreibt. Das ursprünglich von Hodgkin und Huxley 1952 aufgestellte Modell [Hod52] beschreibt die Kanaldynamik erstaunlich gut und eignet sich trotz mannigfaltiger Verfeinerungen in den letzten 50 Jahren hervorragend als Modell für den *Shaker*-Kanal.

Obwohl Hodgkin und Huxley keine Möglichkeit hatten, die Struktur des K⁺-Ionenkanals direkt oder indirekt zu untersuchen, konnten sie aus dem Verlauf der Leitfähigkeit der Membran bei einer De- oder Hyperpolarisation der Membran schließen, dass die K⁺-Ionenkanäle aus jeweils vier Untereinheiten oder Klappen bestehen müssen, die sich voneinander unabhängig öffnen und schließen. Erst wenn alle Klappen eines Kanals gleichzeitig geöffnet sind, können Ionen den Kanal passieren. Die mathematische Beschreibung dieses Vorgangs ist folgende:

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine dieser Klappen geöffnet ist, soll mit n bezeichnet werden. Das Öffnen und Schließen einer einzelnen Klappe geschieht mit den spannungsabhängigen Ratenkonstanten $\alpha = \alpha(V)$ und $\beta = \beta(V)$. Da sich nur die geschlossenen Kanäle öffnen und die offenen Kanäle schließen können, ergibt sich für n die Differentialgleichung

$$\frac{dn}{dt} = \alpha \cdot (1 - n) - \beta \cdot n \quad (2.5)$$

Bei einem Sprung der Spannung auf einen konstanten Wert ergibt sich daraus für $n(t_0) = 0$ ein exponentieller Zeitverlauf:

$$n(t) = n_\infty \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}\right) \quad (2.6)$$

$$\text{mit } n_\infty = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \quad \text{und} \quad \tau = \frac{1}{\alpha + \beta} \quad (2.7)$$

Wenn die spezifische Leitfähigkeit der Membran bei offenen Kanälen g_0 ist, dann ergibt sich für die zeitabhängige Leitfähigkeit $g(t)$ der Membran wegen der Zusammensetzung des Kanals aus den vier unabhängigen Untereinheiten

$$g(t) = g_0 \cdot [n(t)]^4 = g_0 \cdot \left[n_\infty \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}\right)\right]^4 \quad (2.8)$$

Den Strom, der durch die Kanäle fließt, erhält man unter Berücksichtigung des K⁺-Umkehrpotentials V_K und der Membranfläche A_M :

$$I(t) = A_M \cdot g(t) \cdot (V_M - V_K) \quad (2.9)$$

Um das Verhalten der Kanäle beschreiben zu können, fehlt nun noch ein Modell für die Spannungsabhängigkeit der Ratenkonstanten $\alpha(V)$ und $\beta(V)$, aus denen sich auch die

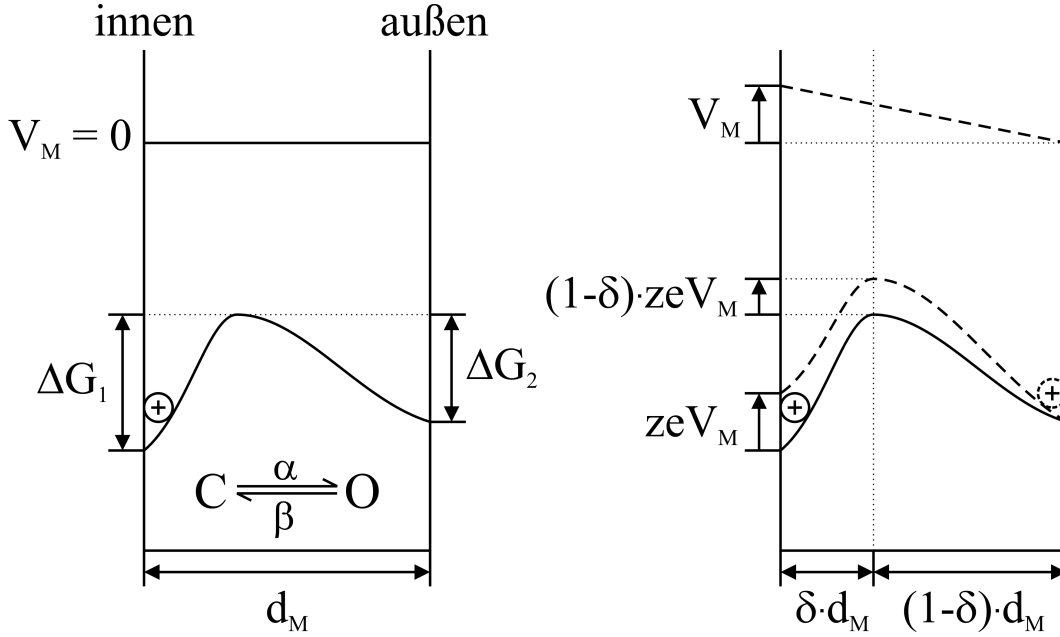


Abbildung 2.7: Energieprofil eines Doppelminimumpotentialtopfes als Modell für den Spannungssensor einer Ionenkanalklappe. Im spannungsfreien Fall befindet sich der Sensor im Potentialtopf an der Innenseite der Membran (links) im geschlossenen Zustand (C). Wird eine Spannung V_M angelegt, verkippt diese den Potentialtopf, der Sensor rutscht in den offenen Zustand (O) und öffnet die Klappe. (nach [Joh95])

Parameter n_∞ und τ durch Formel 2.7 ergeben. Das einfachste Modell ist ein Doppelminimumpotentialtopf, welcher durch ein anliegendes elektrisches Feld verkippt wird (siehe Abbildung 2.7) [Joh95]. Der Spannungssensor der Kanalklappe wird hier als „Teilchen“ betrachtet, welches sich in diesem Potential befindet und durch thermische Aktivierung zwischen den beiden Potentialtöpfen hin und her springen kann. Für $V_M = 0$ mV sei die Höhe der Energiebarriere vom geschlossenen Zustand aus ΔG_1 , vom offenen Zustand aus gesehen ΔG_2 . Die Rate, mit der das Teilchen in den jeweils anderen Potentialtopf wechselt, wird angenommen als ein konstanter Vorfaktor multipliziert mit einem aus der Boltzmann-Verteilung bekannten energieabhängigen Term [Kra40, Hän90]:

$$\begin{aligned}\alpha(0) &= A \cdot e^{-\frac{\Delta G_1}{kT}} \\ \beta(0) &= A \cdot e^{-\frac{\Delta G_2}{kT}}\end{aligned}$$

Wird nun ein elektrisches Feld angelegt, verschiebt dieses die Energieniveaus der Potentialtöpfe und der Barriere. ze sei die Ladung des Spannungssensors und δ der Asymmetriefaktor, der den Einfluss von V_M auf ΔG wiedergibt; $\delta = 0.5$ gilt, wenn die Energiebarriere symmetrisch zwischen Innen- und Außenseite der Membran liegt. α und β ändern sich nun entsprechend der Energiedifferenzen zu

$$\alpha(V_M) = A \cdot e^{-\frac{\Delta G_1 - zeV_M + (1-\delta)zeV_M}{kT}}$$

2.2. DIE K^+ -KANÄLE IN DER ZELLMEMBRAN

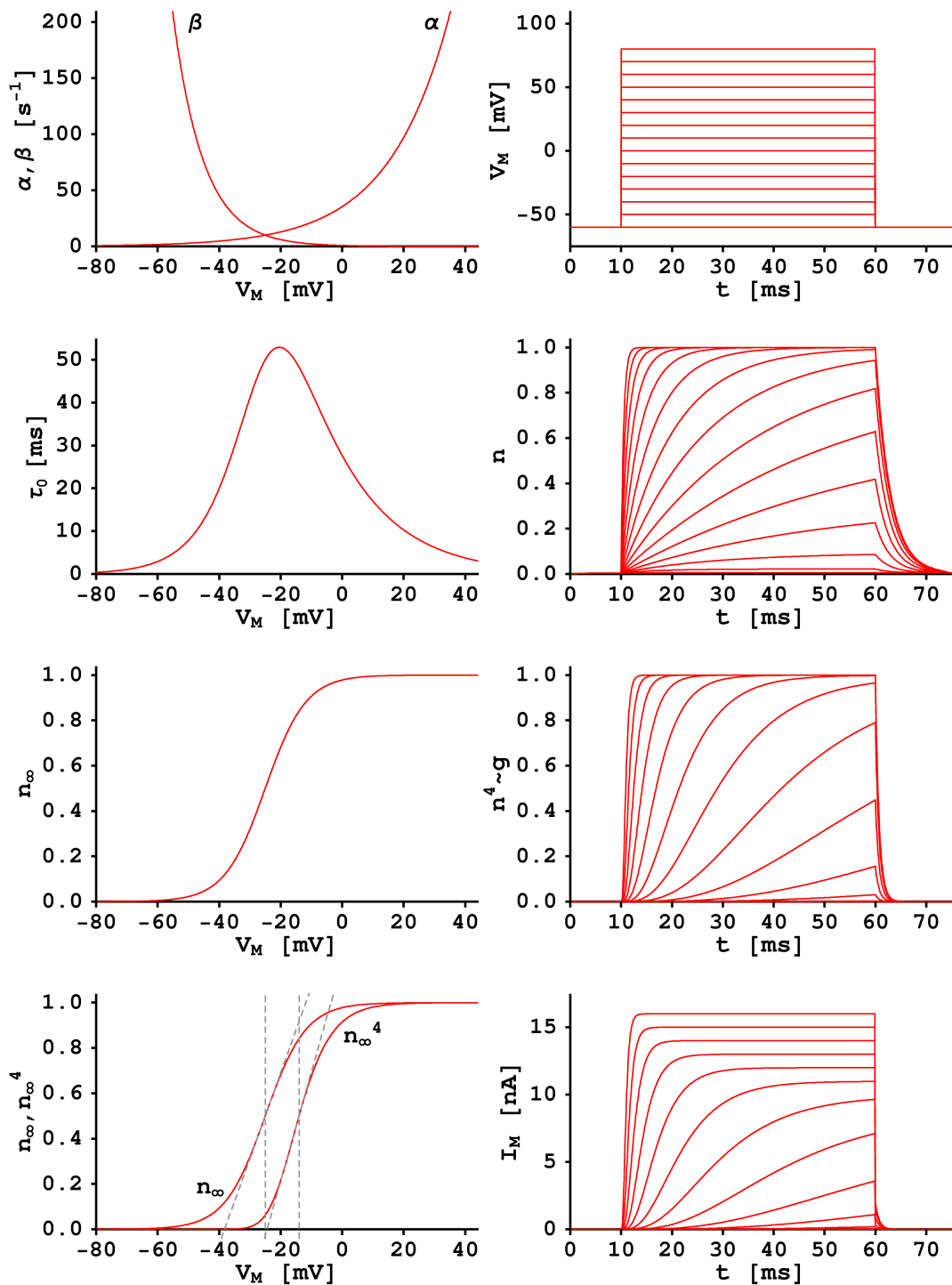


Abbildung 2.8: Links: Die Ratenkonstanten α und β bestimmen die Dynamik einer Kanalklappe. Daraus ergeben sich die Zeitkonstante τ_0 und die Gatingkurve n_∞ . Für den gesamten Kanal erhält man n_∞^4 . Rechts: Wird an die Membran eine depolarisierende Spannungsstufe angelegt (V_M), so öffnen sich die Kanalklappen (n) und der gesamte Kanal (n^4). In den Strom I_M durch die Membran gehen noch die Leitfähigkeit g_0 und das K^+ -Umkehrpotential V_K ein.

$$\begin{aligned}
 &= A \cdot e^{-\frac{\Delta G_1 - \delta z e V_M}{kT}} \\
 &= \tau_0^{-1} \cdot e^{\frac{\delta(V_M - V_{0.5})}{V_g}} \\
 \beta(V_M) &= A \cdot e^{-\frac{\Delta G_2 + (1-\delta)z e V_M}{kT}} \\
 &= \tau_0^{-1} \cdot e^{-\frac{(1-\delta)(V_M - V_{0.5})}{V_g}}
 \end{aligned} \tag{2.10}$$

$$\text{mit } V_g = \frac{kT}{ze} \quad , \quad V_{0.5} = \frac{\Delta G_1 - \Delta G_2}{ze}$$

$$\text{und } \tau_0 = A^{-1} e^{\frac{(1-\delta)\Delta G_1 + \delta\Delta G_2}{kT}}$$

Über die Formel 2.7 ergeben sich nun auch die Spannungsabhängigkeiten für $n_\infty(V_M)$ und $\tau(V_M)$. Insbesondere gilt für $n_\infty(V_M)$ damit

$$\begin{aligned}
 n_\infty(V_M) &= \frac{\alpha(V_M)}{\alpha(V_M) + \beta(V_M)} \\
 &= \frac{1}{1 + e^{-\frac{V_M - V_{0.5}}{V_g}}}
 \end{aligned} \tag{2.11}$$

Für die K^+ -Kanäle der *Shaker*-Familie gilt $V_g > 0$, d. h. der Spannungssensor trägt eine positive Ladung und öffnet deshalb bei positiven Spannungen $V_M > V_{0.5}$. Bei den Beispielwerten $V_g = 6.6 \text{ mV}$, $V_{0.5} = -25 \text{ mV}$, $\tau_0 = 100 \text{ ms}$ und $\delta = 0.33$ ergeben sich für α , β , n_∞ und τ die in Abbildung 2.8 links skizzierten Kurven. Die unterste Kurve links zeigt den Unterschied im Gatingverhalten einer einzelnen Kanalklappe (n) und des kompletten Ionenkanals (n^4), der sich ja aus 4 Klappen zusammensetzt. Die Spannung $V_{0.5}$ verschiebt sich zu $V_{0.5} + 1.665 V_g$ und die Gatingsspannung V_g verkleinert sich auf $0.786 V_g$. Natürlich ist die Kurve n_∞^4 keine exakte Boltzmann-Kurve wie n_∞ .

Nun lassen sich aus den spannungsabhängigen Werten für n_∞ und τ nach den Formeln 2.6, 2.8 und 2.9 aus den depolarisierenden Spannungspulsen $V_M(t)$ die Kurven für $n(t)$, $g(t)$ und $I_M(t)$ berechnen. In Abbildung 2.8 rechts sind von unten nach oben die Kurvenscharen aufgetragen für Spannungsstufen von -60 mV auf bis zu $+80 \text{ mV}$ und zurück auf -60 mV (K^+ -Umkehrpotential $V_K = -80 \text{ mV}$, Leitfähigkeit der Membran $G_0 = 100 \text{ nS}$).

2.2.3 Ratenkonstanten für reale K^+ -Kanäle

Die Ratenkonstanten $\alpha(V)$ und $\beta(V)$ für das Doppelminimumpotential wachsen exponentiell mit der Spannung. In Messungen für K^+ -Kanäle zeigt sich aber, dass der Anstieg von α nahezu linear mit der Spannung verläuft. Der Anstieg von β für negative Spannungen verläuft – wie im einfachen Modell – anfangs exponentiell (bei hohen negativen Spannungen aber nicht mehr).

Die Abweichungen vom exponentiellen Anstieg lassen sich durch Zwischenzustände im Aktivierungspfad des Kanals erklären [Goy02]. Im von Schoppa und Sigworth aufgestellten Übergangsschema [Sch98a, Sch98c] für den Kanal *Shaker* 29-4 (Abschnitt 2.2.5) wird dies deutlich: die Übergangsraten zwischen den Unterzuständen weisen eine exponentielle Spannungsabhängigkeit auf, der gesamte Kanal öffnet mit linear wachsender Rate.

Weil der Kanal beim Sprung zurück auf negative Spannungen schon beim ersten Übergang nach dem offenen Zustand wieder schließt, behält die Rate für die Deaktivierung den exponentiellen Verlauf.

Will man die Modellierung eines komplizierten Übergangsschemas umgehen, hilft die von Hodgkin und Huxley [Hod52] angewandte Methode: Es werden für jede der vier Kanalklappen wie oben geschildert nur zwei Zustände angenommen – ein geschlossener und ein offener. Um die bei höheren Spannungen linear wachsende Rate für die Aktivierung zu modellieren, wird eine Funktion für $\alpha(V)$ aufgestellt, welche den gemessenen Verlauf möglichst gut trifft. Von Hodgkin und Huxley wurde die Funktion

$$\alpha_n = 0.01(V + 10) / \left[\exp \frac{V + 10}{10} - 1 \right]$$

ausgewählt. Abweichend von der heute üblichen Notation wurde dabei die Membranspannung V in mV angegeben und das Vorzeichen geändert, sodass durch eine Depolarisation das Membranpotential gesenkt wird, und weiterhin das Ruhepotential der Zelle als Nullpunkt verwendet. Entsprechend wurde auch eine Funktion β_n für die Deaktivierung aufgestellt. Aus Formel 2.7 ergeben sich daraus n_∞ und τ_n .

Im Hodgkin-Huxley-Modell finden sich weiterhin Ratenkonstanten α_h und β_h für die Inaktivierung des Na⁺-Kanals. Sie beschreiben das Schließen des Kanals bei hohen Spannungen durch eine weitere Kanalklappe, welche eine zum Mechanismus der Aktivierung und Deaktivierung entgegengesetzte Spannungsabhängigkeit aufweist: Sie schließt sich bei hohen Spannungen und öffnet bei niedrigen Spannungen.

Im nächsten Abschnitt werden die im Hodgkin-Huxley-Modell verwendeten Ausdrücke angepasst, um das Verhalten des Kanals Kv1.3 zu beschreiben.

2.2.4 Parameterfit für den Kanal Kv1.3

Um für die Simulationen der durchgeführten Messungen eine mathematische Beschreibung des verwendeten K⁺-Kanals Kv1.3 zu haben, wurde das Aktivierungs- und Deaktivierungsverhalten des Kanals ausgemessen. An die erhaltenen Daten wurden Kurven angefitet, die zum Teil den von Hodgkin und Huxley [Hod52] verwendeten Funktionen nachempfunden wurden.

Dies wird in folgenden Schritten durchgeführt:

- Im Voltage-Clamp-Modus wird der Strom gemessen, der während einer Spannungsstufe durch die Patchpipette fließt.
- Kapazitive Artefakte, welche durch die Aufladung der Zellmembran entstehen, werden entfernt. Der Leckstrom durch die Membran wird abgezogen.
- Der verbleibende Strom durch die Kanäle wird durch die gemessene Spannung abzüglich des K⁺-Umkehrpotentials geteilt, um die Leitfähigkeit der Kanäle zu ermitteln.
- Aus den so erhaltenen Kurven werden die Parameter n_∞ und τ gemäß Formel 2.8 berechnet. Zusätzlich wird die Inaktivierung der Kanäle gefittet.
- Für alle Parameter werden Näherungsfunktionen aufgestellt, die für das gesamte relevante Spannungsintervall definiert sind. Die Parameter sind so ausgewählt, dass sie in einem Differentialgleichungssystem verwendet werden können, welches den Zustand der Kanäle für beliebige Spannungsverläufe beschreibt.

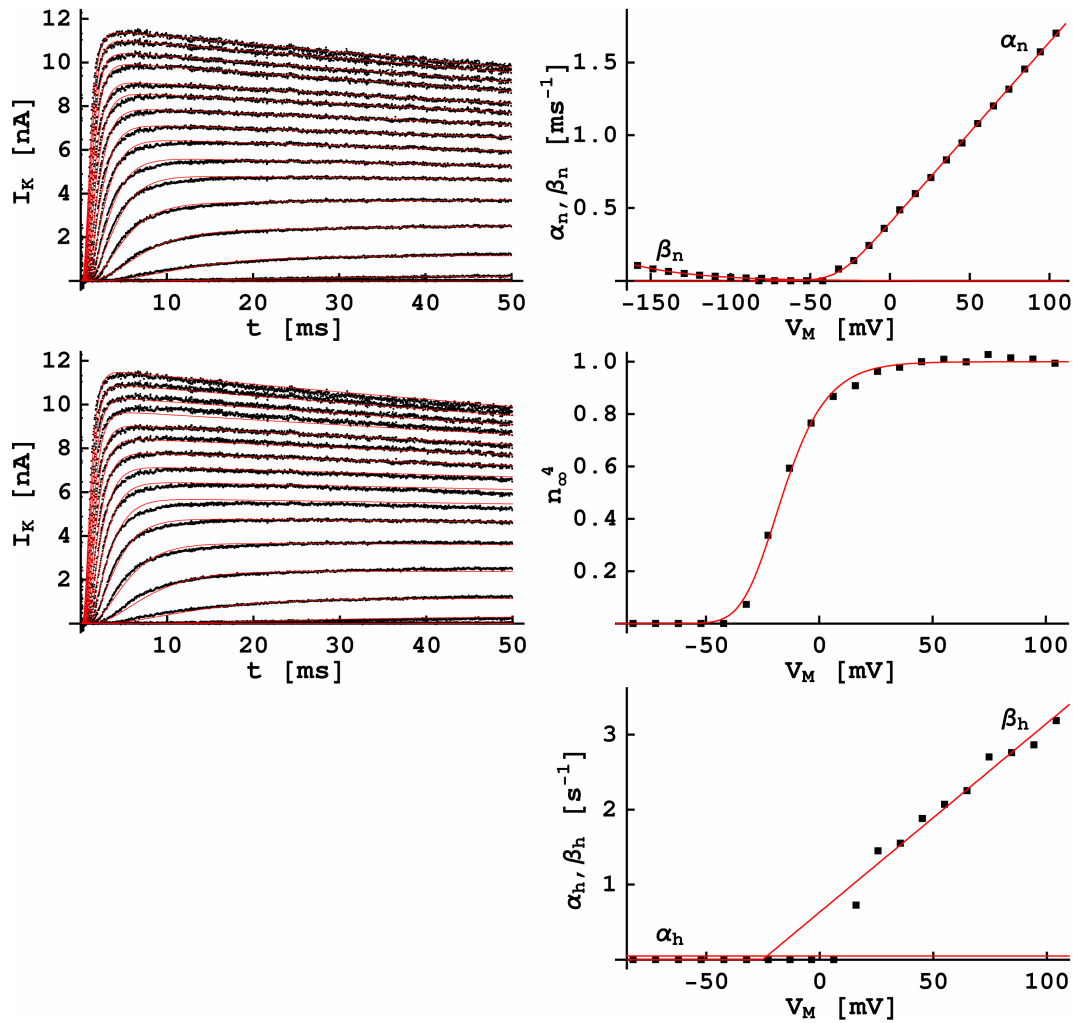


Abbildung 2.9: Rechts: Die Fitparameter α_n , β_n , n_∞^4 , α_h und β_h .
 Links oben: Kurven einzeln an die Messdaten gefittet.
 Links unten: Fitparameter gemäß Formel 2.13.

Die Parameter n_∞ und τ lassen sich beim Kanal Kv1.3 nicht gemäß den Formeln 2.7 über Ratenkonstanten α und β zueinander in Beziehung setzen. Für $n_\infty(V)$ wurde eine Kurve gemäß der Boltzmannverteilung gewählt, welche vom Verlauf von $\frac{\alpha}{\alpha+\beta}$ abweicht.

Die Inaktivierung des Kv1.3-Kanals wurde durch α_h und β_h beschrieben. Die Daten für α_h wurden durch eine Gerade genähert. Da für die Bestimmung von β_h ausführlichere Messungen nötig gewesen wären und der Einfluss auf die Simulationsergebnisse minimal ist, wurde ein konstanter Wert verwendet.

So wurden beispielsweise aus den Rohdaten von Messung 02-08-28-012 (siehe Abbildung 2.9) für das Öffnen der Kanäle und Messung 02-08-27-003 für das Schließen (ohne Abbildung) folgende Differentialgleichungen aufgestellt:

$$\begin{aligned}
 \frac{dn}{dt} &= \frac{n_\infty - n}{\tau_n} \\
 \frac{dh}{dt} &= \alpha_h \cdot (1 - h) - \beta_h \cdot h
 \end{aligned} \tag{2.12}$$

$$g = g_0 \cdot n^4 \cdot h$$

mit (Spannung V_M in V, Raten in s^{-1}):

$$\begin{aligned} n_\infty &= \frac{1}{1 + e^{-83(V_M + 0.036)}} \\ \tau_n &= \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \\ \alpha_n &= \frac{12400 (V_M + 0.032)}{1 - e^{-\frac{V_M + 0.032}{0.0052}}} \\ \beta_n &= 2.0 \cdot e^{-25V_M} \\ \alpha_h &= 0.05 \\ \beta_h &= \max(0, 25V_M + 0.64) \end{aligned} \tag{2.13}$$

In Abbildung 2.9 links oben sind die gemäß Formel 2.12 an die Messdaten angefitzten Kurven dargestellt. Hierbei sind die Parameterwerte einzeln an jede Kurve einzeln angepasst. Die so erhaltenen Parameter sind in Abbildung 2.9 rechts als Messpunkte zu sehen. Die Werte für α_n , n_∞^4 stammen aus der Messung für Öffnen und Inaktivierung der Kanäle und β_n aus der Messung für das Schließen der Kanäle. Durch die so gewonnenen Datenpunkte wurden Kurven gelegt, um die Parameter mit einer einfachen Funktion zu beschreiben. Das Ergebnis sind die durchgezogenen Linien in Abbildung 2.9 rechts entsprechend den Formeln 2.13. Rechnet man damit die Differentialgleichungen 2.12 aus, erhält man die in Abbildung 2.9 links unten gezeichneten durchgezogenen Linien (als Vergleich sind hier auch wieder die Messdaten mit eingezeichnet).

Für die Berechnung des Verhaltens des Zelle-Chip-Systems während eines Spannungspulses am Chip wurden diese Differentialgleichungen für die Beschreibung der Kanäle verwendet.

2.2.5 Modell für den K⁺-Kanal *Shaker* 29-4

Um das Verhalten von Kanälen bei sich schnell ändernden Spannungen über die Membran zu berechnen (wie die periodischen Stimulationsspannungen in Kapitel 5), ist ein detailliertes Übergangsschema für den betrachteten Kanal notwendig. Dieses lässt sich nicht allein durch Patch-Clamp-Messungen der Membranleitfähigkeit im whole-cell-Modus bestimmen. In der Arbeit von Schoppa und Sigworth [Sch98a, Sch98c] wurden whole-cell-, gating-current- und single-channel-Messungen kombiniert, um ein Übergangsschema für den Kanal *Shaker* 29-4 zu erhalten.

Das genetische Material des zugrunde liegenden K⁺-Kanals vom *Shaker*-Locus der Fliege *Drosophila* wurde von Kamb et al. [Kam88] analysiert und in verschiedene Splice-Varianten gegliedert, von denen zwei die Bezeichnungen H4 und H29 erhielten. Iverson und Rudy kombinierten das 3'-Ende von H4 und das 5'-Ende von H29 zum *Shaker* 29-4 Konstrukt und charakterisierten dieses elektrophysiologisch [Ive90]. Schoppa und Sigworth beschrieben 1992 die Entfernung der Inaktivierung des Kanals durch Deletion der Aminosäuren 2 bis 29 [Sch92]. 1998 veröffentlichten sie schließlich das Übergangsschema zu diesem Kanal [Sch98a, Sch98c], welches in Abbildung 2.10 dargestellt ist und im folgenden kurz erklärt wird.

Der Kanal besteht aus vier identischen Untereinheiten, die sich in der Membran aufgrund der enthaltenen Tetramerisierungsdomäne zum funktionellen Kanal zusammenlagern. In

den niedrigeren Zuständen arbeiten die vier Kanalklappen nahezu unabhängig voneinander. Die vier Klappen sind durch $(\dots)_4$ symbolisiert. Jede der Klappen nimmt einen der Unterzustände S_0 bis S_3 an, die mit den spannungsabhängigen Raten a_1 bis a_3 und b_1 bis b_3 ineinander übergehen können. Ein geringes Maß an Kooperativität ist vorhanden, d. h. befinden sich n Klappen in den Zuständen S_1 bis S_3 , so ist der Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ um den Faktor c erleichtert und der Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ um c^{-1} erschwert.

Sobald sich alle vier Klappen im Unterzustand S_3 befinden, können weitere kollektive Übergänge auf dem Aktivierungspfad stattfinden. Um den offenen Zustand O_{N-1} zu erreichen, muss ein weiterer geschlossener Zustand C_{N-1} durchlaufen werden. Ist der Kanal geöffnet, so ist Inaktivierung in die drei Zustände C_{iN} , C_{f1} und C_{f2} möglich. Die entsprechenden Übergangsraten lassen sich aus Abbildung 2.10 erkennen. Sie lassen sich aus den in Tabelle 2.1 angegebenen Konstanten berechnen. Für jede Rate sind die zwischen den entsprechenden Übergängen transportierte Teilladung $q\alpha_i$ und die Rate $\alpha_i(0)$ bei einer Membranspannung von $V_M = 0$ mV angegeben. Daraus berechnet sich die Rate $\alpha_i(V)$ über die Formel

$$\alpha_i(V) = \alpha_i(0) \cdot \exp\left(\frac{q\alpha_i \cdot V}{k_B T}\right)$$

Aus dem Übergangsschema und den Ratenkonstanten lässt sich das entsprechende Differentialgleichungssystem aufstellen. Um ein System aus linearen Differentialgleichungen 1. Ordnung zu erhalten, müssen aus den vier Kanalklappen in den vier Unterzuständen S_0 bis S_3 insgesamt 35 Kombinationen gebildet werden, welche mit den fünf Zuständen nahe dem offenen Zustand ein äquivalentes Übergangsschema mit 40 Zuständen ergeben. Aus diesem lässt sich eine 40x40-Übergangsmatrix aufstellen, deren Elemente aus den spannungsabhängigen Ratenkonstanten berechnet werden. Die Übergangsmatrix $\mathbf{A}(V)$ ersetzt die Ratenkonstanten α und β der Differentialgleichung 2.5 für das Doppelminimumpotential, und man erhält das Differentialgleichungssystem

$$\frac{dy}{dt} = \mathbf{A} \cdot y \tag{2.14}$$

für den Vektor $y(t)$, welcher die Besetzungswahrscheinlichkeiten der 40 Zustände zum Zeitpunkt t enthält. Aus der Lösung der Differentialgleichung kann man die Gatingkurve

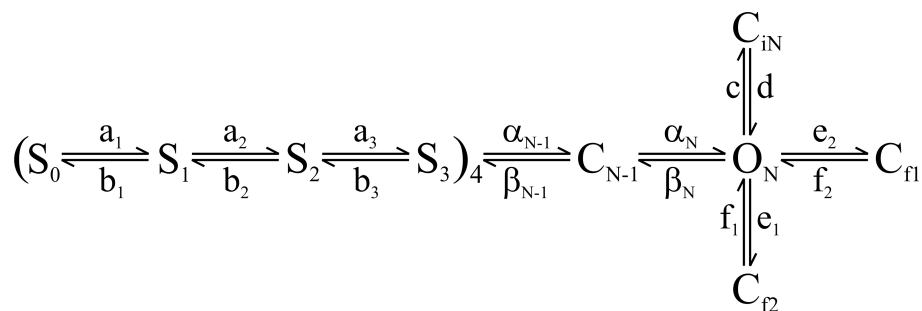


Abbildung 2.10: Übergangsschema für den K^+ -Kanal Shaker 29-4 mit entfernter Inaktivierung nach [Sch98a, Sch98c].

Teilladung in e_0	Rate in s ⁻¹ bei $V_M = 0$ mV
Für die Übergänge $S_0 \leftrightarrow S_1$,	
$S_1 \leftrightarrow S_2$ und $S_2 \leftrightarrow S_3$:	
$qa_1 = 0.47$	$a_1(0) = 1650 \quad (c = 1.3)$
$qb_1 = -0.52$	$b_1(0) = 450 \quad (1/c)$
$qa_2 = 0.08$	$a_2(0) = 4900$
$qb_2 = -0.52$	$b_2(0) = 960$
$qa_3 = 0.08$	$a_3(0) = 7920$
$qb_3 = -0.52$	$b_3(0) = 1560$
Für die Übergänge nahe dem offenen Zustand:	
$q\alpha_{N-1} = 0.75$	$\alpha_{N-1}(0) = 7000$
$q\beta_{N-1} = -0.30$	$\beta_{N-1}(0) = 340$
$q\alpha_N = 0.18$	$\alpha_N(0) = 7000$
$q\beta_N = -0.52$	$\beta_N(0) = 240$
$qc = 0.2$	$c(0) = 7$
$qd = 0.0$	$d(0) = 600$
$qe_1 = 0.0$	$e_1(0) = 230$
$qf_1 = 0.20$	$f_1(0) = 3500$
$qe_2 = 0.0$	$e_2(0) = 600$
$qf_2 = 0.0$	$f_2(0) = 7000$

Tabelle 2.1: Die Raten im Übergangsschema für den K⁺-Kanal Shaker 29-4 (aus [Sch98c]).

und die Zeitkonstanten für das Öffnen der Kanäle bestimmen. Dazu wird eine Funktion der Form

$$n(t) = n_\infty \left(1 - e^{-t/\tau}\right)^4 \quad (2.15)$$

an das Ergebnis angefitet.

Die daraus resultierenden Werte für n und τ sind in Abbildung 2.11 dargestellt.

Die Differentialgleichungen wurden für Membranspannungen von -100 mV bis $+100$ mV gelöst. Links oben ist ein Beispiel für den Parameterfit an die Lösung für die Membranspannung $V_M = 50$ mV zu sehen. Der simulierte Verlauf von $n(t)$ steigt wesentlich später als der Fit an, was auf die Verzögerung des Öffnens durch das sukzessive Durchlaufen der Unterzustände S_0 bis S_3 zurückzuführen ist.

Die Differentialgleichungen für den Kanal Shaker 29-4 wurden in Kapitel 5 zur Simulation des Öffnens von Ionenkanälen mittels periodischer Stimulation verwendet.

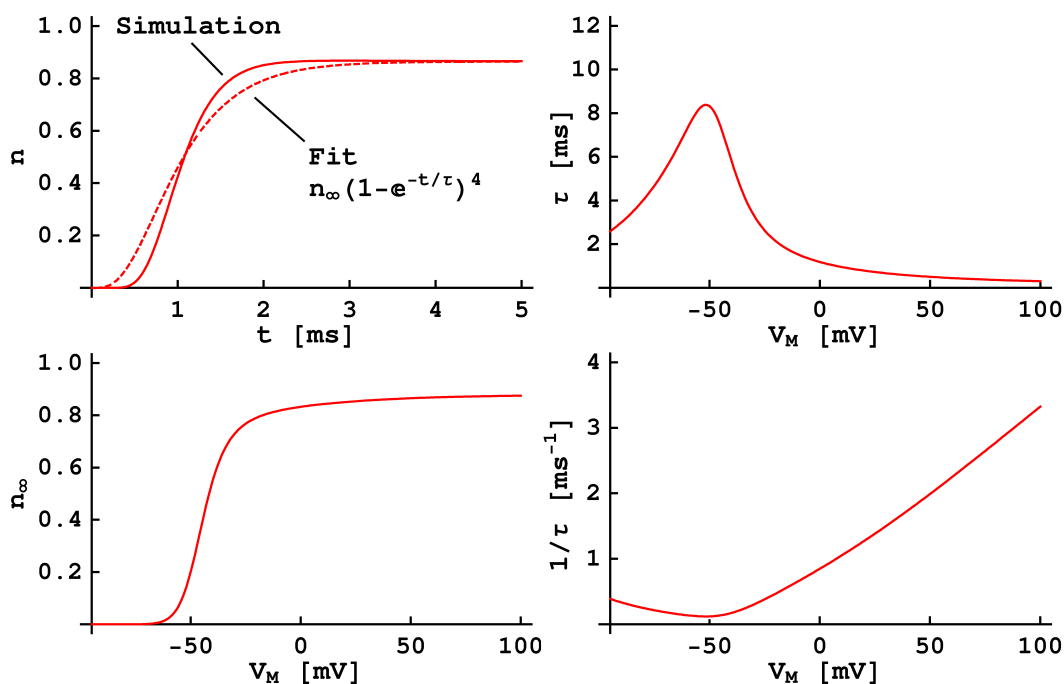


Abbildung 2.11: An das simulierte K^+ -Kanalmmodell wurden die Parameter n_∞ und τ angefitet (Beispiel hierfür links oben). Der Verlauf der inversen Zeitkonstanten $1/\tau$ verläuft bei Spannungen > -30 mV nahezu linear mit der Spannung

2.3 Eingesetzte Werte

Für die durchgeführten Simulationen wurden folgende Werte verwendet:

c_{JM}	$1.0 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$	A_J	$500 - 1000 \mu\text{m}^2$
c_{FM}	$1.0 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$	$\beta = A_J/A_F$	$0.5 - 1.0$
c_{OX}	$0.3 - 2.0 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$	d_J	$40 - 80 \text{ nm}$
c_{out}^K	5.4 mM	c_{in}^K	140 mM
c_{out}^{Na}	$4.0 - 135 \text{ mM}$	c_{in}^{Na}	1.0 mM
c_{out}^{Cl}	$9.4 - 140.4 \text{ mM}$	c_{in}^{Cl}	141 mM
g_{FM}^K (Kanäle)	$2.0 - 20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$	g_{JM}^K (Kanäle)	$2.0 - 20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$
g_{FM}^K (Leck)	$0 - 0.5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$	g_{JM}^K (Leck)	$0 - 0.5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$
g_{FM}^{Na}	$0 - 0.5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$	g_{JM}^{Na}	$0 - 0.5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$
g_{FM}^{Cl}	$0 - 0.5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$	g_{JM}^{Cl}	$0 - 0.5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$
D^K	$1.96 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$	D^{Na}	$1.33 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$
D^{Cl}	$2.03 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$		

Kapitel 3

Die Messapparatur

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Komponenten des Messsystems vorgestellt. Ein Schema des Messaufbaus zeigt Abbildung 3.1. Die Steuerung des Systems erfolgt über einen gewöhnlichen PC. Die Synchronisation des Funktionsgenerators und des Patch-Clamp-Verstärkers erfolgte über die Messkarte des PC. Nicht eingezeichnet sind der Mikromanipulator zum Patchen der Zellen und das Mikroskop. Im folgenden wird auf den Messchip, die HEK293-Zellen und die Funktionsweise des Patch-Clamp-Verstärkers eingegangen.

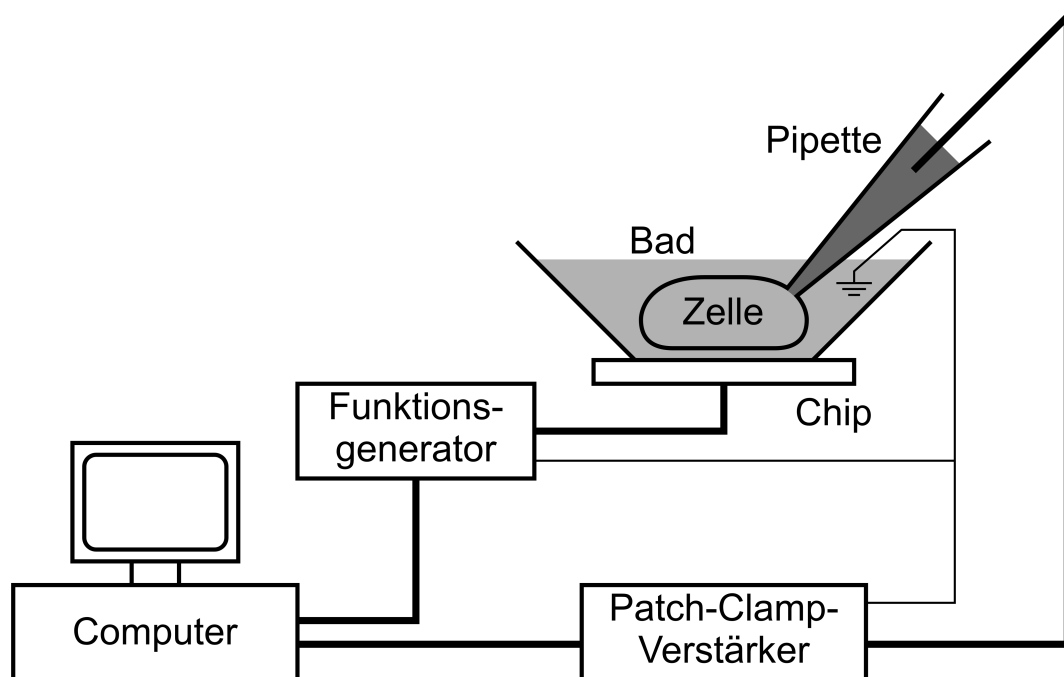


Abbildung 3.1: Der Messaufbau.

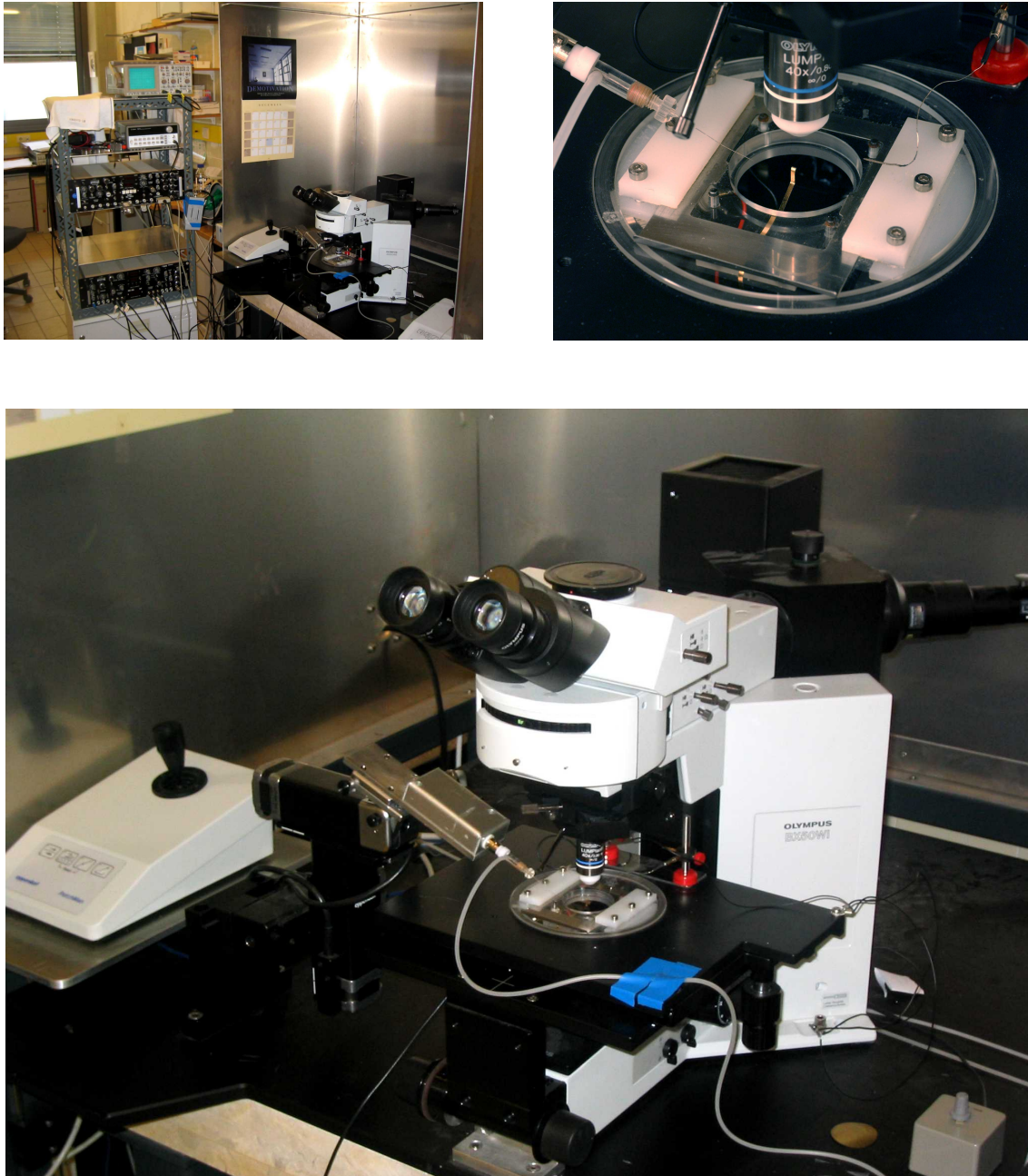


Abbildung 3.2: Fotos vom Messplatz.

Oben links: Das Mikroskop und der Chip werden durch einen geerdeten Metallkäfig vor elektromagnetischen Störungen geschützt. Neben dem Käfig steht das Regal mit Patch-Clamp-Verstärker, Funktionsgenerator und Oszilloskop.

Oben rechts: Der in eine 35 mm-Falcon-Schale eingeklebte Chip (Abbildung 3.4) wird in die Haltevorrichtung eingespannt und mit einer Messingfeder von hinten kontaktiert. Links im Bild ist der Pipettenhalter zu sehen, rechts die Badelektrode.

Unten: Mikroskop mit Headstage und Joystick-Steuerung für den Mikromanipulator. Hinten am Mikroskop ist die Beleuchtung montiert. Vorne rechts im Bild: Abgleichpotentiometer für die Pipettenkapazität.

3.1 Der Stimulationschip

3.1.1 Aufbau

Der Aufbau der für die Messung verwendeten Siliziumchips ist einfach (Abbildung 3.3). Als Substrat wird hochdotiertes, also elektrisch leitendes Silizium verwendet. Darauf befindet sich eine Schicht aus ca. $1\ \mu\text{m}$ dickem Siliziumdioxid. In der Mitte hat dieses ein rundes Loch mit einem Durchmesser von $100\ \mu\text{m}$ bis $2\ \text{mm}$. Über dem gesamten Chip liegt eine weitere Beschichtung aus einem dünnen ($10\text{--}40\ \text{nm}$) Dielektrikum, z.B. TiO_2 . In dem zentralen Spot befindet sich also nur diese Schicht, welche die Kapazität darstellt, über die die Spannungen in den Spalt zwischen Chip und Zelle übertragen werden. Der Durchmesser des Chips beträgt $4\ \text{mm}$. Zur Kontaktierung ist die Rückseite mit Aluminium bedampft ($70\ \text{nm}$).

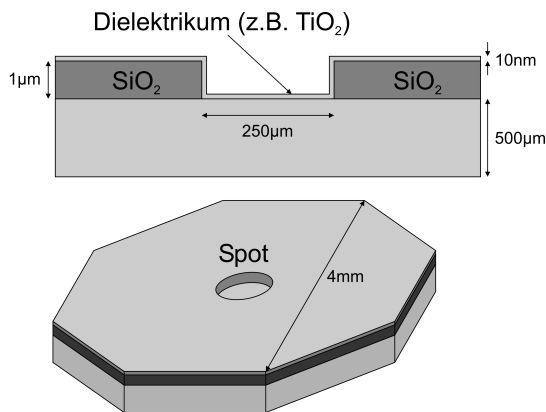


Abbildung 3.3: Der Aufbau des Messchips (nicht maßstabsgetreu). Auf dem Siliziumsubstrat ist eine Schicht aus Siliziumdioxid aufgebracht, in die ein Loch geätzt wurde. Aufdampfen eines dünnen Dielektrikums ergibt im Bereich des Spots eine hohe Kapazität.

Der Umriss des Chips wurde achteckig gewählt, damit dieser sich trotz der geringen Größe von $4\ \text{mm}$ einfach in die Messkammer einkleben lässt.

3.1.2 Herstellungsprozess

Die Herstellung der Messchips konnte zum größten Teil im abteilungseigenen Reinraum vorgenommen werden. Die Beschichtung mit bestimmten Dielektrika ließ sich hier allerdings nicht durchführen. Die Herstellung der Messchips wurde von Frank Wallrapp im Rahmen einer Diplomarbeit [Wal03] durchgeführt. Alle für die in der vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Messchips stammen von den hierbei prozessierten Wafern. Der Herstellungsprozess ist in Tabelle 3.1 tabellarisch zusammengefasst.

Nach dem Zersägen der Wafer wurden die Chips in Aceton vom Photolack gereinigt und mit medizinischem Kleber (MK3, Fa. Sulzer Osypka) in die Schalen eingeklebt. Es wurden $35\ \text{mm}$ -Schalen von Falcon verwendet, in welche ein $4.5\ \text{mm}$ großes abgestuftes Loch gebohrt wurde. Durch dieses Loch wird der Chip bei der Messung von hinten mittels einer vergoldeten Messingfeder kontaktiert. Die Chips vor und nach Einkleben in die Schalen sind in Abbildung 3.4 zu sehen.

KAPITEL 3. DIE MESSAPPARATUR

Schritt	Parameter
Substrat	p-dotiert (Bor), 0.006 – 0.010 Ωcm , 100-Richtung, Fa. WaferNet GmbH
Reinigung	CARO ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1) SC1 ($\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ 1:1:5) HF-Dip (1%) SC2 ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ 1:1:6)
Thermische Oxidation	Centrotherm-Ofen, Programm S-MA 7010, 1100 °C, 6 h, ca. 1000 nm SiO_2
Photolackierung	Beschichten mit HMDS Aufschleudern des Photolackes (Typ 1215, Fa. micro resist) Aushärten des Lacks (30 min, 90 °C) Belichtung (436 nm, 5.5 s, 21 mW/cm ²) Entwicklung (28 s, Entwickler MF84MX der Fa. Megaposit)
Ätzen	Ammoniumfluorid-Ätzmischung mit 12.5% HF, 15 min
Maske entfernen	CARO ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1)
Nitrid	HF-Dip 1% RTP-Ofen, Programm frwnitrid30s, 30s NH_3 -Atmosphäre, 700 °C, ca. 1.3 nm
Titandioxid	10 – 40 nm, durchgeführt bei der Fa. Microchemistry (Finnland) mit Atomic Layer Chemical Vapor Deposition (TM)
Photolackierung	Aufschleudern des Photolackes (Typ 1215, Fa. micro resist) Aushärten des Lacks (30 min, 90 °C)
Ätzen (Rückseite)	1% HF, 1 min
Metallisierung (Rückseite)	Aufdampfen von 200 nm Al, 10^{-5} bar, Anlage Univex 350, Fa. Leybold
Sägen	

Tabelle 3.1: Prozessschritte bei der Herstellung der Messchips.

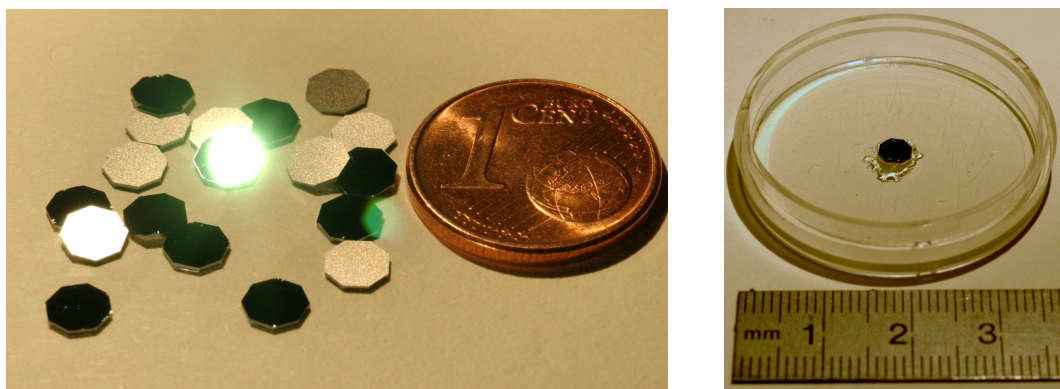


Abbildung 3.4: Die fertigen Chips im Vergleich zu einer 1-Cent-Münze und eingeklebt in die 35 mm-Schalen.

3.1.3 Verschiedene Dielektrika

Die spezifische Kapazität des Messchips im Spotbereich ist abhängig vom Material und der Dicke des verwendeten Dielektrikums. Bei einem gegebenen Zeitverlauf der am Chip angelegten Spannung V_S wird bei einer höheren Kapazität die Spannung im Spalt zwischen Chip und Zelle größer sein. Dementsprechend kann eine bestimmte Spannung im Spalt bei höherer spezifischer Spotkapazität über eine längere Zeitspanne gehalten werden, falls der Spannungshub am Chip auf ein festes Intervall begrenzt ist.

Die Optimierung der verwendeten Beschichtung bezüglich Kapazität und Durchbruchspannung ist also für die Verbesserung der Stimulation sehr wichtig und wurde von Tamara Birkenmaier und Frank Wallrapp in Diplomarbeiten [Bir01, Wal03] durchgeführt. Anfangs wurde als Dielektrikum 10 nm dickes SiO_2 mit einer spezifischen Kapazität von $0.3 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ verwendet. Dies konnte um den Faktor 5 auf mittlerweile $1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ bei Verwendung von 20 nm TiO_2 mit einer Si_3N_4 -Zwischenschicht erhöht werden.

Die Schichten aus TiO_2 wurden von der Firma ASM Microchemistry in Espoo (Finnland) im ALCVDTM-Verfahren hergestellt (Atomic Layer Chemical Vapor Deposition, siehe Abbildung 3.5) [Rah02, Nie01]. In diesem Verfahren werden unterschiedliche chemische Verbindungen abwechselnd jeweils in Monolagen abgeschieden, wobei sie erst an der Oberfläche miteinander reagieren. Dadurch bildet sich ein regelmäßiges Kristallgitter, welches durch andere Abscheideverfahren nicht gewährleistet ist. Nähere Informationen zur Herstellung und Charakterisierung der dielektrischen Schichten finden sich in [Wal03].

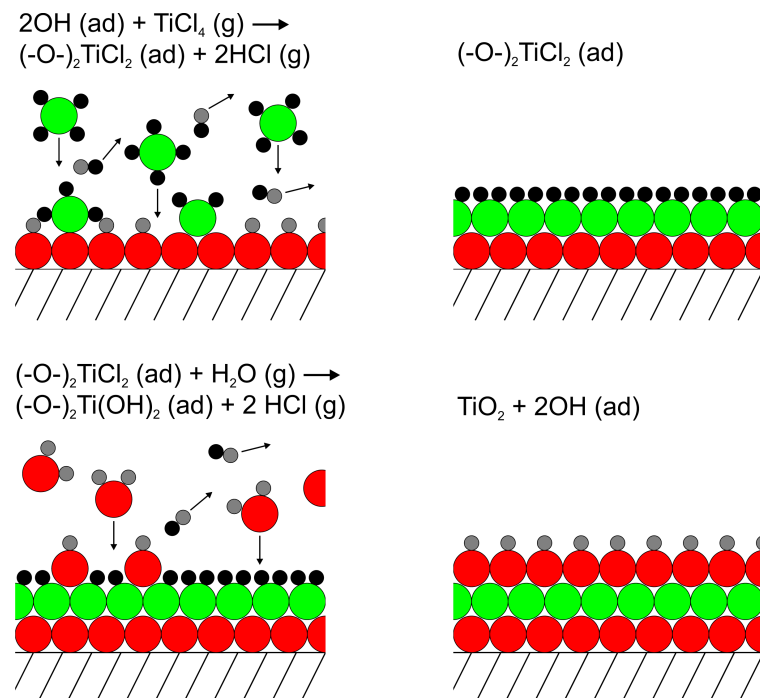


Abbildung 3.5: Aufwachsen von TiO_2 -Schichten durch Atomic Layer Chemical Vapor Deposition (aus [Rah02]). Abwechselnd reagieren TiCl_4 und H_2O an der Oberfläche und bilden ein Gitter aus Titan und Sauerstoff. Ein Zyklus ist hier schematisch dargestellt.

3.1.4 Spannungsabhängige Chipkapazität

Bei der Messung der Kapazitäten der Siliziumchips stellte sich heraus, dass die Kapazität des Spots sich in Abhängigkeit von der angelegten Vorspannung ändert (Abbildung 3.6). Wird an den Chip eine Spannungsrampe angelegt, so überträgt sich dieses spannungsabhängige Verhalten des Oxids auf den durch die Oxidkapazität fließenden Strom und damit auf die Spannung V_J im Spalt. Um die Simulationen entsprechend zu erweitern, muss in den Differentialgleichungen C_{OX} durch $C_{OX}(V_{OX})$ ersetzt werden.

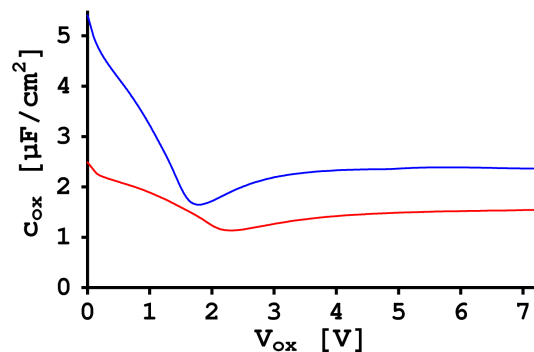


Abbildung 3.6: Die Kapazität des Spotoxids ist abhängig von der anliegenden Vorspannung V_{OX} . Eingezeichnet sind hier die gemessenen Werte der spezifischen Kapazität für einen mit 10 nm (blau) und 20 nm (rot) dickem TiO_2 beschichteten Spot.

Das Absinken der Kapazität bei ungefähr 2 V wird durch die Bildung einer Raumladungszone im Halbleiter verursacht, welche eine zusätzliche Kapazität darstellt und wegen der Reihenschaltung von Isolator und Halbleiter die Gesamtkapazität verringert. In [Sze81] wird das Verhalten eines idealen Metall-Isolator-Halbleiter-Systems mathematisch beschrieben. Setzt man die Werte für die spezifische Kapazität der dielektrischen Schicht und die Dotierkonzentration des Halbleiters ein, ergibt sich die in Abbildung 3.7 gezeigte C-V-Abhängigkeit.

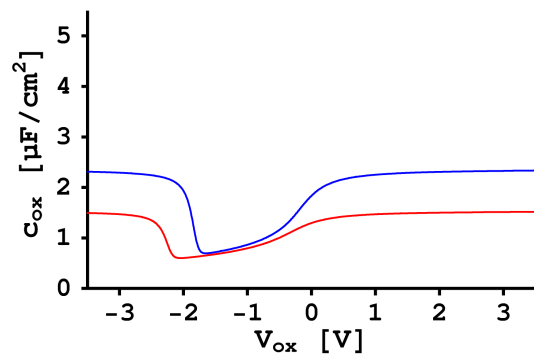


Abbildung 3.7: In [Sze81] wird das Verhalten eines idealen Metall-Isolator-Halbleiter-Systems modelliert. Die gemessenen C-V-Kurven (Abbildung 3.6) sind verschoben und zeigen eine starke Erhöhung der Kapazität bei kleinen Spannungen (siehe Text).

Die Verschiebung der gemessenen und berechneten Kurve entlang der V-Achse lässt sich dadurch erklären, dass in der theoretischen Modellierung eine Flachbandspannung von $V = 0$ angenommen wird, d. h. die Austrittsarbeiten für Metall und Halbleiter und damit ihre Fermi-Niveaus sind gleich.

Die Kurve muss um den Wert der Flachbandspannung verschoben werden, falls diese $\neq 0$ ist. Damit ändert sich die Bandverbiegung im Halbleiter und auch die Kapazität der Raumladungszone. Weiterhin ist in den gemessenen C-V-Kurven ein starker Anstieg der spezifischen Kapazität bei niedrigen Spannungen zu sehen, welcher in den modellierten Kurven nicht auftritt. Dessen Ursache ist noch nicht geklärt, eine mögliche Erklärung ist aber eine Erhöhung der Kapazität des Dielektrikums durch Na^+ -Ionen, die in das TiO_2

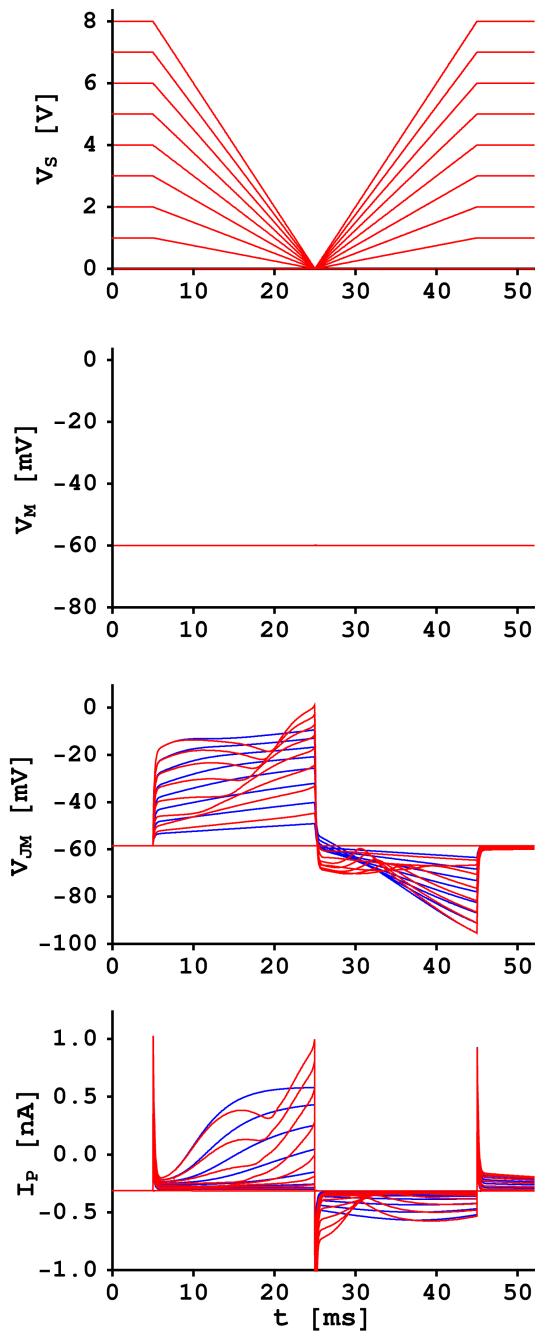


Abbildung 3.8: Simulation einer Messung ohne (blau) und mit (rot) Spannungsabhängigkeit der Spotkapazität.

Die Spannung V_S am Chip enthält eine Spannungsrampe. Die Spannung V_M in der Zelle wird konstant gehalten. Die Spannung am Chip erzeugt eine Spannung V_{JM} über die untere Zellmembran. Dadurch öffnen die Kanäle in der unteren Membran und es fließt ein Strom I_P . Eine ausführliche Darstellung erfolgt in Kapitel 4.

Bei hohen Steigungen $\frac{dV_S}{dt}$ der Spannung am Chip weichen die simulierten Kurven mit und ohne Berücksichtigung der spannungsabhängigen Spotkapazität stark voneinander ab.

eindiffundieren. Eine weitere Rolle spielt möglicherweise die Bildung einer Raumladungszone im Elektrolyten.

Abbildung 3.8 zeigt eine Simulation einer Messung mit konstanter (blau) und spannungsabhängiger (rot) Spotkapazität. Oben sind die Stimulationsspannung am Chip V_S und die Membranspannung V_M zu sehen. Darunter sieht man in der Spannung V_{JM} über die untere Membran und im Pipettenstrom I_P die Auswirkungen der spannungsabhängigen Chipkapazität.

3.1.5 Rauschen und Leckströme

Rauschen

Bei den Messungen mit TiO_2 -beschichteten Chips fällt auf, dass im gemessenen Pipettenstrom ein starkes Rauschen auftritt.

Es äußert sich in kurzen, starke Stromstößen. Die Höhe und Frequenz der Stromstöße korreliert mit der am Chip angelegten Spannung. Außerdem erhöht sich die Frequenz der Stromstöße stark bei schnellen Spannungsänderungen am Chip. Bei Chips mit SiO_2 als Dielektrikum konnte diese Art von Störung nicht beobachtet werden.

In Abbildung 3.9 sind Messungen mit unterschiedlichen Chips dargestellt. Die Amplitude der Störungen bei den von Tamara Birkenmaier hergestellten Chips beträgt etwa 1 nA (links). Am Chip wurde eine Spannung von $V_S = 0 \dots 6 \text{ V}$ angelegt. Das Dielektrikum bestand aus 20 nm TiO_2 mit einer darunter liegenden dünnen SiO_2 -Schicht. Im Chip, welcher von Frank Wallrapp hergestellt wurde (rechts), beträgt die Amplitude der Störung etwa 3 nA bei Spannungen von bis zu 7 V. Der Chip ist ebenfalls mit einer 20 nm dicken TiO_2 -Schicht versehen, allerdings mit einem Zwischenlayer aus Si_3N_4 .

Bei höherer Zeitauflösung (Abbildung 3.10) sieht man, dass die Störung aus kurzen Peaks besteht, die vom Patch-Clamp-Verstärker nicht weiter aufgelöst werden können. Sie treten in beinahe regelmäßigen Abständen auf. Kurze Stromstöße durch das Oxid bewirken Spannungsspitzen im Spalt, deren 1. Ableitung durch die kapazitive Kopplung über die Zellmembran im Pipettenstrom gemessen werden. Während der abfallenden Flanke der

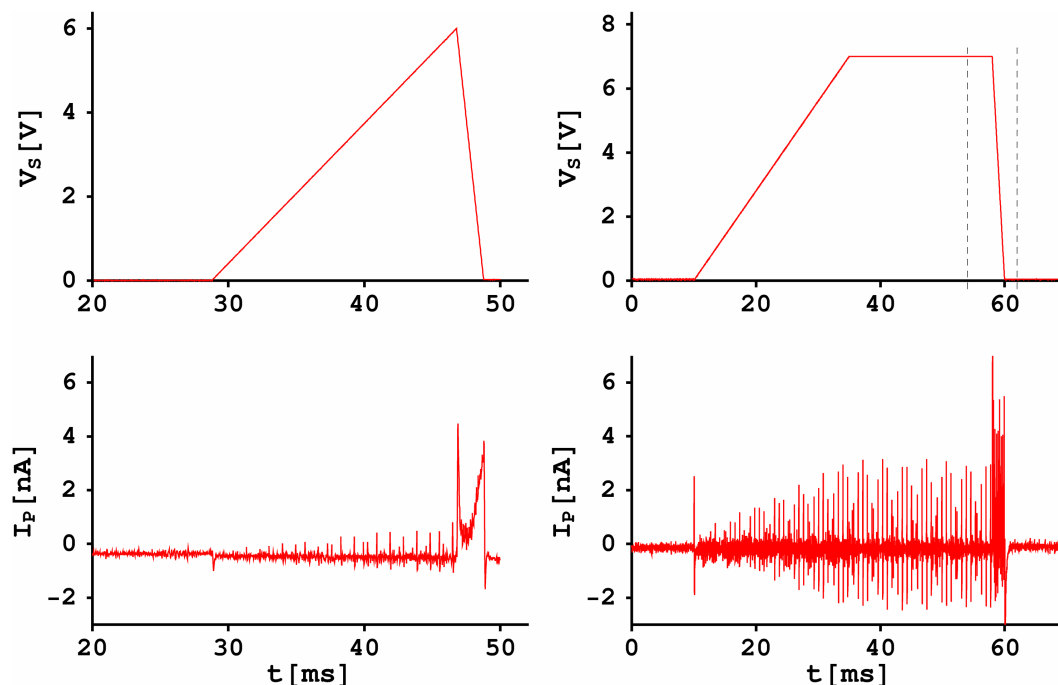


Abbildung 3.9: Bei TiO_2 -beschichteten Chips wird beim Anlegen einer positiven Spannung (oben) am Chip ein Rauschen im Pipettenstrom I_P (unten) beobachtet. Links der Chip von Tamara Birkenmaier, rechts der Chip von Frank Wallrapp. Der Bereich innerhalb der gestrichelten Linien wird in Abbildung 3.10 vergrößert dargestellt.

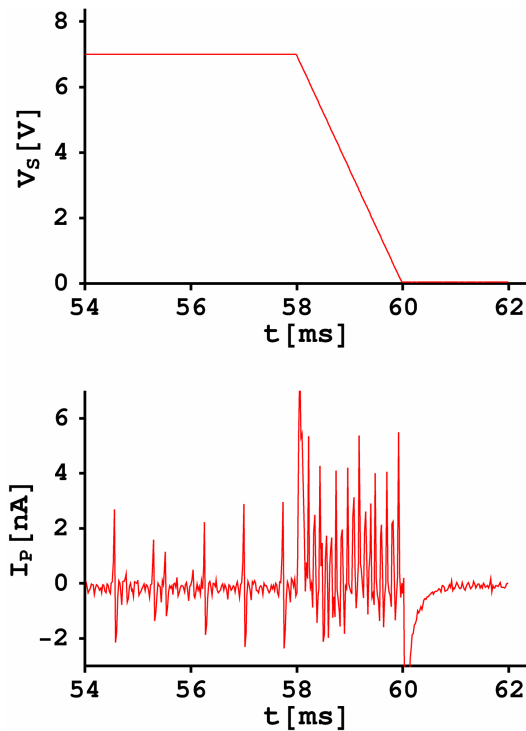


Abbildung 3.10: Die Form der Störung in den gemessenen Membranströmen lässt darauf schließen, dass sie durch kurze Stromstöße durch das Oxid entsteht. Bei einer schnellen Spannungsänderung wächst die Frequenz der Störung stark an.

Spannung am Chip erhöht sich die Frequenz der Störung, so dass nur mit entsprechender Filterung eine sinnvolle Messung des Kaliumstromes durch die Membran durchgeführt werden kann.

Leckströme

Die Beobachtung des Rauschens während der Messung führt zu der Vermutung, dass das Dielektrikum nicht völlig dicht ist und geringe Leckströme fließen. Mit einem sensiblen Messgerät können die Leckströme bestimmt werden.

Abbildung 3.11 zeigt die Leckströme von vier verschiedenen Chips mit unterschiedlichen Dielektrika. Es wurden Chips mit einem Spotdurchmesser von $250\ \mu\text{m}$ und $1\ \text{mm}$ (lila Kurve, Strom normiert auf $\varnothing 250\ \mu\text{m}$) verwendet. Der Leckstrom I_{OX} und die spezifische Leckleitfähigkeit g_{OX} wurden über die am Chip angelegte Spannung aufgetragen. Die Schichten, welche SiO_2 enthalten, zeigen deutlich geringere Leckströme. Im gesamten Bereich liegt der Leckstrom des Chips mit $40\ \text{nm}\ \text{SiO}_2$ eine Größenordnung unter den anderen Strömen, für $V_S < 4\ \text{V}$ sogar um 3 Größenordnungen. Die Ströme beim Chip mit $2\ \text{nm}\ \text{Si}_3\text{N}_4$ und $10\ \text{nm}\ \text{TiO}_2$ steigen ab $2.5\ \text{V}$ so stark an, dass der Messbereich überschritten wurde. Für die Messungen wurden Chips mit $20\ \text{nm}$ und $40\ \text{nm}\ \text{TiO}_2$ verwendet.

Im Vergleich zu den Leitfähigkeiten vom Spalt zwischen Chip und Zelle und von der Zellmembran (beide etwa $10\ \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$) sind die Leckleitfähigkeiten der Dielektrika um mindestens 4 Größenordnungen kleiner. Sie werden im elektrischen Modell für das System Chip-Zelle deshalb nicht berücksichtigt.

Der physikalische Mechanismus, durch den die Leckströme entstehen und der (wahrscheinlich) für die spezielle Form der oben behandelten Störungen verantwortlich ist, wurde nicht untersucht.

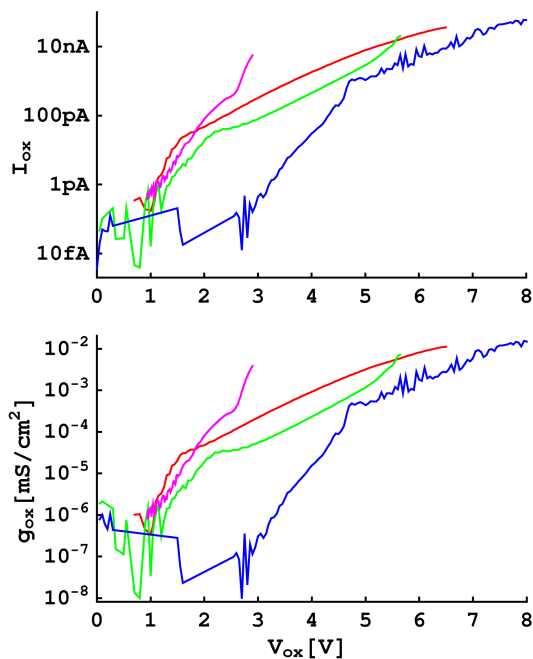


Abbildung 3.11: Die Leckströme durch das Dielektrikum können mittels eines sensiblen Messgerätes bestimmt werden. Die gemessenen Ströme wurden auf Chips mit $250 \mu\text{m}$ Spotdurchmesser normiert.

Dielektrika der gemessenen Chips:
 12 nm SiO_2 (blau)
 2 nm SiO_2 + 10 nm TiO_2 (grün)
 2 nm Si_3N_4 + 40 nm TiO_2 (rot)
 2 nm Si_3N_4 + 10 nm TiO_2 (lila)

3.1.6 Zersetzung der Chips durch die Zellkultur

Werden die Chips häufig für Experimente benutzt, so zeigen sich nach etwa 20 Zyklen (Reinigung–Zellkultur–Experiment) Abnutzungserscheinungen, vor allem bei Verwendung von TiO_2 als Dielektrikum.

Abbildung 3.12 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von zwei Chips, welche unterschiedlich oft benutzt wurden. Beide waren mit 2 nm SiO_2 und 10 nm TiO_2 beschichtet.

Die obere Bilderreihe stammt von einem Chip zu Beginn des Zerstörungsprozesses. Die Schleifspuren in der Aufnahme mit der kleinsten Vergrößerung lassen vermuten, dass die Veränderung der Oberfläche durch mechanische Belastungen bei der Reinigung (Wischen mit einem Tuch) ausgelöst oder wenigsten beschleunigt wird. Die Poren von etwa 300 nm Durchmesser entstehen aber wahrscheinlich durch chemische Prozesse.

Die unteren Bilder zeigen einen Chip, welcher nach Erreichen des oberen Zustandes noch weitere 5 Mal gereinigt und mit Zellen kultiviert wurde. Die dielektrische Schicht ist beinahe vollständig verschwunden, und das blanke Silizium kommt zum Vorschein. Am Rand des Bildes ist zu sehen, dass auch auf dem Schutzoxid um den Reizspot herum die dünne dielektrische Schicht durch die mechanische Reinigung zerstört worden ist.

3.2 HEK293-Zellen

Alle Messungen wurden an Zellen einer Zelllinie durchgeführt, welche die Bezeichnung HEK293 trägt. Die Erzeugung dieser Zelllinie wurde erstmals 1977 durch Transfektion von menschlichen embryonalen Nierenzellen (deshalb HEK von *Human Embryonic Kidney*) mit einem Adenovirus Typ 5 durchgeführt [Gra77, Har77]. Dieser Adenovirus codiert Onkoproteine, welche eine kontinuierliche Zellteilung bewirken. Wird die DNA des Adenovirus fest in das Zellgenom eingebaut, kann das Wachstum der Zellen nahezu unbegrenzt weitergeführt werden.

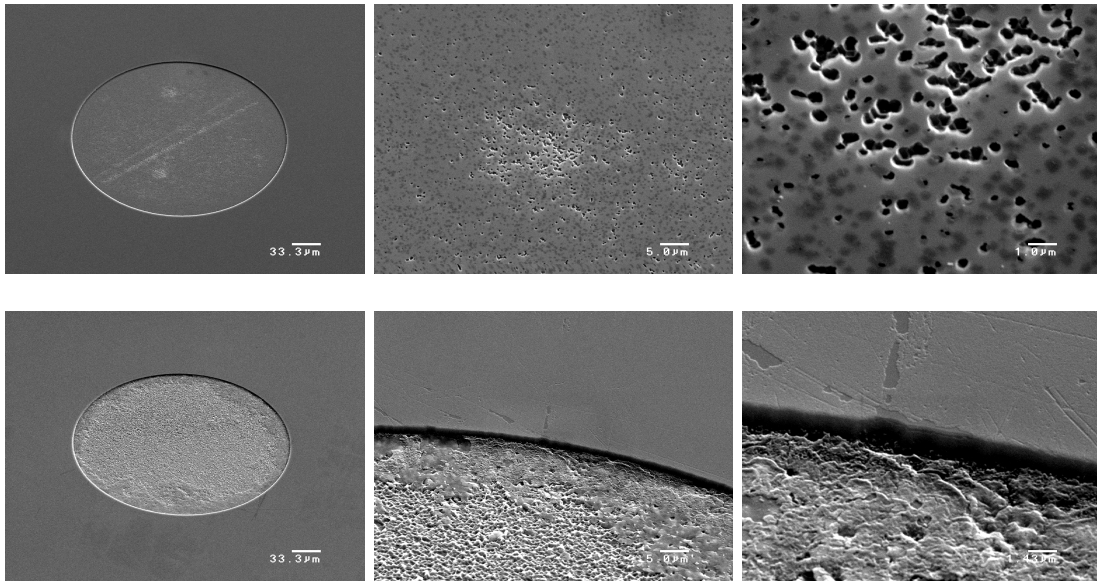


Abbildung 3.12: Zerstörung der Chips durch Reinigung und Kultivierung mit Zellen.

Oben: Die sichtbare Veränderung der dielektrischen Schicht beginnt nach etwa 20 Zyklen Reinigung–Zellkultur–Experiment.

Unten: Nach weiteren 5 Zyklen ist die Schicht im Spotbereich vollkommen zerstört und beginnt sich im Bereich des Schutzoxids zu zersetzen.

3.2.1 Kultur auf Chips

Die Kultivierung der HEK293-Zellen ist sehr einfach; die Zellen müssen bei 5% CO₂ und 37°C *2times* pro Woche in frische Kulturschälchen umgesetzt werden (Splitting 1:4 bis 1:6). Als Kulturmedium wird DMEM mit 10% FBS (Fetal Bovine Serum) verwendet.

Die HEK293-Zellen benötigen, um an der Oberfläche des Kulturgefäßes zu adhäreren, eine speziell beschaffene Oberfläche. Die Falcon-Kulturschalen werden bereits vorbehandelt geliefert. Das genaue Verfahren der durchgeführten Oberflächenbehandlung ist jedoch nicht bekannt. Um auch auf Glas oder auf den Messchips ein Wachstum zu ermöglichen, müssen diese beschichtet werden. Für die Reinigung und Beschichtung hat sich folgendes Verfahren bewährt:

- Die Chips werden mit 80°C heißer Tickopur-Lösung mithilfe eines kleinen Tuchstückchens gereinigt. Mit reinem Wasser (Millipore) werden diese daraufhin sehr gründlich gespült und danach mit Stickstoff trockengeblasen.
- Die getrockneten Chips werden für 30 Minuten in einer mit HMDS-Dampf gesättigten N₂-Atmosphäre beschichtet (HMDS=Hexamethyldisilazan).
- Zur Sterilisation werden die Chips in der Laminar-Flow-Box 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.
- Ein 5 µl großer Tropfen der Fibronectin-Stammlösung wird in die Mitte der Chips gesetzt und dann mit 200 µl PBS verdünnt. Die Lösung lässt man 2 h bei 4°C einwirken, damit das Fibronectin adsorbiert.
- Die Fibronectin-Lösung wird abgesaugt und die Chips werden 2× mit PBS gespült. Dann wird das Kulturmedium in die Schalen mit den eingeklebten Chips gefüllt und

die HEK293-Zellen werden dazugegeben.

- Nach etwa 18 bis 30 Stunden können die Messungen durchgeführt werden.

3.2.2 Transfektion mit rekombinierter DNA

Die HEK293-Zellen besitzen normalerweise sehr wenige Ionenkanäle in ihrer Zellmembran. Die Ströme durch diese Kanäle werden bei einer Patch-Clamp-Messung im whole-cell-Modus als Leckströme behandelt. Um zusätzliche Ionenkanäle in die Zellmembran zu bringen, wird die DNA in geeigneter Form in die Zelle eingeschleust, damit diese mit der Expression der Kanalproteine beginnt. Dieser Vorgang wird als *Transfektion* bezeichnet.

Es gibt mehrere Transfektionsmethoden:

Die erste ist die *transiente Transfektion*, bei der mittels verschiedener Möglichkeiten die DNA durch die äußere Membran in einige Zellen eindringen kann, dann in den Zellkern wandert und dort die Produktion der Proteine veranlasst.

Die zweite Methode ist die *stabile Transfektion*, die sich von der transienten nur durch die nachfolgende Selektionsprozedur unterscheidet. Nach der transienten Transfektion liegt die eingeschleuste DNA im Zellkern als kleiner (ca. 5000–10000 bp) Plasmidring vor. Nach ein bis zwei Tagen entfernt die Zelle diesen wieder aus dem Kern und beendet damit die Expression des entsprechenden Proteins. Bei wenigen der transfizierten Zellen (< 1%) wird die DNA jedoch in das Erbgut eingebaut und bleibt dort dauerhaft erhalten (bei der Teilung der Zellen wird die eingeschleuste DNA dann ebenfalls verdoppelt). Bringt man zusätzlich zum gewünschten Protein ein zweites für eine Antibiotikaresistenz auf dem Plasmidring unter, so ermöglicht diese den entsprechenden Zellen, in einem mit Antibiotikum versetzten Nährmedium zu überleben. Die übrigen Zellen, die die DNA für die Antibiotikaresistenz und das Kanalprotein nicht in ihr Erbgut eingebaut haben, werden durch das Antibiotikum innerhalb einiger Tage abgetötet. Da die Resistenz und das Zielprotein, d. h. der Kanal, nur gemeinsam in das Erbgut integriert werden, exprimieren alle überlebenden Zellen auch das Kanalprotein.

3.3 Intrazelluläre Messung mit Patch-Clamp

Um die elektrischen Eigenschaften der Zelle bestimmen zu können und für die Kontrolle vom Strom durch oder der Spannung über die Zellmembran muss das Zellinnere kontaktiert werden. Die dafür entwickelte Technik wird als *Patch-Clamp*-Technik bezeichnet. Die elektronische Steuerung übernimmt ein speziell dafür konstruierter Verstärker.

3.3.1 Die Patch-Clamp-Methode

Um die Verbindung zum Zellinneren herzustellen, wird eine Mikroelektrode aus Glas verwendet, deren Inneres mit einem Elektrolyten gefüllt und durch einen chlorierten Silberdraht kontaktiert ist. Der entscheidende Faktor bei der Patch-Clamp-Technik ist die Verwendung einer Pipette mit großer Öffnung (1–10 μm), welche bei Berührung der Zellmembran mit dieser verschmilzt und dadurch einen sehr hohen Widerstand ($> 5 \text{ G}\Omega$, „Gigaseal“) zum umgebenden Bad bildet (Abbildung 3.13). Dies ist auch der Unterschied zum Anstechen der Zelle mit einer feinen Mikropipette von ca. 100 nm Durchmesser, wie sie vor Entwicklung der Patch-Clamp-Technik verwendet wurden (Sealwiderstand $< 100 \text{ M}\Omega$).

Die Patch-Clamp-Methode wurde 1976 von Neher und Sakmann entwickelt, die damit das Öffnen und Schließen einzelner Ionenkanäle beobachtet haben [Neh76]. Dabei arbeiteten sie im *cell-attached*-Modus, d. h. die Pipette sitzt außen an der Zellmembran und misst den Strom durch den Membranfleck, der die Öffnung verschließt. Befindet sich in diesem Flecken nur ein einzelner Ionenkanal, lässt sich direkt beobachten, wie dieser sich öffnet und schließt. Erst später wurde die Technik erweitert, um das Zellinnere zu kontaktieren, indem man durch kurzes, kräftiges Saugen an der Pipette den Membranfleck zerstört und dadurch das Pipetten- mit dem Zellinneren verbindet. Diese sog. *whole-cell*-Konfiguration und zwei weitere Abwandlungen, die *inside-out*- und *outside-out*-Konfigurationen, wurden 1981 von Hamill in [Ham81] beschrieben. Hieraus stammt auch die Abbildung 3.14, welche die vier verschiedenen Konfigurationen illustriert.

Alle in der vorliegenden Arbeit gezeigten Messungen wurden in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt, da sich nur so die Ströme durch die gesamte Zellmembran messen lassen.

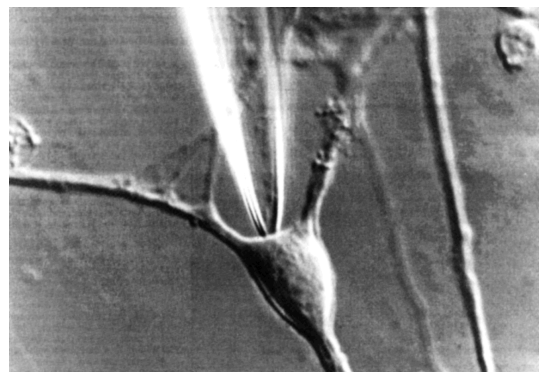
3.3.2 Single Electrode Voltage Clamp (SEVC)

Für die Kontrolle der Spannung im Zellinneren und die Messung des durch die Membran fließenden Stromes wird der Patch-Clamp-Verstärker verwendet. Für eine ausführliche Beschreibung der Technik siehe [SG93].

Das größte Problem bei der Kontrolle der Spannung im Zellinneren ist der Spannungsabfall an der Mikroelektrode, der durch deren Widerstand verursacht wird. Bei typischen Elektrodenwiderständen von ca. $5\text{ M}\Omega$ und einem Stromfluss von 10 nA ergibt sich für den Spannungsabfall an der Pipette ein Wert von 50 mV . Bei einer intrazellulären Spannung von 100 mV wird also ein Wert von 150 mV gemessen, der Fehler beträgt 50% . Mit dem *discontinuous mode* im Single Electrode Voltage Clamp (dSEVC) wurde eine Methode gefunden, mit welcher sich dieser Fehler vermeiden lässt.

Der gesamte Messvorgang wird hierbei abwechselnd mit einer Frequenz im kHz-Bereich, der sog. *switching frequency*, in zwei Phasen aufgeteilt. Ein Zeitschema für den Messvorgang im dSEVC ist in Abbildung 3.15 dargestellt. In der ersten Phase wird ein Strom in die Zelle injiziert, welcher die Membrankapazität auflädt und damit die Spannung in der Zelle verändert. In der zweiten Phase wird kein Strom mehr in die Zelle injiziert, wodurch die Pipette und das Zellinnere auf derselben Spannung liegen, welche dann am Ende der zweiten Phase gemessen wird. Der Strom, welcher in der wieder darauffolgenden Phase 1 in die Zelle injiziert wird, berechnet sich proportional zur Abweichung der gemessenen

Abbildung 3.13: Bei der Patch-Clamp-Methode wird eine Pipette mit großer Öffnung ($1 - 10\ \mu\text{m}$) an die Zelle geführt. Die Zellmembran und die Pipettenöffnung verschmelzen bei der Berührung und bilden einen Giga-seal (aus [Num96]).



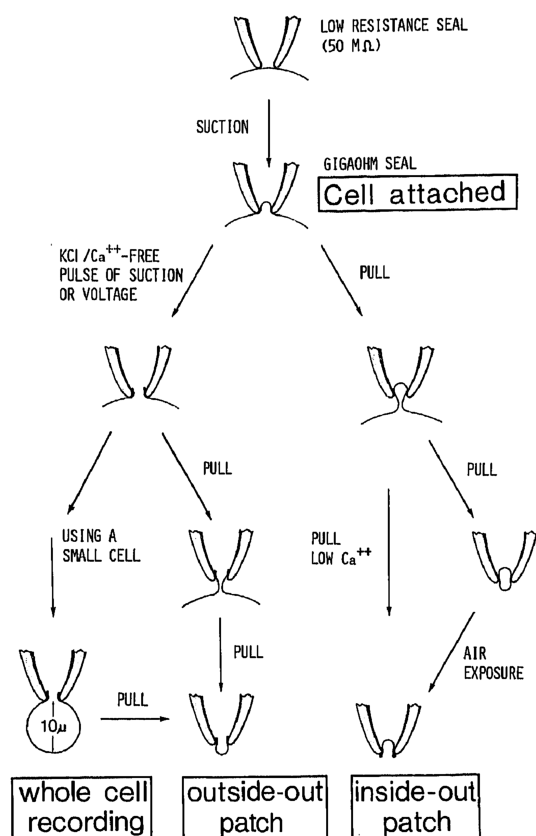


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Verfahren, mit welchen sich die vier verschiedenen Konfigurationen für die Patch-Clamp-Messungen erreichen lassen (aus [Ham81]). Alle in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden in der whole-cell-Konfiguration durchgeführt.

Spannung von der vorgegebenen Sollspannung V_{com} . Im Idealfall erreicht die Spannung im Zellinneren bei einer Änderung der Sollspannung nach wenigen Zyklen ihren neuen Wert. Die switching frequency muss einerseits so hoch gewählt werden, dass die Zelle sich in der Messphase nicht über ihre Membranleitfähigkeit entladen kann, d. h. viel höher als die Zellzeitkonstante $\tau_M = R_M C_M$.

Die Pipette selbst besitzt allerdings eine Kapazität, welche sich während der Injektionsphase auflädt und während der Messphase wieder entlädt. Deshalb muss mit der Spannungsmessung in der zweiten Phase so lange gewartet werden, bis sich die Pipette nahezu vollständig entladen hat, damit die Messung nicht verfälscht wird. Dies bedeutet, die switching frequency darf andererseits nur so hoch gewählt werden, dass die Messphase länger als die Zeitkonstante der Pipette $\tau_P = C_S R_A$ (C_S Streukapazität der Pipette, R_A Accesswiderstand) bleibt.

Diese zwei Bedingungen für die switching frequency $f_{sw} = 1/(2\tau_{sw})$ lauten zusammengefasst:

$$\tau_P < \tau_{sw} \ll \tau_M \tag{3.1}$$

Im Idealfall ist die Zeitkonstante der Zelle τ_M wesentlich höher als die der Pipette τ_P , und die switching frequency lässt sich dann am Verstärker zwischen 1 kHz und 60 kHz einstellen, so dass sie zwischen den beiden Zeitkonstanten liegt.

Falls τ_M viel größer als τ_P ist, ergeben sich hierbei keine Probleme. Die Kapazität der Pipetten beträgt in etwa 15 pF und ihr Widerstand liegt bei 5 MΩ, so dass sich eine Zeitkonstante von 75 μs ergibt. Die spezifische Membrankapazität der Zelle ist $1 \frac{\mu F}{cm^2}$, womit

man bei einer Halbkugel von $15\ \mu\text{m}$ Durchmesser eine Zellkapazität von $21\ \text{pF}$ erhält. Damit zwischen τ_M und τ_P ein Faktor von etwa 10 liegt, muss die Zellzeitkonstante $750\ \mu\text{s}$ betragen. Der Widerstand der gesamten Zellmembran sollte in diesem Fall also einen Wert von $35\ \text{M}\Omega$ nicht unterschreiten. Bei $V_M = 70\ \text{mV}$ (entspricht $V_M - V_K = 150\ \text{mV}$) darf damit ein maximaler Strom von $2\ \text{nA}$ fließen. Überschreitet der Strom diesen Wert, wird die Spannung nicht mehr richtig geklemmt.

Falls die Zellen eine höhere Leitfähigkeit besitzen, muss ein Abgleich der Pipette vorgenommen werden. Dabei wird zu Beginn jeder Phase (Injektion bzw. Messung) zusätzlich zum rechteckigen Strompuls ein kurzer, hoher Strom (d. h. ein Ladungsstoß) in die Pipette injiziert, welcher diese im Idealfall so auflädt, dass während der darauffolgenden Injektionsphase keine Spannungsänderung durch eine weitere Aufladung der Pipettenkapazität erfolgt. Durch diese Kompensation ergibt sich eine Rechteckspannung an der Pipette, d. h. V_{com} wird sehr schnell erreicht. Die Zeitkonstante der Pipette ist scheinbar viel kleiner geworden, und die switching frequency lässt sich wesentlich höher wählen, so dass die schwächere Bedingung

$$\tau_{sw} \ll \tau_M$$

erfüllt wird. Bei einer maximalen switching frequency von $60\ \text{kHz}$ ist $\tau_{sw} = 8.3\ \mu\text{s}$, die Zeitkonstante der Zelle sollte also mehr als $80\ \mu\text{s}$ betragen, was einem Widerstand von $4\ \text{M}\Omega$ entspricht. Dies bedeutet, dass ein Strom von $25\ \text{nA}$ fließen darf.

Allerdings ergibt sich ein Nachteil aus dieser Art der Kapazitätskompensation: Bei einer geringen Änderung der Pipettenkapazität, wie sie z. B. durch Änderungen des Flüssigkeitsstandes im Messschälchen (durch Verdunsten), Druckänderungen in der Pipette oder

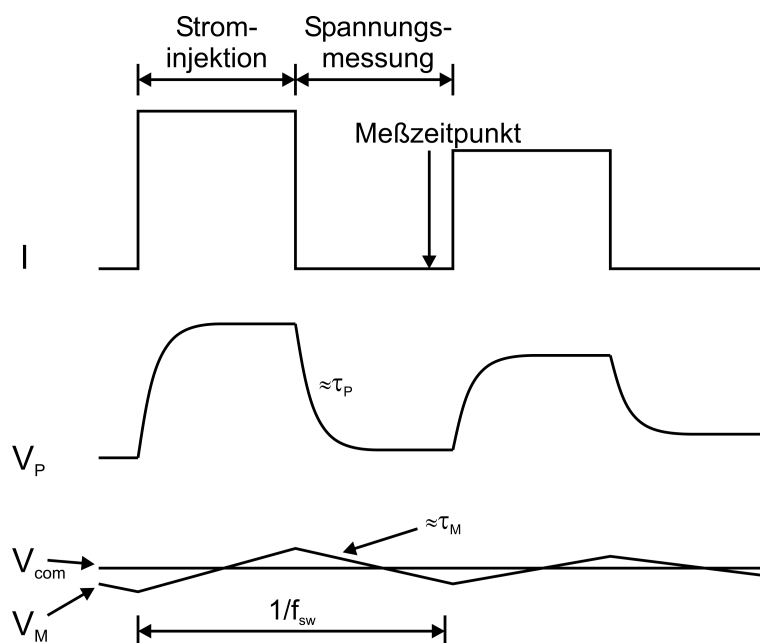


Abbildung 3.15: Im discontinuous Single Electrode Voltage Clamp (dSEVC) wird abwechselnd Strom in die Zelle injiziert und die Spannung im Zellinneren gemessen. Nach der Strominjektion fällt die Spannung V_P an der Pipette mit τ_P ab, danach kann die Spannung gemessen werden. Die Spannung in der Zelle V_M wird in Richtung der Sollspannung V_{com} angehoben und fällt dann langsam mit τ_M ab. Die switching frequency muss so gewählt werden, dass Ungleichung 3.1 erfüllt ist.

Eindringen von Membranstückchen in die Pipettenöffnung hervorgerufen werden kann, ist der Abgleich der Kapazität unvollständig. Dadurch entsteht zum Zeitpunkt der Spannungsmessung ein Spannungsabfall in der Pipette, und die geklemmte Spannung setzt sich aus der Spannung V_M im Zellinneren und dem Spannungsabfall über die Pipette zusammen. Eine Korrektur der Messdaten ist nicht möglich, da ja die nur die Spannung an der Pipette und nicht diejenige in der Zelle gemessen wird. Der Messfehler tritt nur im Strom auf, da dieser sich entsprechend V_M mit verändert. Da gerade der Strom die unbekanntes Messgröße ist, ist eine Korrektur also nicht möglich. Die Messung sollte also in möglichst kurzer Zeit (< 5 Minuten) nach dem Abgleich erfolgen, und man sollte den Stromfluss durch die Zellmembran bei einer bestimmten geklemmten Spannung vor und nach der Messung vergleichen.

Kapitel 4

Öffnen der Kanäle durch die extrazelluläre Spannung

Ziel dieser Arbeit ist es, mit einem geeigneten Spannungspuls am Chip die Kanäle der unteren Zellmembran zu öffnen. In diesem Kapitel wird gezeigt, dass eine Spannungsrampe konstanter Steigung durch die kapazitive Kopplung eine Spannung im Spalt zwischen Chip und Zelle erzeugt und diese die Kanäle der unteren Zellmembran beeinflusst.

Das Prinzip wird in Abschnitt 4.1 anhand des elektrischen Modells Chip–Zelle erläutert. Eine Abschätzung der für das Öffnen der verwendeten K^+ -Kanäle notwendigen Zeitkonstanten ergibt, dass dies nur mit Hilfe einer stark vergrößerten Spotkapazität und verminderter Leitfähigkeit des Badelektrolyten möglich ist.

Dass die Spannung im Spalt sich tatsächlich durch einen entsprechenden Spannungspuls am Chip beeinflussen lässt, kann sowohl mittels optischer Methoden nachgewiesen werden als auch als auch elektrisch über die Messung des Membranstroms im Voltage-Clamp.

Die optische Charakterisierung des Chip–Zelle–Interfaces in Abschnitt 4.2 umfasst neben der Messung der Spannung über die untere Zellmembran mit spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffen noch die Abstandsbestimmung der Zelle vom Substrat mittels FLIC und die Bestimmung der Oberflächengeometrie mittels Konfokalmikroskopie.

Die elektrische Charakterisierung der Kopplung Chip–Zelle geschieht durch die Überlagerung einer intrazellulären und einer extrazellulären Spannung. Die intrazelluläre Spannung öffnet die Ionenkanäle und erlaubt so eine Messung der Spannung im Spalt über den Strom, der durch die offenen Kanäle der unteren Membran fließt (Abschnitt 4.3).

Im letzten Abschnitt 4.4 wird das Öffnen der Kanäle in der unteren Zellmembran direkt gemessen. Dass der beobachtete Strom auf die offenen Kanäle zurückzuführen ist, wird durch die Bestimmung charakteristischer Eigenschaften des Kv1.3-Kanals bestätigt.

4.1 Prinzip des Öffnens

In bisherigen Arbeiten zur kapazitiven Stimulation von Nervenzellen auf Siliziumchips wurden meistens Rechteckpulse am Chip angelegt, da sich bei Invertebratenzellen (Schnecken, Blutegel) dadurch ein Aktionspotential auslösen lässt [Fro95, Ste97]. Solche Rechteckpulse erzeugen im Spalt eine kurze, exponentiell abfallende Spannung, die durch Elektroporation

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

die Membranleitfähigkeit erhöht. Der dabei in die Zelle fließende Strom hebt die intrazelluläre Spannung über die Schwellenspannung zur Auslösung des Aktionspotentials (siehe Einleitung). Das Öffnen der Ionenkanäle wird jedoch nur bei einer länger anhaltenden Spannung einer gewissen Größe im Spalt möglich. Da die Kapazität C_{OX} des Chips und der Widerstand R_J des Elektrolyten im Spalt einen Hochpassfilter bilden, muss am Chip eine Spannungsrampe konstanter Steigung (V_S) angelegt werden, damit sich im Spalt eine konstante Spannung V_J ausbildet. Dieses Prinzip ist in Abbildung 4.1 skizziert.

Damit sich die Ionenkanäle der unteren Membran öffnen, muss die Spannung im Spalt negativ sein, die Spannungsrampe am Chip also eine negative Steigung besitzen. Die negative Spannung V_J im Spalt depolarisiert die untere Zellmembran und öffnet deren Ionenkanäle. Der Strom I_P , welcher durch diese Kanäle fließt, wird mittels des Patch-Clamp-Verstärkers gemessen.

Vor der Durchführung des Experiments sollte überlegt werden, welche Stimulationspulse am Chip angelegt werden, und wie das erwartete Messergebnis aussehen wird. Wenn eine konstante Spannung im Spalt erzeugt wird, erwartet man Ströme, die denjenigen ähnlich sind, die bei Anlegen einer konstanten intrazellulären Spannung gemessen werden. Konstante Spannungen im Spalt wiederum ergeben sich, wenn an den Chip Spannungsrampen

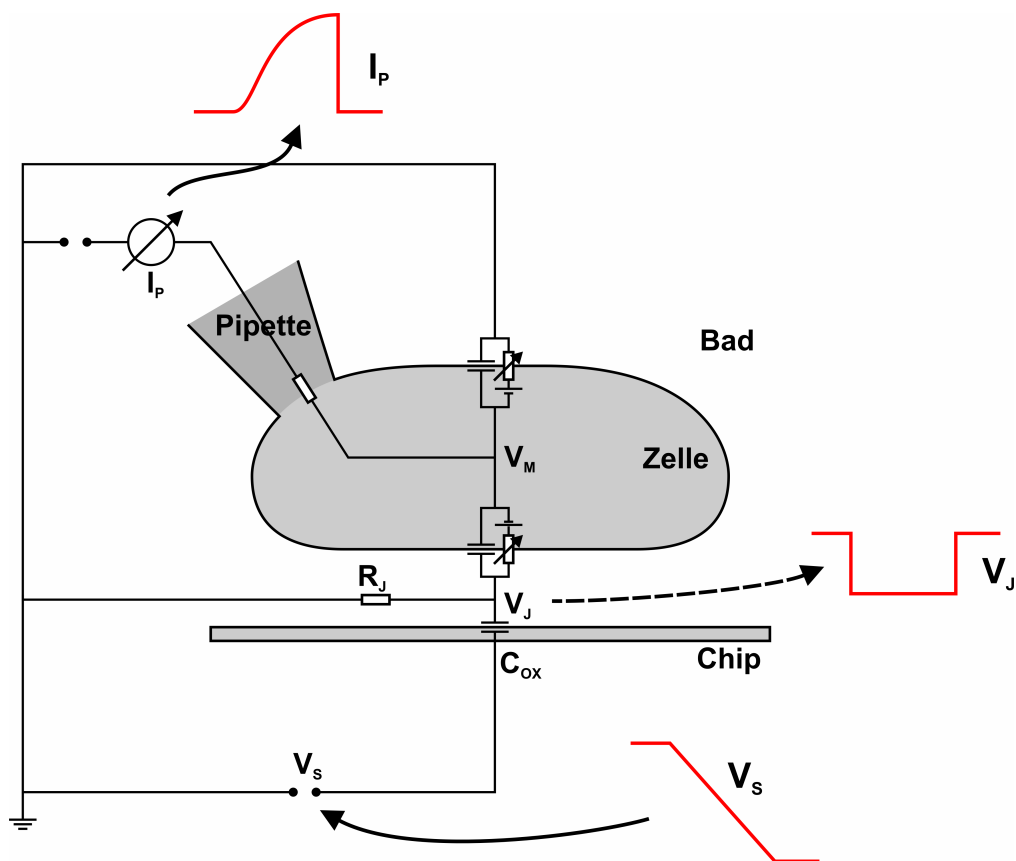


Abbildung 4.1: Um die Ionenkanäle in der unteren Zellmembran zu öffnen, wird am Chip eine negative Spannungsrampe angelegt. Im Spalt zwischen Chip und Zelle bildet sich dadurch eine negative Spannung aus, die sich nicht direkt messen lässt. Sie depolarisiert die untere Zellmembran und öffnet die darin enthaltenen Ionenkanäle. Der Strom lässt sich im Verstärker messen.

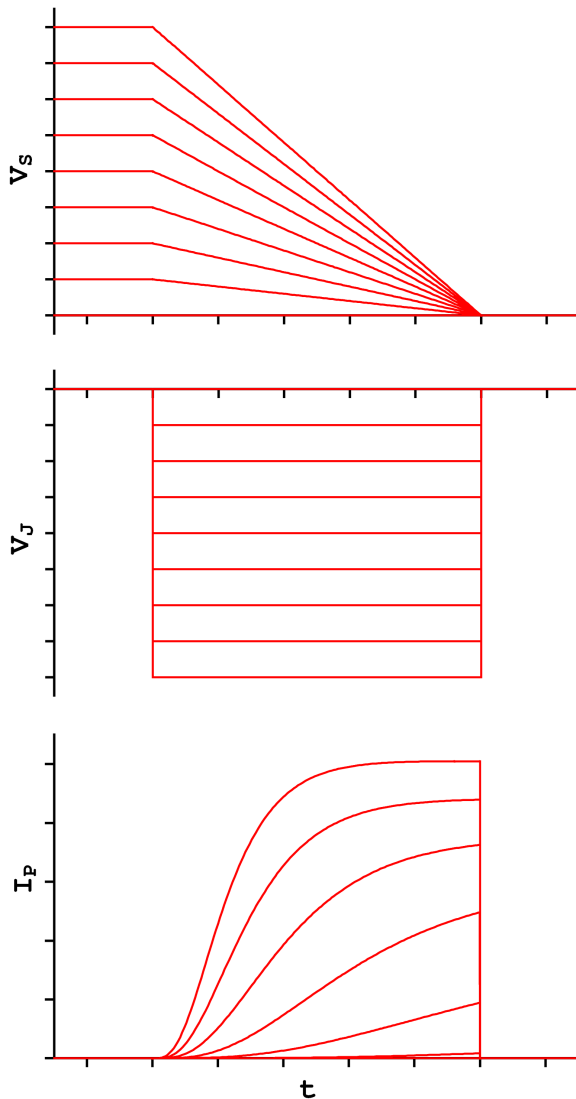


Abbildung 4.2: Geplantes Experiment und erwartete Messkurven. An den Chip wird die Spannung V_S angelegt. Die Steigung der Spannungsrampe wird von Puls zu Puls erhöht. Im Spalt zwischen Chip und Zelle erwartet man die Spannung V_J . Während der Spannungsrampe am Chip nimmt sie konstante negative Werte an. Die Dynamik im Öffnen der Kanäle wird bestimmt durch die Spannung im Spalt. Das Öffnen der Kanäle lässt sich im gemessenen Strom I_P beobachten.

Die Skalen für die Zeit, die Spannungen und den Strom wurden offen gelassen, da es sich um eine vorläufige, grobe Planung des Experiments handelt. Wie lange und wie hoch die Spannungsrampen gewählt werden, wird im folgenden Abschnitt überlegt.

konstanter Steigung angelegt werden.

Die Verläufe der Spannung V_S am Chip, der Spannung V_J im Spalt und des gemessenen Pipettenstroms I_P im geplanten Experiment sind in Abbildung 4.2 dargestellt. V_S bezeichnet die Spannung am Chip. Um das Öffnen der Kanäle bei unterschiedlichen Membranspannungen zu beobachten, wird die Steigung der Spannungsrampe von Puls zu Puls verändert. Die Spannung V_J im Spalt nimmt dabei unterschiedliche negative Werte an. Diese öffnet die Kanäle der unteren Membran. Der Strom I_P durch die Kanäle wird mit der Mikropipette gemessen.

Die für die Kopplung vom Chip in die Zellmembran relevante Größe ist die aus Zellkapazität und Spaltwiderstand gebildete Zeitkonstante $\tau_{OX} = R_J C_{OX}$. Je größer die Zeitkonstante τ_{OX} ist, desto höher wird die Spannung im Spalt zwischen Chip und Zelle, und desto eher öffnen sich die Kanäle der unteren Membran. Im folgenden wird abgeschätzt, wie hoch τ_{OX} sein muss, um die Kanäle der unteren Membran zu öffnen. Aus der Abschätzung werden sich ebenfalls die Größen vom Spannungsintervall und der Zeitdauer der Spannungsrampe am Chip ergeben, die für das Öffnen der Kanäle notwendig sind.

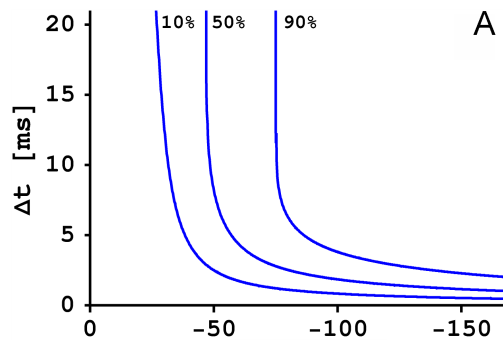
Notwendige Zeitkonstante τ_{OX}

Bei Anlegen einer Spannungsrampe mit konstanter Steigung am Chip wird sich nach kurzer Zeit ($\tau_J = R_J \cdot (C_{OX} + C_{JM})$) eine bestimmte Spannung im Spalt einstellen. Berechnet man diese mit Hilfe des elektrischen Modells ohne Elektrodifusion (Gleichungen 2.1), so ist diese Spannung konstant; bei Berücksichtigung der Elektrodifusion erhält man aufgrund der An- oder Abreicherung von Ionen im Spalt eine geringe Drift. Weiterhin verringert sich die Spannung erheblich, wenn die Kanäle in der unteren Zellmembran öffnen und dadurch eine zum Spalt parallel geschaltete Leitfähigkeit bilden. Für die nachfolgende Abschätzung der zum Öffnen der Kanäle nötigen spezifischen Spotkapazität und der Leitfähigkeit des Spalts wird der einfachste Fall betrachtet, d. h. unter Vernachlässigung der Elektrodifusion und der Kanalleitfähigkeiten und mit konstanter Spotkapazität.

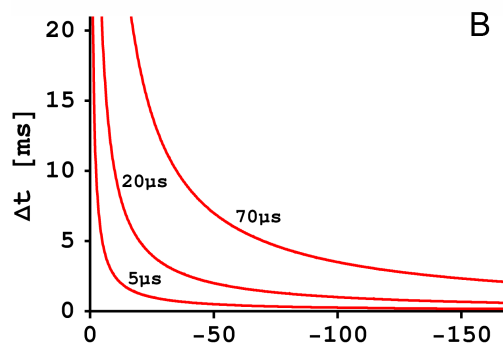
Das Ziel ist es, die Ionenkanäle zu öffnen; abhängig von der vorhandenen Spannung im Spalt variiert die Zeitspanne, innerhalb der ein bestimmter Anteil der Kanäle sich öffnen wird. Je höher der Betrag der Spannung im Spalt und je länger diese Zeitspanne ist, desto mehr Kanäle werden sich öffnen.

Abbildung 4.3:

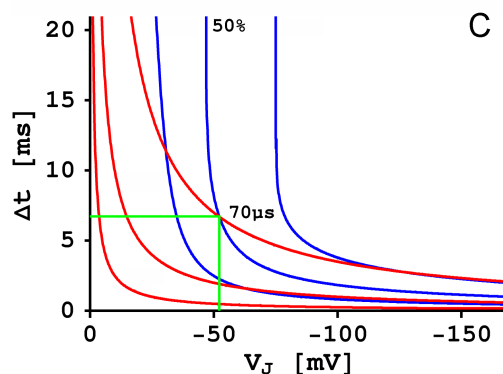
A: In Abhängigkeit der Spannung V_J im Spalt und der Zeitspanne Δt öffnet sich ein gewisser Prozentsatz der Kanäle in der unteren Zellmembran. Die Kurven für 10%, 50% und 90% offene Kanäle sind hier eingezeichnet.



B: Bei einem festen Spannungsintervall von $\Delta V_S = 5\text{ V}$ der Rampe am Chip verhalten sich die Spannung im Spalt und die Zeitspanne, über welche diese aufrecht erhalten werden kann, reziprok zueinander. Die Lage der entsprechenden Kurve ist abhängig von der Zeitkonstanten $\tau_{OX} = C_{OX} R_J$.



C: Legt man A und B übereinander, so lässt sich ablesen, wie weit sich die Kanäle bei einer gegebenen Zeitkonstante τ_{OX} öffnen. Die Höhe und Dauer der Spannung im Spalt V_J und Δt gelten für eine 5 V-Spannungsrampe am Chip.



Beispiel (grün eingezeichnet): Von einer 5 V-Rampe am Chip über 6.7 ms wird im Spalt eine Spannung von -52 mV erzeugt, die 50% der Kanäle öffnet.

Da die Spannung V_J extrazellulär anliegt, entspricht eine negative Änderung der Spannung V_J einer positiven Änderung der intrazellulären Spannung V_M . Um Kanäle zu öffnen, muss also $V_J < 0$ und dementsprechend $\frac{\Delta V_S}{\Delta t} < 0$ gewählt werden. Mit den Differentialgleichungen 2.12, welche für die Dynamik des in den Messungen verwendeten K^+ -Kanals Kv1.3 aufgestellt wurden, kann aus der Spannung V_{JM} über die untere Membran der Verlauf des Öffnungszustands der Kanäle berechnet werden. Trägt man die nach einer bestimmten Zeit Δt erreichte Leitfähigkeit der unteren Membran in Abhängigkeit von der Spannung im Spalt auf, so erhält man das Diagramm 4.3 A. Um z. B. 50% der Kanäle zu öffnen, ist es notwendig, für 6.7 ms eine Spannung V_J im Spalt von -52 mV zu erzeugen (für die durchgeführten Rechnungen wurde das intrazelluläre Potential auf $V_M = -60$ mV gesetzt). Daher entspricht eine Spannung im Spalt von $V_J = -50$ mV einer Spannung über die untere Zellmembran von $V_{JM} = V_M - V_J = -10$ mV).

Zur Berechnung der Spannung V_J im Spalt setzt man in Gleichung 2.1 $\frac{dV_M}{dt} = 0$ (Voltage-Clamp) und $G_{JM} = G_{FM} = 0$ (geschlossene Kanäle). Die Lösung ist die Summe aus einem exponentiell abfallenden Term (Zeitkonstante ca. $200 \mu\text{s}$) und dem konstanten Anteil

$$V_J = C_{OX} R_J \cdot \frac{dV_S}{dt} = C_{OX} R_J \cdot \frac{\Delta V_S}{\Delta t} \quad \text{bzw.} \quad V_J \cdot \Delta t = C_{OX} R_J \cdot \Delta V_S$$

Die Größe des Produkts $V_J \cdot \Delta t$ ist proportional zum Spannungsintervall, welches die Spannung am Chip überstreicht. Diese ist begrenzt durch die untere Grenze 0 V, bei der das Dielektrikum aufgrund von Gasentwicklung zerstört wird, und eine obere Grenze von etwa 5 V, bei welcher der Durchbruch des Dielektrikum eintritt. Bei einem festen Spannungsintervall der Rampe am Chip verhalten sich das Zeitintervall Δt und die Spannung V_J im Spalt reziprok zueinander. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4.3 B für das feste Spannungsintervall $|\Delta V_S| = 5$ V und verschiedene Zeitkonstanten τ_{OX} dargestellt.

Legt man die Diagramme 4.3 A und 4.3 B übereinander, kann man ablesen, wie weit sich die Kanäle bei einer gegebenen Zeitkonstante τ_{OX} öffnen (Abbildung 4.3 C). Beispielsweise öffnen sich 50% der Kanäle, wenn bei einer Zeitkonstante von $\tau_{OX} = 70 \mu\text{s}$ die Spannungsrampe 5 V hoch und 6.7 ms lang ist (Steigung 0.75 V/ms). Die Spannung V_J erreicht dabei einen Wert von -52 mV.

Man sieht, dass für das Öffnen der Kanäle eine große Zeitkonstante vorteilhaft ist. Eine Aufstellung der Zeitkonstanten bei verschiedenen Dielektrika und Elektrolytleitfähigkeiten zeigt Tabelle 4.1.

τ_{OX}	physiologische Lösung 135 mM Na^+ ($\rho_J = 55 \Omega\text{cm}$)	nicht-physiologische Lösung Na^+ -frei ($\rho_J = 682 \Omega\text{cm}$)
10 nm SiO_2 $0.3 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$	$1.1 \mu\text{s}$	$14 \mu\text{s}$
20 nm TiO_2 $1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$	$5.6 \mu\text{s}$	$69 \mu\text{s}$

Tabelle 4.1: Die Zeitkonstanten τ_{OX} für unterschiedliche Dielektrika und Elektrolytleitfähigkeiten. Ein Vergleich mit Abbildung 4.3 C zeigt, dass sich nur mit 20 nm TiO_2 und dem Na^+ -freiem Badelektrolyten Zeitkonstanten erreichen lassen, bei denen man die Kanäle durch eine 5 V-Spannungsrampe am Chip öffnen kann.

4.2 Charakterisierung des Adhäsionsbereichs – optisch

Verschiedene optische Methoden ermöglichen eine Charakterisierung des Adhäsionsbereichs zwischen der Zelle und dem Chip.

Der Abstand von der Zelle zum Chip lässt sich mit der FLIC-Methode (**F**luorescence **I**nterference **C**ontrast **M**icroscopy) messen, welche in der Abteilung für Membran- und Neurophysik des MPI für Biochemie entwickelt wurde.

Die Oberflächengeometrie der Zellen, welche auf dem Chip wachsen, wurde mit Hilfe eines konfokalen Laserscannmikroskops bestimmt. Die damit erhaltenen dreidimensionalen Bilder der angefärbten Zellmembran erlauben eine Abschätzung des Verhältnisses β der Fläche der Adhäsionsmembran (die zur Kopplung mit dem Chip beiträgt) zur Fläche der freien Membran.

Spannungsabhängige Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen eine Messung der Spannung über die Zellmembran, die beim Anlegen einer Spannung am Chip entsteht [Bra01]. Damit wird die Bestätigung geliefert, dass das Punkt- bzw. das Flächenkontaktmodell die während der Stimulation entstehende Spannung im Spalt richtig vorhersagen. Die Messung der Spannungstransienten führte Raimund Gleixner im Rahmen seiner Doktorarbeit durch.

4.2.1 Abstandsbestimmung der Zellen vom Substrat mit FLIC

Der Widerstand des Elektrolyten zwischen Zelle und Chip berechnet sich aus den geometrischen Abmessungen des Spalts, d. h. der radialen Ausdehnung der Kontaktfläche Zelle–Chip und der Dicke des Spalts. Deren Bestimmung wurde mit der FLIC-Methode (**F**luorescence **I**nterference **C**ontrast **M**icroscopy) vorgenommen [Lam96, Lam02, Bra97]. Mit dieser Methode erhält man den Zell-Substrat-Abstand auf etwa 1 nm genau.

In die Zellmembran wird der Farbstoff DiIC₁₈(3) eingebracht. Das eingestrahlte Licht bildet an der Siliziumoberfläche eine stehende Welle aus und regt den Farbstoff zur Fluoreszenz an. Wachsen die Zellen auf einem Chip, der mit verschiedenen hohen Stufen (ca. 10 bis 150 nm) aus einem Dielektrikum strukturiert ist, so wird der Farbstoff in Abhängigkeit von der Stufenhöhe unterschiedlich stark angeregt. Entsprechend wird die Emission des Fluoreszenzlichts unterdrückt, wenn der Farbstoff in einem Wellenknoten der emittierten Welle sitzt. Die detektierbare Fluoreszenz hängt also vom Aufbau des Schichtsystems Substrat–Dielektrikum–Elektrolyt–Membran ab. Kennt man die optischen Eigenschaften des Substrates und der verschiedenen Schichten (Brechungsindizes, Reflexionskoeffizienten und Dicken), so lässt sich über die Messung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten der Abstand des Farbstoffmoleküls und damit der Zellmembran von der Substratoberfläche bestimmen (siehe Abbildung 4.4).

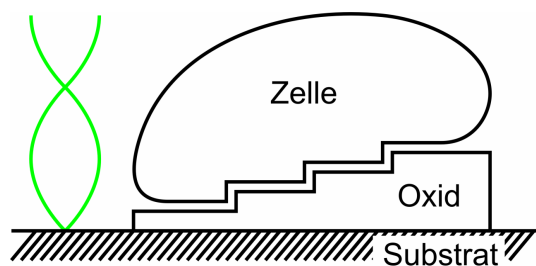


Abbildung 4.4: Das Prinzip der FLIC-Methode. Durch die verschiedenen hohen Stufen liegen die Farbstoffmoleküle in der Membran in Knoten oder Bäuchen der anregenden bzw. abgestrahlten Welle. Sind die Oxidhöhen bekannt, lässt sich der Abstand der Membran vom Substrat bestimmen (aus [Bra97]).

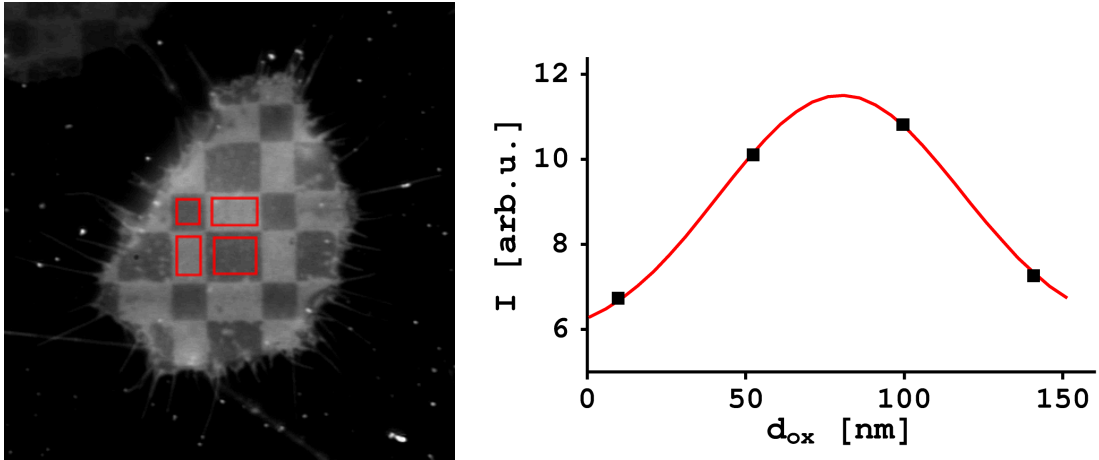


Abbildung 4.5: Links ist ein Beispiel eines FLIC-Bildes zu sehen. Die vier Messfelder sind rot eingezeichnet. Rechts die dazugehörige Kurve mit den vier Wertepaaren aus den Oxiddicken und den darauf gemessenen Intensitäten. Die Theoriekurve passt zu einem Abstand von $d_J = 43.2 \pm 0.8$ nm.

Die Aufnahme der Fluoreszenz der Zelle geschieht durch das Mikroskop über eine CCD-Kamera. Es wurden FLIC-Chips mit vier verschiedenen Stufenhöhen für die Messung verwendet. An die vier Wertepaare der gemessenen Intensitäten und der zugehörigen Oxiddicken wird eine theoretische Intensitätskurve angefitet, die den Abstand Zelle–Chip als Fitparameter liefert (Abbildung 4.5).

Mittels der FLIC-Methode wurde der Abstand von HEK293-Zellen zum Substrat jeweils für eine SiO_2 - und eine TiO_2 -Oberfläche und normale, d. h. physiologische Elektrolyten und solche mit verminderter elektrischer Leitfähigkeit (Ersetzung von NaCl durch Glucose) bestimmt. Dabei wurden jeweils zwischen 30 und 120 Zellen ausgemessen. Die Mittelwerte und die Statistik zeigt Abbildung 4.6. Der Abstand der Zellen vom Substrat ist auf TiO_2 wahrscheinlich deshalb größer als bei SiO_2 , weil die TiO_2 -Chips vor der Messung erst ein einziges Mal gereinigt wurden. Erfahrungsgemäß wird der Abstand zwischen Zelle und Substrat bei den ersten 3 bis 5 Reinigungszyklen geringer. Auf unterschiedlichen Chips wachsen die Zellen außerdem mit unterschiedlichen Abständen (vgl. Messung mit TiO_2 und Normalmedium). Dies ist möglicherweise auf Schwankungen bei der Reinigungsprozedur zurückzuführen.

Die gemessenen Abstände liegen bei allen Kombinationen zwischen 40 nm und 80 nm. Dieser Abstand zwischen Substrat und Zelle wurde in den Simulationen verwendet. Er geht ein in die Spaltleitfähigkeit g_{JM} .

4.2.2 Oberflächengeometrie der Zellen

Beim Wachstum der Zellen auf beschichteten Chips werden zwei verschiedene Zellgeometrien beobachtet. Ein Teil der Zellen zeigt eine spindelförmige Geometrie, wie sie auch bei der Kultur der Zellen in den Plastikschälchen auftritt. Viele Zellen wachsen jedoch in einer stark abgeflachten Form, wie sie bei der Kultur in den Schalen nur selten zu finden ist.

Die beiden Wachstumsgeometrien unterscheiden sich in der Gesamtfläche A_M der Membran und im Verhältnis β von adhärierter zu freier Membranfläche, wie sich aus Abbildung

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

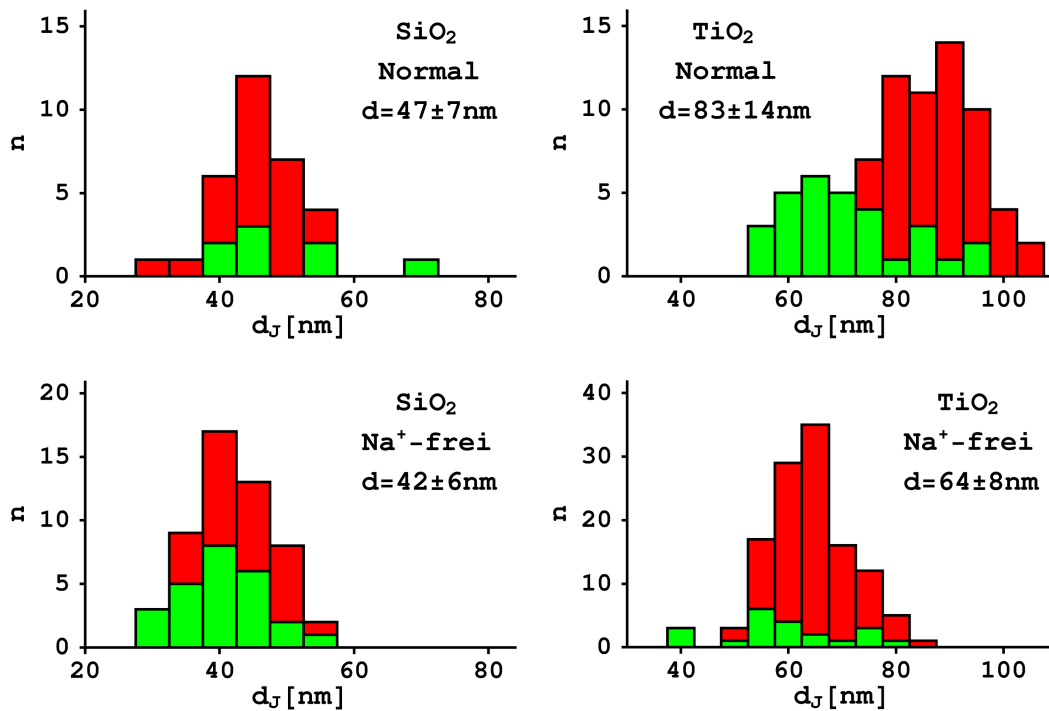


Abbildung 4.6: Der Abstand Zelle-Substrat wurde für eine SiO_2 - und eine TiO_2 -Oberfläche und physiologischen und natriumfreien Elektrolyten bestimmt. Die mittleren Abstände sind jeweils in der Grafik angegeben. Für jede Kombination wurden Messungen auf zwei Chips durchgeführt, deren Anteile in rot und grün wiedergegeben sind.

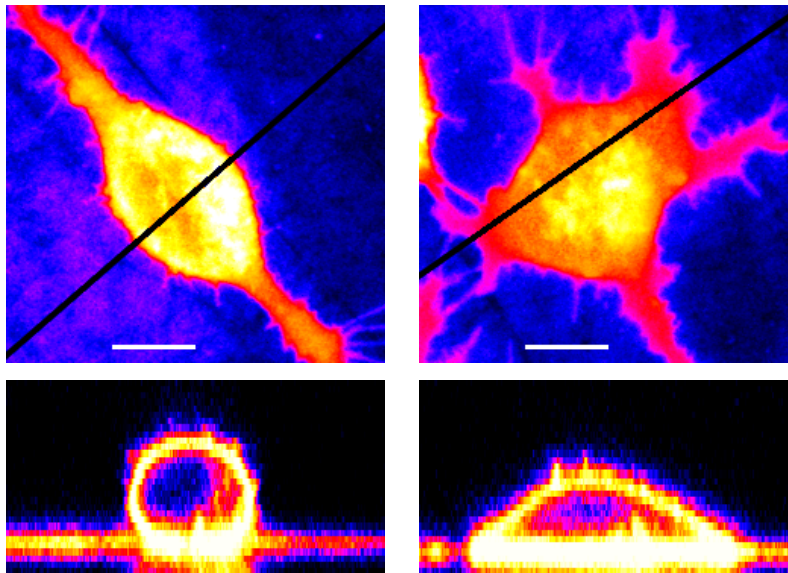


Abbildung 4.7: Die HEK293-Zellen zeigen zwei unterschiedliche Zellgeometrien. Der eine Zelltyp ist spindelförmig und hat eine geringe Adhäsionsfläche, der andere Typ ist abgeflacht und hat eine höhere Adhäsionsfläche. Die Bilder wurden mit einem Laserscanmikroskop aufgenommen (Weißer Balken = $10 \mu\text{m}$). Die unteren Bilder zeigen die Schnitte der dreidimensionalen Daten entlang den schwarzen Linien.

4.7 schließen lässt. Bei den Zellen mit spindelförmiger Geometrie adhärirt etwa ein Viertel der Membran ($\beta = 0.25$) und die gesamte Membranfläche beträgt ungefähr $A_M = 700 \mu\text{m}^2$, wohingegen bei den abgeflachten Zellen fast die Hälfte der Membran zur Adhäsionsfläche beiträgt ($\beta = 0.85$) und die Gesamtfläche sich auf etwa $A_M = 1000 \mu\text{m}^2$ oder mehr beläuft. Die Messungen wurden an den abgeflachten Zellen ausgeführt, da erstens die Adhäsionsfläche und zweitens auch ihr Anteil an der Gesamtfläche der Zelle größer sind als bei den spindelförmigen Zellen. Bei wachsender Adhäsionsfläche erhöht sich der Widerstand des Elektrolyten im Spalt, wodurch bei gleicher Spannung am Chip höhere Spannungen im Spalt erreicht werden.

Die Falschfarben-Bilder in Abbildung 4.7 wurden mit einem Laserscanmikroskop aufgenommen. Dazu wird in die Zellmembran ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) eingebracht. Anregungs- und Emissionslicht müssen ein Pinhole passieren, wodurch der Fokus auf ein kleines räumliches Gebiet beschränkt wird. Durch Rasterung aller Punkte lässt sich die dreidimensionale Struktur des Objekts bestimmen. Die Schrittweite beträgt bei diesen Bildern $X \times Y \times Z = 0.184 \times 0.184 \times 0.8 \mu\text{m}$. Die beiden oberen Bilder zeigen die Zellen von oben, d. h. senkrecht zur XY-Ebene. Alle 30 XY-Schnitte wurden aufsummiert und die Intensität auf das Maximum normiert. Die unteren Bilder entstanden, indem durch die dreidimensionalen Daten Schnitte entlang den schwarz eingezeichneten Linien berechnet wurden. Hier wurde über 5 Ebenen, d. h. etwa $1 \mu\text{m}$, gemittelt.

4.2.3 Messung der Spannung mit spannungsabhängigen Farbstoffen

Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes

Durch den Einbau eines spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes in die Zellmembran lässt sich mittels einer optischen Messung die über die Membran abfallende Spannung bestimmen. Der hierfür verwendete Hemicyaninfarbstoff ANNINE-5 (Abbildung 4.8) wurde erstmals am MPI für Biochemie von Hübener und Fromherz synthetisiert [Hüb03]. Es handelt sich hierbei um ein amphiphiles Molekül, welches sich mit der polaren Kopfgruppe nach außen zeigend in die Lipidmembran einlagert. Die im Grundzustand am Pyridin sitzende positive Ladung verschiebt sich im angeregten Zustand zum Anilin. Liegt über die Membran eine Spannung an, so werden aufgrund des Stark-Effektes die Anregungs- und Fluoreszenzwellenlängen verschoben, da das hervorgerufene elektrische Feld und die Ladungsverschiebung in dieselbe Richtung zeigen.

Durch geeignete Wahl der Anregungswellenlänge und des Wellenlängenbereichs für die Beobachtung der Emission lässt sich eine Korrelation zwischen der gemessenen Intensitätsänderung der Fluoreszenz und der Spannung über die Membran herstellen. Die Vermessung der Anregungs- und Emissionsspektren wurde von Bernd Kuhn im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt und ist in [Kuh03] veröffentlicht.

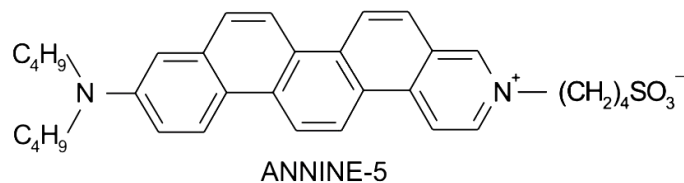


Abbildung 4.8: Der spannungsabhängige Fluoreszenzfarbstoff Annine-5.

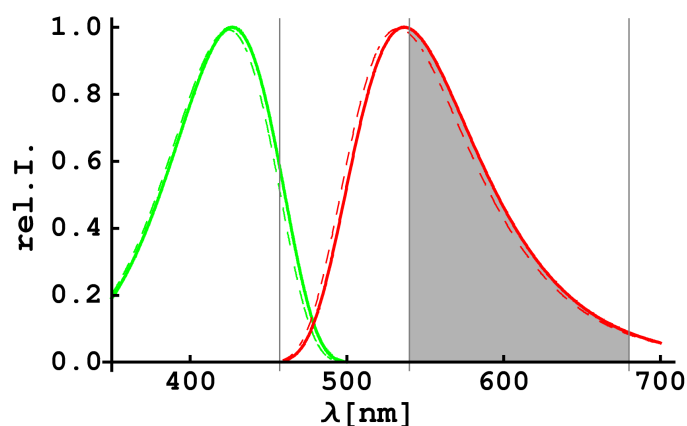


Abbildung 4.9: Anregungsspektren (grün) und Emissionsspektren (rot) von Annine-5 bei einer Membranspannung von $V_M = -70$ mV (durchgezogen) und $V_M = 30$ mV (gestrichelt). Wellenlänge Anregung 457 nm, Filtersatz Emission 540 – 680 nm.

Die Anregung und Emission sind näherungsweise unabhängige Prozesse. Die Parametrisierungen der zweidimensionalen Spektren für die Fluoreszenz $F_\nu(\nu_{ex}, \nu_{em})$ und die spannungsabhängige Änderung der Fluoreszenz $\Delta F_\nu(\nu_{ex}, \nu_{em})$ in [Kuh03] zerfallen deshalb in jeweils zwei eindimensionale Spektren für Anregung und Emission. In Abbildung 4.9 sind diese für eine Membranspannung von $V_M = -70$ mV in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ aufgetragen (durchgezogene Linien). Das normierte Anregungsspektrum $\varepsilon_\lambda(\lambda_{ex})$ ist grün und das normierte Emissionsspektrum $f_\lambda(\lambda_{em})$ in rot eingezeichnet. Die Spektren, welche sich bei einer Spannungsänderung von $\Delta V_M = +100$ mV (also für $V_M = 30$ mV) ergeben, sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Damit im Experiment eine möglichst große Signaländerung bei einer gegebenen Spannungsänderung eintritt, ist eine entsprechende Wahl der Wellenlängen für die Anregung und Emission notwendig. Die Änderung der Anregung ist bei einer Spannungsänderung an der abfallenden Flanke sehr hoch. Deshalb wurde zur Anregung die Linie des Argon-Ionen-Lasers bei 457 nm ausgewählt. Damit sich die Verschiebungen in der Anregung und der Emission nicht gegenseitig aufheben, muss der Filtersatz für die Emission am langwelligeren Ende des Emissionsspektrums liegen. Es wurde ein Bandpassfilter von 540 nm bis 680 nm gewählt. Die Wellenlängen für die Anregung und Emission sind als Linie bzw. Intervall grau eingezeichnet. Bei einer Spannungsänderung um 100 mV beträgt die relative Änderung der Anregung bei den ausgewählten Filtersätzen -12% und die der Emission -6% , so dass sich insgesamt eine relative Fluoreszenzänderung von $\Delta F/\Delta V_M = -17\%/100$ mV ergibt.

Die den Spektren zugrunde liegenden Daten stammen aus Versuchen mit Retzius-Zellen aus den Nervenganglien des Blutegels *Hirudo medicinalis*. Die Empfindlichkeit des Farbstoffes bei HEK293-Zellen liegt jedoch niedriger als bei Nervenzellen von Invertebraten. Außerdem verringert sich das Signal-Hintergrund-Verhältnis zusätzlich durch Anfärbung des Zellinneren, wodurch eine zusätzliche spannungsunabhängige Emission entsteht. Insgesamt liegt die relative Fluoreszenzänderung in den nachfolgenden Messungen an HEK293-Zellen damit bei etwa $\Delta F/\Delta V_M = -5\%/100$ mV.

Fluoreszenzmessung mit dem Laserscannmikroskop

Da bei der Stimulation der Zellen vom Chip aus die Spannung über die untere Zellmembran einen vom Ort in der Zellmembran abhängigen Verlauf aufweist, wird die entsprechende Messung orts aufgelöst durchgeführt. Wegen der hohen räumlichen Auflösung von

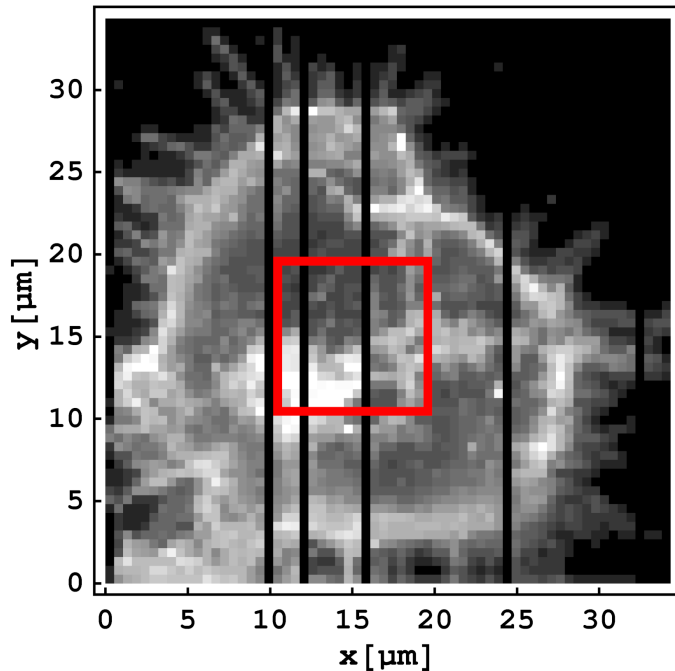


Abbildung 4.10: Aufnahme einer HEK293-Zelle mit dem Laserscanmikroskop. Die Membran wurde mit dem Farbstoff Annine-5 angefärbt. Der Fokus des Mikroskops ist so eingestellt, dass nur die Fluoreszenz aus der Adhäsionsmembran gemessen wird. (Aufnahme R. Gleixner)

$0.5 \times 0.5 \times 2 \mu\text{m}^3$ wurde dies mit Hilfe eines Laserscannmikroskops realisiert. Der Fokus fährt ein bestimmtes Scanmuster ab; gleichzeitig werden die Daten aufgenommen. Aus diesen lässt sich nachträglich das Bild des Objekts zusammensetzen. Ortsaufgelöste Messungen von Spannungstransienten in der Zellmembran mit spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffen wurden am MPI für Biochemie in Martinsried von Dieter Braun durchgeführt [Bra01] und anschließend von Raimund Gleixner weiterentwickelt.

Ein Beispiel für einen der aufgenommenen x-y-Scans der Adhäsionsmembran ist in Abbildung 4.10 zu sehen. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz des Farbstoffes Annine-5 in der unteren Zellmembran ist durch verschiedene Graustufen dargestellt. Die schwarzen vertikalen Linien sind auf Probleme in der Messung zurückzuführen. Tritt ein Fehler auf, werden die in der entsprechenden Linie gemessenen Werte verworfen. Für die Ermittlung der Spannungstransienten wurden nur die Punkte innerhalb des rot umrandeten Rechtecks herangezogen, da in den äußeren Bereichen der Adhäsionsfläche der Einfluss der freien Membran stärker wird.

Spannungstransienten über die Junctionmembran

Im Messprotokoll für die Aufnahme der Spannungstransienten wird an jedem Messpunkt eine bestimmte Anzahl von Perioden aufgenommen und der Fokus dann zum nächsten Messpunkt gefahren. Die gesamte Ebene oder ein ausgewählter Streifen wird auf diese Weise punktweise gescannt. Für die Bestimmung der Transienten wird räumlich über die Punkte im roten Rechteck gemittelt.

In der Messung von Abbildung 4.10 wurde eine Periodendauer von $T = 1 \text{ ms}$ verwendet. Zeitlich wurde an jedem Punkt über 10 Perioden gemittelt und räumlich über $16 \times 16 = 256$ Punkte. Das Ergebnis ist der in Abbildung 4.11 links dargestellte Intensitätsverlauf. Die obere Kurve zeigt die am Chip gemessene Spannung $V_S(t)$. Die untere Kurve beschreibt den Verlauf der Intensität $I(t)$, der sich aus der zeitlichen und räumlichen Mittelung über

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

die aufgenommene Fluoreszenz der unteren Zellmembran ergibt. Die Umrechnung des Fluoreszenzsignals in die Spannung $V_{JM}(t)$ über die untere Zellmembran wurde hier nicht durchgeführt. Schwierigkeiten bereitet hierbei der konstante Hintergrund durch Anfärbung von Bestandteilen im Zellinneren, deren Fluoreszenz keine Spannungsabhängigkeit zeigt. Nimmt man eine Fluoreszenzänderung von $\Delta F/\Delta V_M = 5\%/100\text{ mV}$ an, so ergibt sich bei der Intensitätsänderung von 10% eine Amplitude von $\Delta V_{JM} = 200\text{ mV}$. Die Kurve besteht aus 250 Punkten, d. h. die Zeitauflösung liegt bei $4\text{ }\mu\text{s}$.

Die Steigung der Flanken beträgt $\frac{dV_S}{dt} = 3000 \frac{\text{V}}{\text{s}}$, der Sprung beträgt $\Delta V_S = 0.5\text{ V}$. In Kapitel 5 ist beschrieben, wie sich daraus und aus den Parametern für die Zellmembran und die Kopplung die zu erwartenden Verläufe der Spannung über die Membran berechnen lassen. Berücksichtigt man die niedrige Leitfähigkeit des Elektrolyten (5.4 mM KCl , 0 mM NaCl), die Größe der Zelle ($\phi 11\text{ }\mu\text{m}$), die Chipkapazität ($c_{OX} = 1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$) und nimmt ein Flächenverhältnis von $\beta = 0.8$ an, so ergibt sich für die Höhe des Sprunges $\Delta V_{JM} = 203\text{ mV}$ und für die Differenz der stationären Werte während der de- und hyperpolarisierenden Phasen $\Delta V_{JM} = 215\text{ mV}$. Dies bestätigt den aus der Fluoreszenzänderung berechneten Wert von 200 mV .

Auf der rechten Seite von Abbildung 4.11 ist ein weiteres Messergebnis zu sehen. Die Periodendauer wurde auf $T = 200\text{ }\mu\text{s}$ reduziert und ein duty cycle von $dc = 0.8$ gewählt. Auch bei kurzen Periodendauern lässt sich also eine nahezu konstante Spannung über

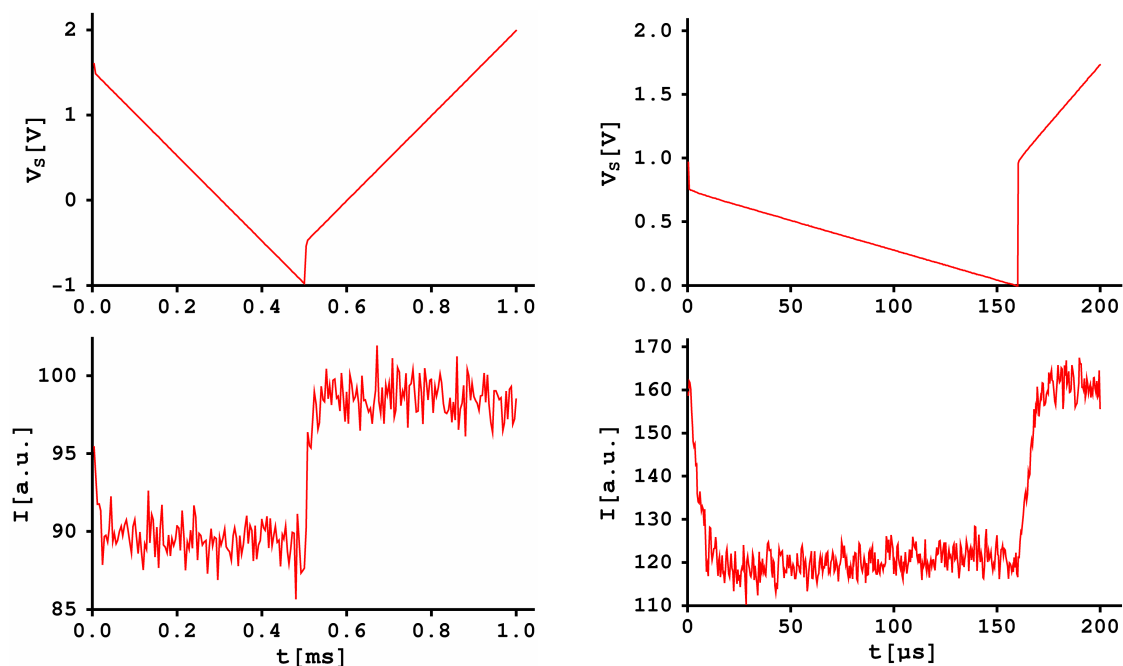


Abbildung 4.11: Mittels des spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Annine-5 aufgenommene Spannungstransienten. Oben ist die Spannung $V_S(t)$ am Chip zu sehen, unten der Intensitätsverlauf $I(t)$ der Fluoreszenz in der unteren Zellmembran.

Links: Diese Messung entstand aus einer zeitlichen Mittelung über 10 Perioden und einer räumlichen Mittelung über 256 Punkte. Zeitauflösung: $4\text{ }\mu\text{s}$.

Rechts: Periodendauer $T = 200\text{ }\mu\text{s}$. Es wurde zeitlich über 50 und räumlich über 36 Punkte gemittelt.

Ein duty cycle von $dc = 0.8$ wurde verwendet. Die Zeitauflösung beträgt 400 ns .

(Daten freundlicherweise von R. Gleixner zur Verfügung gestellt.)

die Zellmembran erzeugen. Dies ist für die Stimulation der Zelle mit periodischen Spannungspulsen relevant, wie sie in Kapitel 5 behandelt wird.

4.3 Charakterisierung des Adhäsionsbereichs – elektrisch

Der Adhäsionsbereich zwischen der Zelle und dem Chip lässt sich auch auf elektrischem Weg charakterisieren. Erzeugt man durch Anlegen einer entsprechenden Spannung am Chip eine extrazelluläre Spannung im Spalt und öffnet die Kanäle der Zelle gleichzeitig durch eine intrazelluläre Spannung, so können unter der Annahme gleicher Membraneigenschaften für die freie und Junctionmembran die Membran- und Spaltleitfähigkeiten aus den Messwerten bestimmt werden.

Um den Einfluss der extrazellulären Spannung auf die gemessenen Ströme herauszufinden, werden bei verschiedenen intrazellulären Spannungen jeweils eine Messung mit und eine Messung ohne extrazelluläre Stimulation miteinander verglichen. In Abschnitt 4.3.1 wird das Messprotokoll erklärt, welches die dabei auftretende Inaktivierung der Kanäle berücksichtigt. Die für die Auswertung der Daten relevanten Größen sind der Strom bei vollständig geöffneten Ionenkanälen und die Differenz zwischen den Strömen, die mit und ohne extrazelluläre Spannung gemessen werden.

Diese beiden Werte lassen sich auch aus den Differentialgleichungen berechnen, die in Kapitel 2 zur Beschreibung der Kopplung aufgestellt wurden. Verwendet man das elektrische Modell, welches die Elektrodifffusion vernachlässigt, dann ist es wegen der Linearität der Gleichungen möglich, aus den Messwerten auf die Kopplungsparameter zurückzurechnen (Abschnitt 4.3.2).

Das entsprechende Experiment wird in Abschnitt 4.3.3 gezeigt. Die zur Charakterisierung der Kopplung notwendigen Werte werden aus der Messung extrahiert. Die Ursache für die Abweichungen der Messdaten von der numerischen Simulation wird diskutiert.

In Abschnitt 4.3.4 werden die Kopplungsparameter G_J und G_{JM} aus den Ergebnissen des durchgeführten Experiments berechnet. Auch die Werte der Spannung V_J im Spalt, der Spannungsdifferenz ΔV_J und der Zeitkonstante τ_{OX} werden bestimmt.

Für die durchgeführten Rechnungen müssen bestimmte Werte für das Flächenverhältnis β und den Kanalreicherungparameter μ angenommen werden. Alternativ dazu kann deren Produkt als freier Parameter eingesetzt werden und lässt sich bei bekannter Spaltleitfähigkeit G_J bestimmen (Abschnitt 4.3.5).

In Abschnitt 4.3.6 wird eine numerische Simulation der Messung unter Berücksichtigung der Elektrodifffusion durchgeführt. Der Einfluss der extrazellulären Spannung wird mit den Simulationen ohne Elektrodifffusion verglichen. Die Abweichungen lassen sich qualitativ erklären.

4.3.1 Gleichzeitige intra- und extrazelluläre Stimulation

Wenn die Spannung in der Zelle auf einen festen Wert geklemmt ist, führt bei offenen Kanälen eine Spannungsänderung im Spalt zu einer Stromänderung durch die untere Zellmembran. Aus dieser lässt sich die Spannung und Leitfähigkeit im Spalt berechnen. Sind die Kanäle der unteren Membran vollständig geöffnet, vereinfacht sich die Berechnung der Spannung im Spalt, weil die untere Membran sich dann als ohmscher Widerstand beschreiben lässt.

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

Bei diesem Experiment sind folgende Punkte zu beachten:

- Das Intervall der anregenden Spannung am Chip muss klein gehalten werden (z. B. $\Delta V_S = 1\text{ V}$), damit das Problem der spannungsabhängigen Spotkapazität umgangen wird. Da die Leitfähigkeit der unteren Membran durch die hohe Expressionsrate der Kanäle sehr groß ist, reicht eine kleine extrazelluläre Anregung, um messbare Stromänderungen zu bewirken.
- Damit der Kanal vollständig geöffnet wird, muss bei hohen intrazellulären Spannungen gemessen werden.
- Da die intrazelluläre Spannung auch die Kanäle der oberen Membran öffnet, müssen die Anteile der oberen und unteren Membran am Gesamtstrom getrennt werden.
- Bei hohen intrazellulären Spannungen inaktiviert der Kanal Kv1.3. Durch ein geeignetes Messprotokoll kann der Einfluss der Inaktivierung herausgerechnet werden.

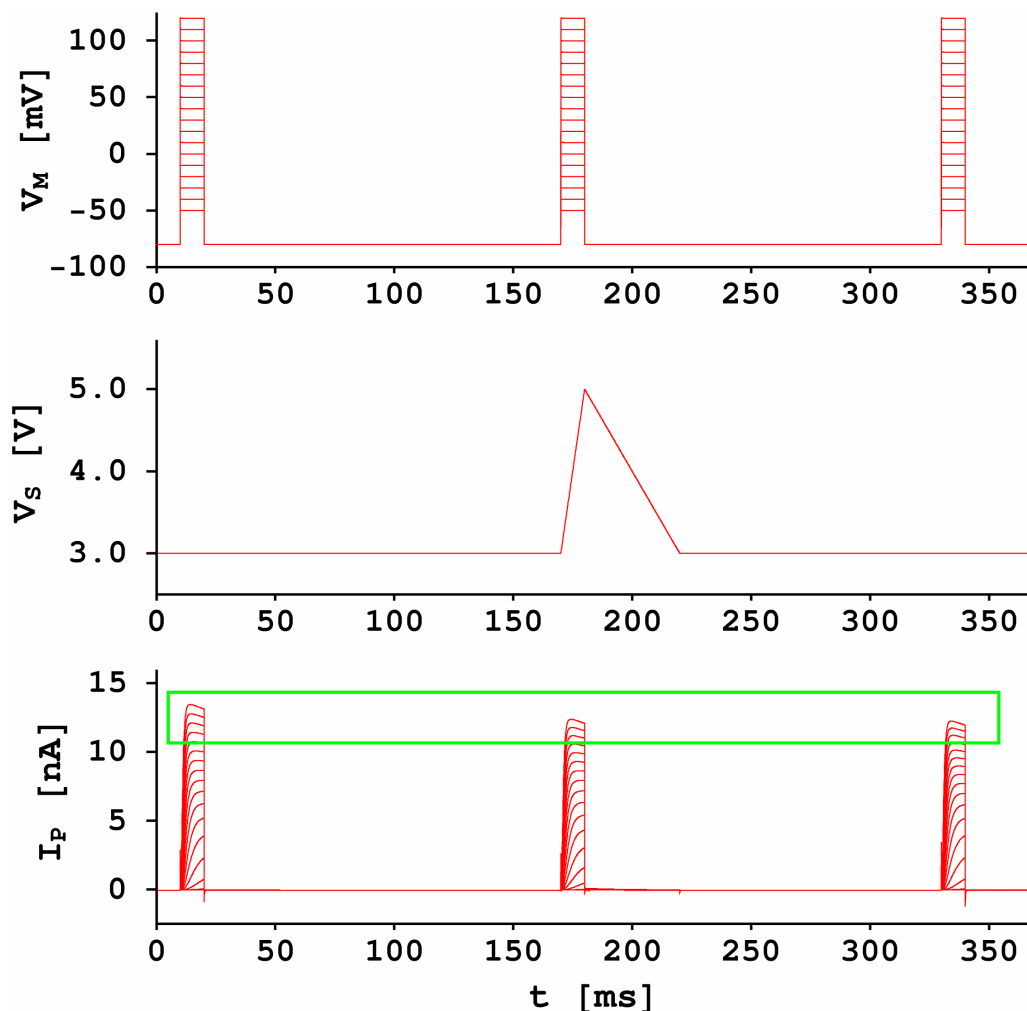


Abbildung 4.12: Das geplante Experiment zur Charakterisierung des Adhäsionsbereichs (numerische Simulation). Intrazellulär wird dreimal ein Spannungspuls von 10 ms Dauer angelegt (oben). Der zweite Puls wird durch eine Spannungsrampe am Chip überlagert (Mitte). Der Pipettenstrom I_P (unten) ändert sich von Puls zu Puls. Der grün umrandete Bereich ist in Abbildung 4.13 vergrößert dargestellt.

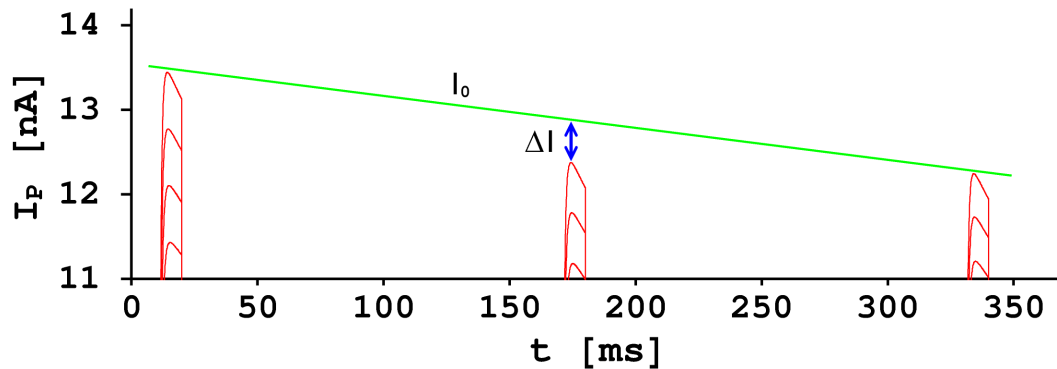


Abbildung 4.13: Der maximale Strom I_0 bei jedem der drei Spannungspulse nimmt durch die Inaktivierung ab (grüne Linie). Die extrazelluläre Spannung im Spalt während des zweiten Pulses verändert den Strom um den Wert ΔI .

Im folgenden wird das geplante Experiment anhand von Abbildung 4.12 beschrieben. Intrazellulär werden wie zur Aufnahme einer Gatingkurve rechteckige Pulse von 10 ms Dauer angelegt. Für jede Spannungsstufe wird der Puls dreimal in kurzer Folge wiederholt (oben). Gleichzeitig zum mittleren der drei Pulse wird am Chip eine Spannungsrampe angelegt, die eine extrazelluläre Spannung im Spalt erzeugt (Mitte). Während jedem der intrazellulären Spannungspulse öffnen sich die Ionenkanäle und schließen sich wieder in den dazwischen liegenden Pausen. Der Strom durch die Kanäle wird mit der Mikropipette gemessen (unten).

Um den Einfluss der extrazellulären Spannung deutlicher zu sehen, ist der grün umrandete Bereich in Abbildung 4.13 vergrößert dargestellt. Bei denjenigen Pulsen, bei denen die intrazelluläre Spannung am größten ist (die Pulse mit den höchsten Strömen), ist die extrazelluläre Spannung im Spalt gegenüber der intrazellulären Spannung für die Berechnung der Inaktivierung vernachlässigbar; d. h. bei allen drei Pulsen liegt nahezu die gleiche Membranspannung an. Weil die Inaktivierung der Kanäle abhängig von der Membranspannung ist, ist bei jedem der drei Pulse auch die Anzahl der inaktivierenden Kanäle gleich groß. Als Vergleichswert für den zweiten Puls wird daher der Mittelwert aus den Strömen während des ersten und des dritten Pulses herangezogen, welcher in der Abbildung durch die grüne Linie dargestellt ist. Gleichzeitig wird dieser Wert als Maximalstrom I_0 bei vollständig geöffneten Kanälen verwendet (der Anteil der inaktivierten Kanäle wird vernachlässigt). Während des zweiten Pulses wird die extrazelluläre Spannung im Spalt erzeugt. Dadurch ändert sich der Strom, der durch die Kanäle der unteren Membran fließt, um den Wert ΔI .

In Abbildung 4.14 sind die Ströme während aller drei Spannungspulse übereinander gelegt. Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur jede dritte Kurve dargestellt. Die Kurve des Pulses mit extrazellulärer Stimulation (blau) liegt jeweils unter dem Mittelwert der Kurven der Pulse ohne extrazelluläre Stimulation (rot). Die Inaktivierung ist bei höheren intrazellulären Spannungen V_M stärker, was an der größeren Abweichung der beiden roten Kurven voneinander zu erkennen ist. Zur folgenden Analyse der (simulierten) Daten werden die intrazellulären Spannungen V_M für die verschiedenen Pulse und die Ströme am Ende der Pulse (schwarze gestrichelte Linie) verwendet.

In Abbildung 4.15 oben sind die Ströme I_P am Ende jedes Pulses gegen die jeweilige intrazelluläre Spannung V_M während des Pulses aufgetragen. Die roten Kurven stellen die

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

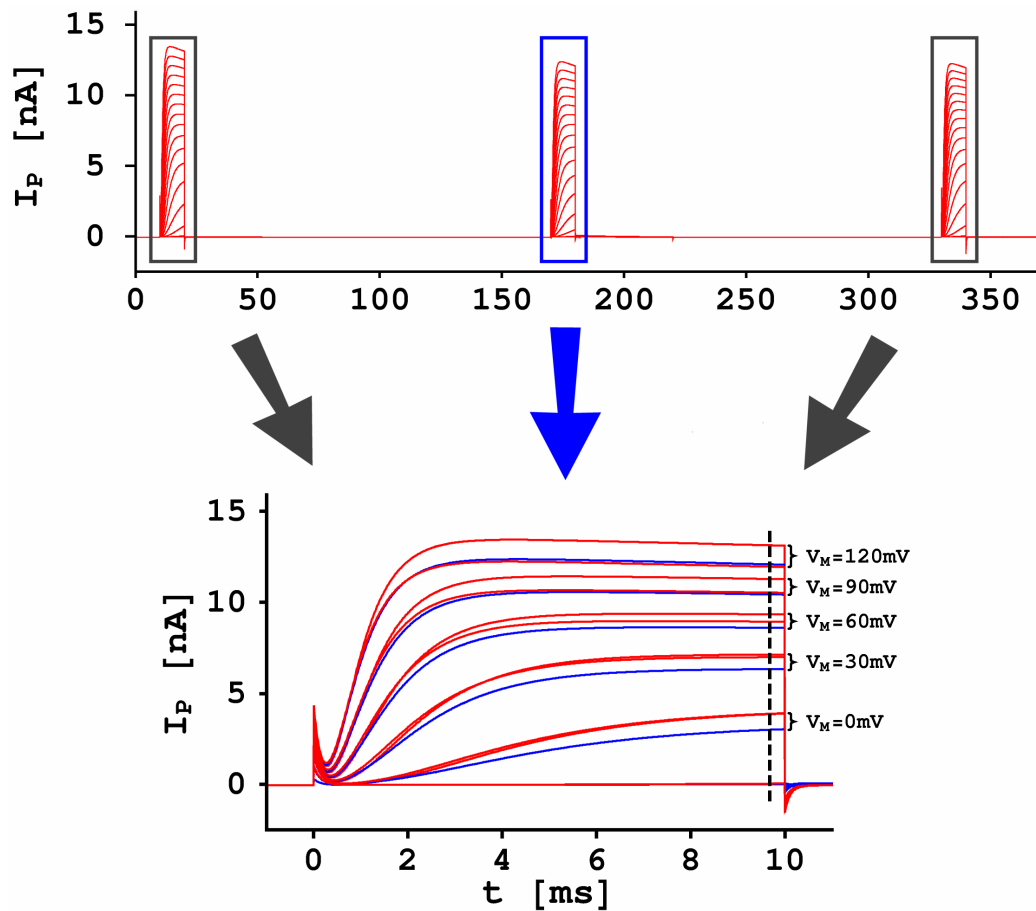


Abbildung 4.14: Werden die Ströme während aller drei Spannungspulse übereinander gelegt, so liegt die Kurve des Pulses mit extrazellulärer Stimulation (blau) unter dem Mittelwert der Kurven der Pulse ohne extrazelluläre Stimulation (rot).

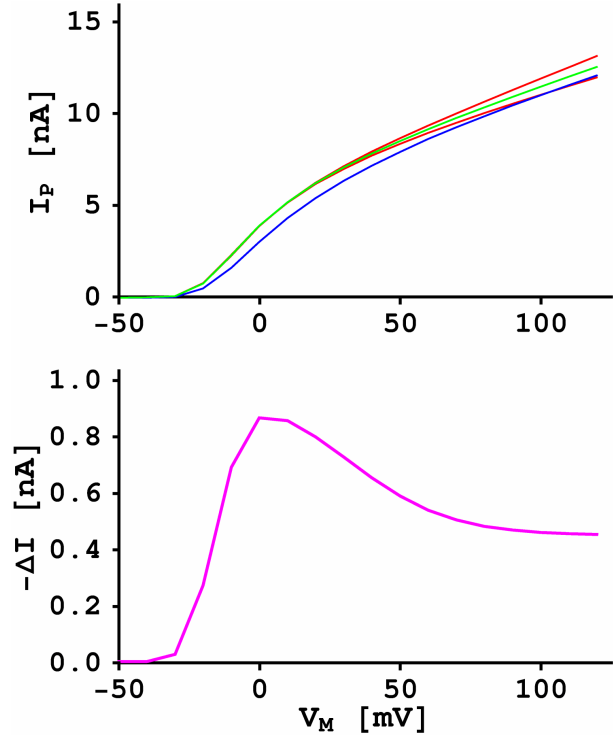
Ströme nach den beiden Pulsen ohne extrazelluläre Stimulation dar und klaffen wegen der Inaktivierung der Kanäle auseinander. Der Mittelwert I_0 dieser Ströme ist grün dargestellt. Die blaue Kurve bezeichnet die Ströme, die am Ende des zweiten Pulses fließen, dem Puls mit der zusätzlichen extrazellulären Stimulation. Da am Chip eine Spannungsrampe mit positiver Steigung angelegt wird, verringert sich die Spannung über die untere Zellmembran, und der Strom wird kleiner.

Im unteren Teil der Abbildung 4.15 ist die Differenz ΔI zwischen dem Strom während des zweiten Pulses und dem Mittelwert I_0 aus den Strömen während des ersten und dritten Pulses dargestellt. Für hohe intrazelluläre Spannungen sind alle Ionenkanäle geöffnet, und die Leitfähigkeit der Membran erreicht ihren maximalen Wert. Dann wird die Stromdifferenz konstant, die durch die zusätzliche extrazelluläre Spannung während des zweiten Pulses hervorgerufen wird. Sind allerdings nicht alle Ionenkanäle durch die intrazelluläre Spannung geöffnet, so beeinflusst die extrazelluläre Spannung den Öffnungszustand der Kanäle in der unteren Membran. Der Einfluss der extrazellulären Spannung auf den Strom wird stärker, und die Stromdifferenz ΔI ist größer als im Falle hoher intrazellulärer Spannungen.

Abbildung 4.15: Die Ströme am Ende der Spannungspulse in Abhängigkeit von der intrazellulär angelegten Spannung.

Oben: Rot eingezeichnet sind die Ströme für den ersten und dritten Spannungspuls (ohne extrazelluläre Spannung). Grün ist der Mittelwert I_0 aus diesen Strömen dargestellt. Die blaue Linie stellt den Strom während des zweiten Pulses dar (mit Spannungsrampe am Chip).

Unten: Die Differenz ΔI zwischen dem Puls mit der extrazellulären Spannung und dem Mittelwert der Pulse ohne extrazelluläre Spannung. Für hohe intrazelluläre Spannungen sind alle Kanäle geöffnet, und ΔI geht gegen einen festen Wert. Bei geringeren Spannungen verändert die extrazelluläre Spannung auch die Leitfähigkeit der Membran, indem sie das Öffnen der Kanäle beeinflusst.



4.3.2 Berechnung der Leitfähigkeit und Spannung im Spalt

Aus den Werten I_0 und ΔI können nun die Membran- und Spaltleitfähigkeiten berechnet werden. Dazu werden die Differentialgleichungen für das Punktkontaktmodell ohne Elektrodifusion (Formel 2.1) herangezogen. Es werden die Werte für hohe intrazelluläre Spannungen V_M zur Auswertung benutzt, da in diesem Fall nahezu alle Kanäle geöffnet sind. Dann kann die Leitfähigkeit der Membran als konstant betrachtet werden. Da die Messungen im Voltage-Clamp-Modus stattfinden, wird $\frac{dV_M}{dt} = 0$ gesetzt.

Die Gleichung für das Punktkontaktmodell ohne Elektrodifusion lautet dann

$$\frac{V_J}{R_J} + C_{OX} \cdot \frac{d(V_J - V_S)}{dt} = -C_{JM} \cdot \frac{dV_J}{dt} + \sum_i G_{JM}^i \cdot (V_M - V_J - V_0^i)$$

Der Strom I_P setzt sich aus den Anteilen durch die obere und untere Membran zusammen:

$$I_P = \sum_i G_{JM}^i \cdot (V_M - V_J - V_0^i) + \sum_i G_{FM}^i \cdot (V_M - V_0^i)$$

Weiterhin wird angenommen, dass die Spannung V_J im Spalt konstant ist, da bei konstantem kapazitiven Strom durch das Dielektrikum die Zeitkonstante für den Abfall von V_J auf den konstanten Wert $\tau_J = \frac{C_{OX} + C_{JM}}{G_J + G_{JM}} \approx 150 \mu\text{s}$ beträgt, und dass außerdem die Na^+ - und Cl^- -Leitfähigkeiten durch die Membran keine Rolle spielen, weil die K^+ -Leitfähigkeiten G_{FM}^K und G_{JM}^K bei geöffneten Kanälen um den Faktor 1000 größer sind. Im folgenden wird zudem $G_J = \frac{1}{R_J}$ verwendet. Damit erhält man

$$V_J G_J - C_{OX} \cdot \frac{dV_S}{dt} = G_{JM}^K \cdot (V_M - V_J - V_0^K)$$

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

$$I_P = G_{JM}^K \cdot (V_M - V_J - V_0^K) + G_{FM}^K \cdot (V_M - V_0^K)$$

Auflösen der ersten Gleichung nach V_J ergibt

$$V_J = \frac{C_{OX} \frac{dV_S}{dt} + G_{JM}^K (V_M - V_0^K)}{G_J + G_{JM}^K}$$

und Einsetzen in die zweite

$$\begin{aligned} I_P &= G_{JM}^K \cdot (V_M - V_0^K) + G_{FM}^K \cdot (V_M - V_0^K) - G_{JM}^K \cdot \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \cdot (V_M - V_0^K) \\ &\quad + \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \cdot C_{OX} \frac{dV_S}{dt} \\ &= G_{JM}^K \cdot \left(1 + \frac{1}{\beta\mu} - \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \right) \cdot (V_M - V_0^K) - \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \cdot C_{OX} \frac{dV_S}{dt} \end{aligned}$$

Hier wurde mit $\mu = \frac{g_{JM}^K}{g_{FM}^K}$ das Verhältnis der spezifischen Membranleitfähigkeiten (Spalt / freie Membran) abgekürzt. Verwendet man diesen Ausdruck, um den Strom I_0 bei $\frac{dV_S}{dt} = 0$ und die Differenz ΔI zum Fall $\frac{dV_S}{dt} \neq 0$ zu berechnen, so erhält man

$$I_0 = G_{JM}^K \cdot \left(1 + \frac{1}{\beta\mu} - \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \right) \cdot (V_M - V_0^K) \quad (4.1)$$

$$\Delta I = - \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \cdot C_{OX} \frac{dV_S}{dt} \quad (4.2)$$

Beide Gleichungen lassen sich nach dem Ausdruck

$$\frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} \quad (4.3)$$

auflösen und dann gleichsetzen. Diese Gleichung wird dann nach G_{JM}^K aufgelöst.

$$1 + \frac{1}{\beta\mu} - \frac{I_0}{G_{JM}^K \cdot (V_M - V_0^K)} = \frac{-\Delta I}{C_{OX} \frac{dV_S}{dt}}$$

$$G_{JM}^K = \frac{I_0}{(V_M - V_0^K)} \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{\beta\mu} + \frac{\Delta I}{C_{OX} \frac{dV_S}{dt}}}$$

Setzt man diesen Wert in Formel 4.2 ein, so lässt sich nach G_J auflösen:

$$G_J = G_{JM}^K \cdot \left(\frac{C_{OX} \frac{dV_S}{dt}}{-\Delta I} - 1 \right)$$

Die Werte für C_{OX} und $\frac{dV_S}{dt}$ sind bekannt und $V_0^K = -80 \text{ mV}$ wurde über die K^+ -Konzentration eingestellt. Mit einem geschätzten Wert von $\beta = 0.8$ und der Annahme, dass die spezifischen Membranleitfähigkeiten in der freien und der Junctionmembran gleich sind, d. h. $\mu = 1$, lassen sich also G_{JM}^K und G_J berechnen.

4.3.3 Experimentelle Durchführung

Das Ergebnis der experimentellen Durchführung ist in Abbildung 4.16 gezeigt. Die intra- und extrazellulären Spannungspulse wurden entsprechend Abbildung 4.12 an die Zelle und den Chip angelegt (links). Die Auswertung der Daten verläuft wie erläutert, indem die Differenz des Mittelwertes der Ströme während des ersten und dritten Pulses und des Stromes während des zweiten Pulses gebildet wird (rechts).

Vergleicht man den Verlauf der Stromdifferenz ΔI mit der numerischen Simulation (Abbildung 4.15), so stellt man eine deutliche Abweichung für mittlere intrazelluläre Spannungen V_M fest. In der Simulation steigt die Kurve in diesem Bereich auf hohe Werte an, weil die extrazelluläre Spannung den Anteil der geöffneten Ionenkanäle beeinflusst. Die wahrscheinliche Ursache für das Fehlen dieses Anstiegs in der Messung wird im folgenden erklärt:

Die Dynamik der Kv1.3-Kanäle, die aus den gemessenen Stromkurven bestimmt wird, variiert von Messung zu Messung. Gründe hierfür können tatsächliche Unterschiede aufgrund von Veränderungen innerhalb der Zelle sein, aber auch die leicht variierenden Einstellungen am Patch-Clamp-Verstärker sein, die von Messung zu Messung wegen unterschiedlicher Zell- und Pipetteneigenschaften notwendig sind. Die Daten für die in der Simulation verwendete Kanaldynamik stammen aus einer anderen Messung als der hier gezeigten.

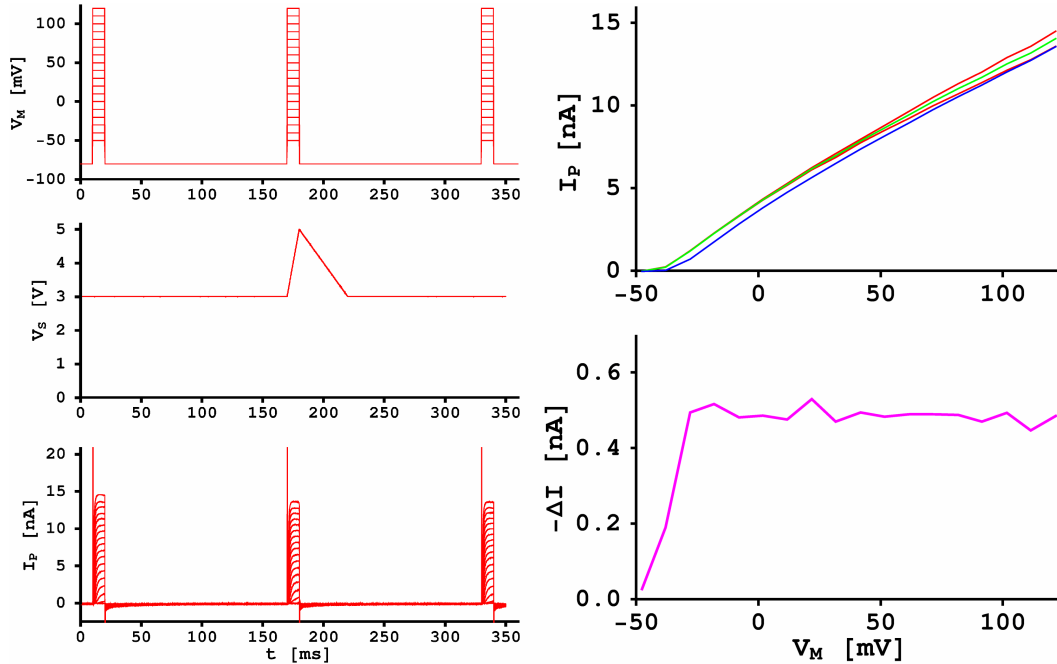


Abbildung 4.16: Links: Durchführung des Experiments (vgl. Abbildung 4.12). Oben ist die intrazelluläre Spannung V_M aufgetragen. Drei identische 10 ms-Pulse auf unterschiedliche Spannungen öffnen die Kanäle, und ein Strom I_P fließt (unten). Der mittlere Puls wird durch eine extrazelluläre Spannung überlagert, die von einer Spannungsrampe V_S am Chip erzeugt wird (Mitte).

Rechts: Die Ströme am Ende der Spannungspulse (vgl. Abbildung 4.15). Grün dargestellt ist der Mittelwert aus den Strömen am Ende des ersten und dritten Pulses, die rote Kurve zeigt den Strom am Ende des zweiten Pulses (oben). Die Differenz ΔI hat bei hohen intrazellulären Spannungen V_M einen Grenzwert. Bei geringeren Spannungen V_M sind die Messwerte aber kleiner als berechnet.

Weiterhin wurde für die Beschreibung der Kanaldynamik eine möglichst kleine Anzahl von Parametern verwendet. Dadurch ergibt sich eine Abweichung der simulierten Kurven für die Kanaldynamik von den Messwerten besonders in der Öffnungsphase der Kanäle. Dies ist in Abbildung 2.9 in Kapitel 2 zu erkennen.

Die Abweichung der gemessenen von der simulierten und Dynamik lässt sich bei einem Vergleich der Abbildungen 4.12 und 4.16 erkennen. Die Ströme steigen in den gemessenen Kurven bei niedrigen Spannungen V_M schneller auf ihren Maximalwert an. Auch der Verlauf der Gatingkurve ist flacher, was an den gleichmäßigeren Abständen der Ströme am Ende der Pulse erkennbar ist.

4.3.4 Auswertung der Daten

Die Berechnung von G_{JM}^K und G_J lässt sich nun für die oben behandelte Messung durchführen. Es werden die Werte von V_M , I_0 und ΔI aus der letzten Messkurve mit der höchsten intrazellulären Spannung verwendet. Die Spotkapazität ist im Bereich $V_S = 3\text{ V} \dots 5\text{ V}$ etwa konstant; es wird $C_{OX} = 1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ angenommen.

Die verwendeten Parameter und die aus der Messung erhaltenen Werte sind:

$$\begin{array}{ll} V_M = 121\text{ mV} & \\ I_0 = 14.0\text{ nA} & c_{OX} = 1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2} \\ \Delta I = -0.48\text{ nA} & V_0^K = -80\text{ mV} \\ \frac{dV_S}{dt} = 200 \frac{\text{V}}{\text{s}} & \beta = 0.8 \\ A_J = 700\ \mu\text{m}^2 & \mu = 1.0 \\ c_{OX} = 1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2} & \end{array}$$

Damit erhält man aus Formel 4.2:

$$\frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} = -\frac{\Delta I}{C_{OX} \cdot \frac{dV_S}{dt}} = 0.23$$

und Einsetzen in Formel 4.1 ergibt

$$G_{JM}^K = \frac{I_0}{\left(1 + \frac{1}{\beta\mu} - \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K}\right) \cdot (V_M - V_0^K)} = 34.5\text{ nS}$$

bzw.

$$g_{JM}^K = \frac{G_{JM}^K}{A_J} = 4.9 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$$

Für G_J , g_J und R_J erhält man daraus die Werte

$$G_J = 116\text{ nS}, \quad g_J = \frac{G_J}{A_J} = 16.6 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}, \quad R_J = \frac{1}{G_J} = 8.6\text{ M}\Omega.$$

Für die Spannungen $V_J^{1/2}$ im Spalt für $\frac{dV_S}{dt} = 0 \frac{\text{V}}{\text{s}}$ und $\frac{dV_S}{dt} = 200 \frac{\text{V}}{\text{s}}$ ergibt sich

$$V_J^1 = 46\text{ mV} \quad \text{und} \quad V_J^2 = 60\text{ mV}.$$

Die durch die Spannungsrampe am Chip hervorgerufene Spannungsdifferenz im Spalt beträgt also

$$\Delta V_J = 14\text{ mV} \quad \text{und die Zeitkonstante ist} \quad \tau_{OX} = 90\ \mu\text{s}.$$

4.3.5 Kanalanreicherung in der Junctionmembran

Umgekehrt kann bei einem bekannten Spaltwiderstand R_J der Parameter μ für die Kanalanreicherung in der unteren Membran bestimmt werden. Aus den Ergebnissen aus obiger Messung ergab sich

$$\frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} = 0.23$$

Nimmt man einen Spaltwiderstand von $R_J = 5 \text{ M}\Omega$ an, so erhält man für die Leitfähigkeit der unteren Membran

$$G_{JM}^K = \frac{\frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K}}{1 - \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K}} \cdot G_J = 0.30 \cdot \frac{1}{5 \text{ M}\Omega} = 59 \text{ nS}.$$

Setzt man diese beiden Werte in Formel 4.1 ein, so folgt

$$\frac{1}{\beta\mu} = \frac{I_0}{G_{JM}^K (V_M - V_0^K)} + \frac{G_{JM}^K}{G_J + G_{JM}^K} - 1 = \frac{14.0 \text{ nA}}{59 \text{ nS} \cdot 201 \text{ mV}} + 0.23 - 1 = 0.40$$

Damit ergibt sich für die Anreicherung $\mu = \frac{g_{JM}^K}{g_{FM}^K}$ der Kanäle in der Junctionmembran:

$$\mu = \frac{\beta\mu}{\beta} = \frac{2.48}{0.8} = 3.1$$

Allerdings sollte dieser Berechnung nicht zu viel Vertrauen geschenkt werden, da entsprechend den Regeln der Fehlerfortpflanzung die Abweichung des Wertes für die Anreicherung bei Änderung des Spaltwiderstandes mit $\frac{\partial\mu}{\partial R_J} = -1.8/\text{M}\Omega$ sehr hoch ist. Der Fehler in R_J wirkt sich also sehr stark auf den berechneten Wert der Anreicherung aus. Für niedrigere Werte von R_J steigt der Fehler sogar noch viel höher an, für $R_J = 4.0 \text{ M}\Omega$ erhält man $\frac{\partial\mu}{\partial R_J} = -10.3/\text{M}\Omega$. Das Berechnungsbeispiel sollte lediglich verdeutlichen, dass je nach Wahl der festen Größen im Modell zwei andere Größen als freie Parameter gewählt und berechnet werden können (in diesem Fall die Leitfähigkeit der unteren Membran und der Spaltwiderstand bzw. das Anreicherungsverhältnis der Kanäle).

4.3.6 Berücksichtigung der Elektrodifffusion

Wird in der numerischen Simulation die Elektrodifffusion berücksichtigt, so ergeben sich abweichende Verläufe der Stromdifferenz ΔI . In Abbildung 4.17 oben wird die bereits in Abschnitt 4.3.1 simulierte Kurve für ΔI (durchgezogene Linie) mit der unter Berücksichtigung der Elektrodifffusion berechneten Kurve (gestrichelte Linie) verglichen.

Zusätzlich zu ΔI sind die Spannungsdifferenz ΔV_J , die sich entsprechend der Stromdifferenz als die Differenz der Spannungen V_J im Spalt bei den Pulsen mit und ohne extrazelluläre Spannung definieren lässt, und der spezifische Spaltwiderstand ρ_J dargestellt.

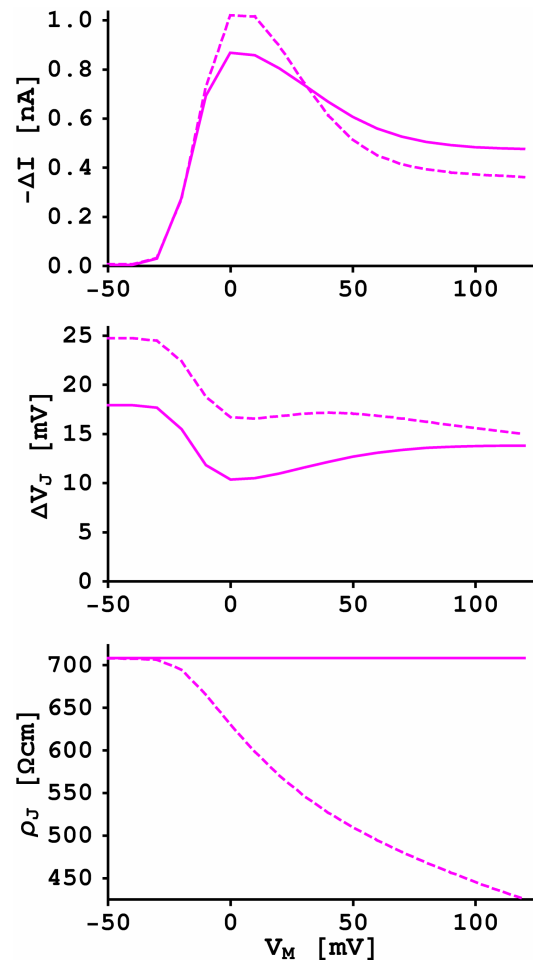
Die Abweichungen sind zurückzuführen auf den Anstieg der K^+ -Ionenkonzentration im Spalt aufgrund des K^+ -Stromes durch die Membran. Der spezifische Widerstand ρ_J im Spalt fällt dadurch auf fast die Hälfte seines Wertes ab. Durch die Abhängigkeit des K^+ -Umkehrpotentials V_{J0}^K von der K^+ -Konzentration im Spalt ändert sich bei gleichen Spannungen in der Zelle und im Spalt der Strom durch die Membran. Außerdem ergibt sich

Abbildung 4.17: Vergleich der Simulation ohne (durchgezogene Linien) und mit Berücksichtigung der Elektrodifffusion (gestrichelte Linien).

Oben: Die Stromdifferenz ΔI weicht noch stärker von den Ergebnissen des Experiments (vgl. Abbildung 4.16) ab, wenn die Elektrodifffusion berücksichtigt wird.

Mitte: Die Spannungsdifferenz ΔV_J im Spalt zwischen den Pulsen mit und ohne extrazelluläre Spannung ist bei Berücksichtigung der Elektrodifffusion höher. Ursache hierfür ist die Spannung, die bei der Diffusion der Ionen entlang des Spalts entsteht.

Unten: Der spezifische Widerstand im Spalt sinkt bei Berücksichtigung der Elektrodifffusion stark ab, weil K^+ -Ionen aus der Zelle in den Spalt fließen.



durch die Diffusion der Ionen aufgrund des Konzentrationsunterschieds zwischen Spalt und Bad ein zusätzlicher Beitrag zur Spannung V_J .

Durch die logarithmische Abhängigkeit des K^+ -Umkehrpotentials V_{J0}^K von der Konzentration der K^+ -Ionen im Spalt ist es nicht möglich, aus den Ergebnissen die Spannung V_J und die Leitfähigkeit g_J im Spalt zu berechnen. Die einzige Möglichkeit, aus den gemessenen Daten auf die Modellparameter zurückzuschließen, ist ein Vergleich der simulierten Kurven mit den gemessenen Daten.

Um entscheiden zu können, inwiefern das Modell mit der Elektrodifffusion eine zutreffende Beschreibung des Systems liefert, ist die Messung einer weiteren Größe außer den Strömen I_P und ΔI_P nötig. Das Ansteigen der Leitfähigkeit g_J im Spalt ließe sich mit einer gleichzeitigen Messung vom Strom I_P mit der Patch-Clamp-Methode und der Spannung V_{JM} über die untere Zellmembran (z. B. mittels spannungsabhängiger Fluoreszenzfarbstoffe oder Transistoren auf dem Chip) bestätigen.

4.4 Öffnen der Kanäle

Es wurde nun auf verschiedene Weisen gezeigt, dass sich durch Spannungsänderungen am Chip eine Spannung im Spalt erzeugen lässt. Die Messungen wurden aber entweder ohne Ionenkanäle durchgeführt (spannungsabhängige Farbstoffe) oder bei vollständig geöffneten Kanälen (Kombination mit intrazellulären Pulsen). Im folgenden wird demonstriert, dass die Spannung im Spalt auch zum Öffnen der Ionenkanäle eingesetzt werden kann.

Das zentrale Experiment besteht im Öffnen der Kanäle durch eine steile Spannungsrampe. Der gemessene Pipettenstrom erlaubt dabei eine direkte Beobachtung des Öffnungsprozesses. Die gemessenen Stromkurven lassen sich numerisch modellieren.

Dass es sich bei dem gemessenen Strom nicht um einen Leckstrom handelt, der durch Elektroporation der Membran entsteht, lässt sich durch Applikation des Kanalgifts Margatoxin zeigen, welches spezifisch den Kanal Kv1.3 blockiert.

Zwei Experimente belegen, dass die Kanaleigenschaften erhalten bleiben: Erstens eine Bestimmung der Gatingkurve der Kanäle in der unteren Membran durch die extrazelluläre Spannung; dabei kann entweder der Strom während der Spannungsrampe am Chip gemessen und ausgewertet werden oder durch einen nachfolgenden intrazellulären Spannungspuls der Öffnungszustand der Kanäle bestimmt werden. Zweitens wird die Zeitkonstante beim Schließen der durch die extrazelluläre Spannung geöffneten Kanäle gemessen.

Bei einer Veränderung des intrazellulären Haltepotentials verschieben sich die Stromkurven aufgrund der geänderten Membranspannung. Dies zeigt, dass die Wirkung der intra- und extrazellulären Spannung auf die Ionenkanäle nicht zu unterscheiden ist.

4.4.1 Messung und Simulation

Die Spannung, die im Spalt durch die Spannungsrampen am Chip entsteht, kann die Ionenkanäle direkt öffnen. Um hohe extrazelluläre Spannungen zu erreichen, muss eine hohe Steigung der Rampen am Chip gewählt werden. Soll die Spannung V_{JM} über die untere Membran größer als 0 mV sein, so muss bei einer Zeitkonstante von $\tau_{OX} = 70 \mu\text{s}$ die Steigung mindestens $\frac{\Delta V_S}{\Delta t} = 1.2 \frac{\text{V}}{\text{ms}}$ sein. Für die Pulse am Chip wurde deshalb eine Dauer von $\Delta t = 5 \text{ ms}$ und ein Spannungsintervall von $\Delta V_S = 2 \text{ V} \dots 7 \text{ V}$ gewählt.

Da die Steigung negativ sein muss und die Spannung am Chip nicht unter 0 V fallen darf (weil dies zur Zerstörung des Dielektrikums führt), liegt am Chip eine positive Spannung an, die dann innerhalb von $\Delta t = 5 \text{ ms}$ auf 0 V abfällt und dann innerhalb von 45 ms wieder auf den Anfangswert steigt (Abbildung 4.18).

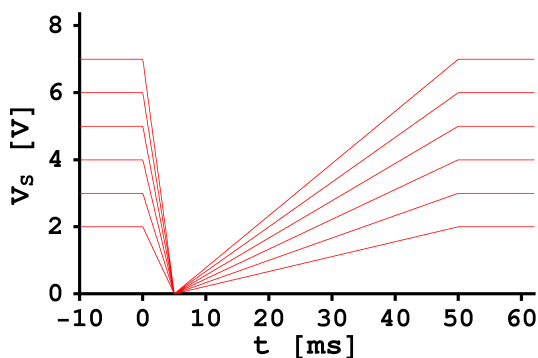


Abbildung 4.18: Die Spannungspulse am Chip dauern insgesamt 50 ms. Nur die erste kurze Phase ist für das Öffnen der Kanäle relevant. Die Amplitude der Pulse variiert von 2 V bis 7 V.

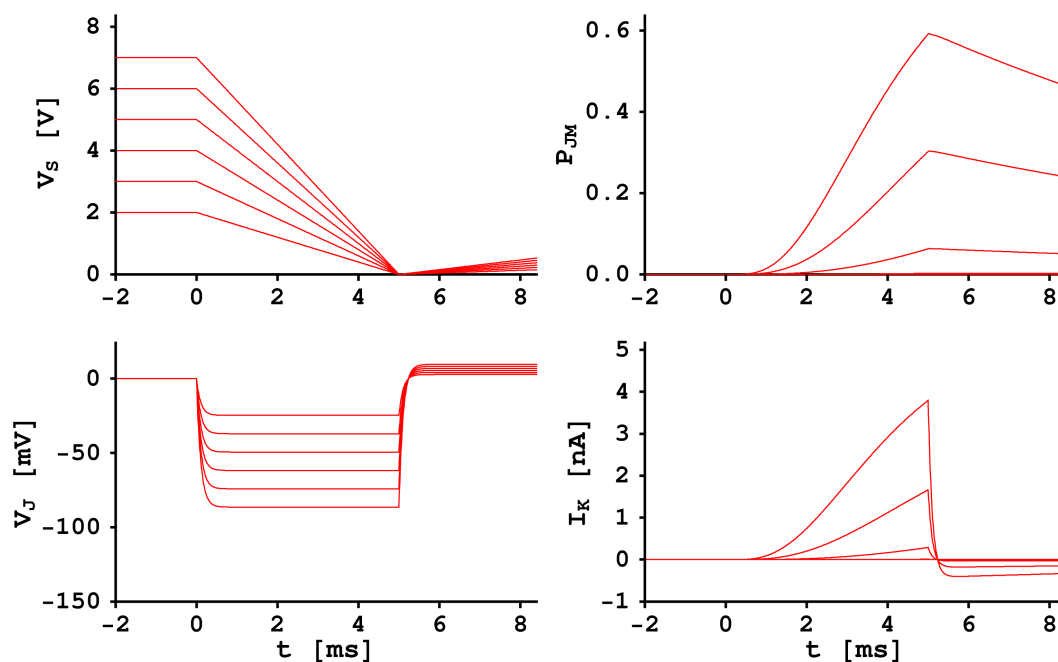


Abbildung 4.19: Simulation des Öffnens der Kanäle.

Bevor das Ergebnis des Experiments gezeigt wird, wird eine einfache numerische Simulation durchgeführt (Abbildung 4.19). Aus den Spannungsrampen V_S am Chip wurde über das Punktkontaktmodell die Spannung V_J im Spalt berechnet (links). Es wurde hierfür das einfachste elektrische Modell ohne Elektrodifffusion, ohne spannungsabhängige Spotkapazität und ohne Ionenkanäle verwendet. Man sieht, dass V_J proportional zur Steigung der Spannung am Chip ansteigt. Bei $V_J = -100$ mV ergibt sich $V_{JM} = 20$ mV, weil die intrazelluläre Spannung $V_M = -80$ mV beträgt.

Aus der Spannung V_J lässt sich aus den Differentialgleichungen für die Kanäle ihr Öffnungszustand P_{JM} berechnen. Nimmt man nun für die untere Membran eine maximale K^+ -Leitfähigkeit von $G_{JM}^K = 75$ nS an, so erhält man den K^+ -Strom I_K durch die untere Membran (Abbildung 4.19 rechts). Die kapazitiven Ströme fehlen hier.

Jetzt wird das entsprechende Experiment durchgeführt. Die Spannung am Chip und in der Zelle werden wie oben gewählt. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Die Steigungen der Rampen in der Spannung V_S am Chip betragen $\frac{\Delta V_S}{\Delta t} = 0.4 \dots 1.4 \frac{V}{s}$ (oben). Der Strom I_P durch die Pipette wird im Patch-Clamp-Verstärker gemessen. Weil die intrazelluläre Spannung auf den Wert $V_M = -80$ mV geklemmt ist, sind die Kanäle der oberen Membran geschlossen. Der gemessene Strom fließt also nur durch die Kanäle der unteren Membran.

Gegenüber des Kurvenverlaufs, welcher in Abbildung 4.19 aus der Simulation hervorgeht, lassen sich deutliche Abweichungen feststellen. Die Ursachen dafür sind die Elektrodifffusion, die hohe Leitfähigkeit der Kanäle und die spannungsabhängige Spotkapazität. Die Auswirkungen auf die Spannung V_J im Spalt werden im folgenden getrennt untersucht.

Die stärksten Abweichungen zwischen den gemessenen und den simulierten Kurven werden durch die Spannungsabhängigkeit der Spotkapazität verursacht (vgl. Abschnitt 3.1.4). Bei $V_{OX} = 0$ V liegt die spezifische Kapazität bei $2.5 \frac{\mu F}{cm^2}$, fällt auf $1.2 \frac{\mu F}{cm^2}$ bei 2 V ab und

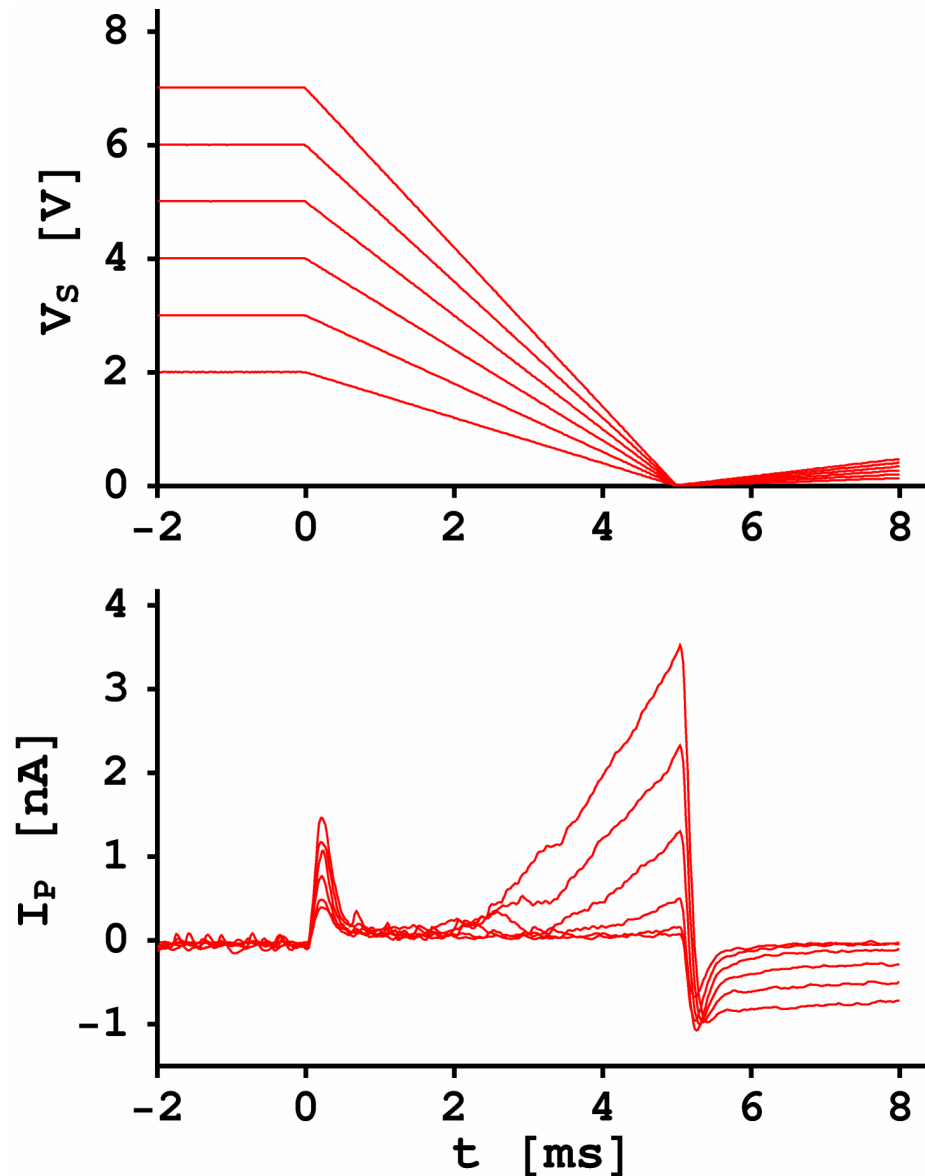


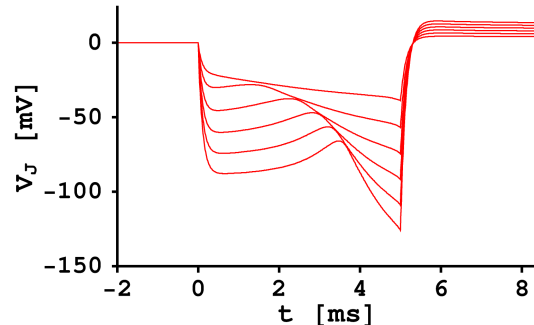
Abbildung 4.20: Die Ionenkanäle der unteren Zellmembran öffnen sich durch die extrazelluläre Spannung, die im Spalt durch die Spannung V_S am Chip erzeugt wird. Der Strom I_P durch die Kanäle wird mit dem Patch-Clamp-Verstärker gemessen. Die Messung wurde auf Chips mit 20 nm TiO_2 durchgeführt. Die Abweichungen von des in Abbildung 4.19 berechneten Kurvenverlaufs für den Strom sind auf die Elektrodiffusion, die hohe Leitfähigkeit der Kanäle und die spannungsabhängige Spotkapazität zurückzuführen.

steigt für höhere Spannungen auf einen Wert von etwa $1.5 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ an. Wird an den Chip eine Spannungsrampe angelegt, überträgt sich diese Spannungsabhängigkeit auf die Zeitkonstante τ_{OX} und damit auf die Spannung V_J im Spalt. Berechnet man die Spannung V_J (ausgehend vom einfachen Punktkontaktmodell) unter Berücksichtigung dieses Effektes, erhält man den in Abbildung 4.21 dargestellten Verlauf. Die Spannung V_J hat erstens Einfluss auf die Ionenkanäle und erzeugt zweitens noch einen zusätzlichen kapazitiven Strom,

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

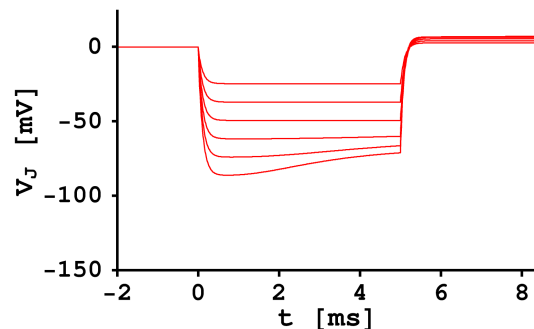
der auch bei geschlossenen Kanälen zu beobachten ist. Die S-förmige Krümmung und der starke Anstieg am Ende in einigen der gemessenen Kurven sind dadurch also zu erklären.

Abbildung 4.21: Die Spannungsabhängigkeit der Spotkapazität überträgt sich auf die Zeitkonstante τ_{OX} und damit auf die Spannung V_J im Spalt.



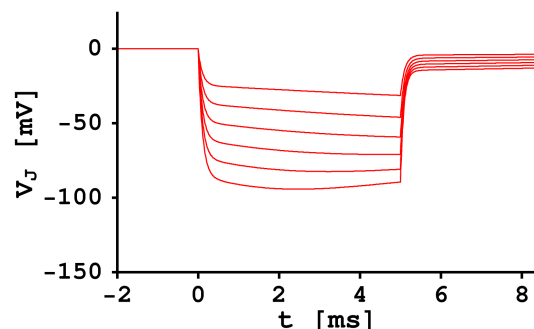
Sobald die Ionenkanäle der unteren Zellmembran sich öffnen, vergrößert sich die Leitfähigkeit der Membran um einen Faktor von bis zu 1000. Sie liegt dann im Bereich der Spaltleitfähigkeit, und die Zeitkonstante verringert sich wegen $\tau_{OX} = C_{OX}/(G_J + G_{JM})$. Die Spannung im Spalt sinkt ab (Abbildung 4.22).

Abbildung 4.22: Wenn die Ionenkanäle sich öffnen, steigt die Leitfähigkeit der unteren Membran, und die Spannung im Spalt sinkt ab.



Die Elektrodifffusion der Ionen entlang des Spalts zwischen Chip und Zelle wirkt auf die unterschiedlichen Ionensorten (K^+ , Na^+ , Cl^-) im Spalt. Das zugrunde liegende Modell wurde in Abschnitt 2.1.3 vorgestellt. Durch die negative Spannung im Spalt werden positive Ionen (K^+ , Na^+) in den Spalt gezogen und in Gegenzug negative (Cl^-) Ionen hinausgedrängt. Da die negativen Ionen einen höheren Diffusionskoeffizienten haben als die positiven, sinkt die Leitfähigkeit des Elektrolyten im Spalt. Weil sich die Zeitkonstante $\tau_{OX} = R_J C_{OX}$ deshalb auch ändert, fällt die negative Spannung V_J im Spalt während einer negativen Spannungsfanke am Chip noch weiter ab (vgl. Abbildung 4.23). Ein zusätzlicher Effekt ergibt sich durch die Elektrodifffusion, wenn die Ionenkanäle der unteren Membran sich öffnen. Dann erhöhen die K^+ -Ionen die Leitfähigkeit im Spalt, und die Spannung V_J sinkt.

Abbildung 4.23: Berücksichtigt man die Elektrodifffusion der Ionen, so ergeben sich weitere geringe Abweichungen im Spannungsverlauf von V_J . Die Abweichungen werden größer, wenn zusätzlich der Ionenfluss durch die Membran berücksichtigt wird.



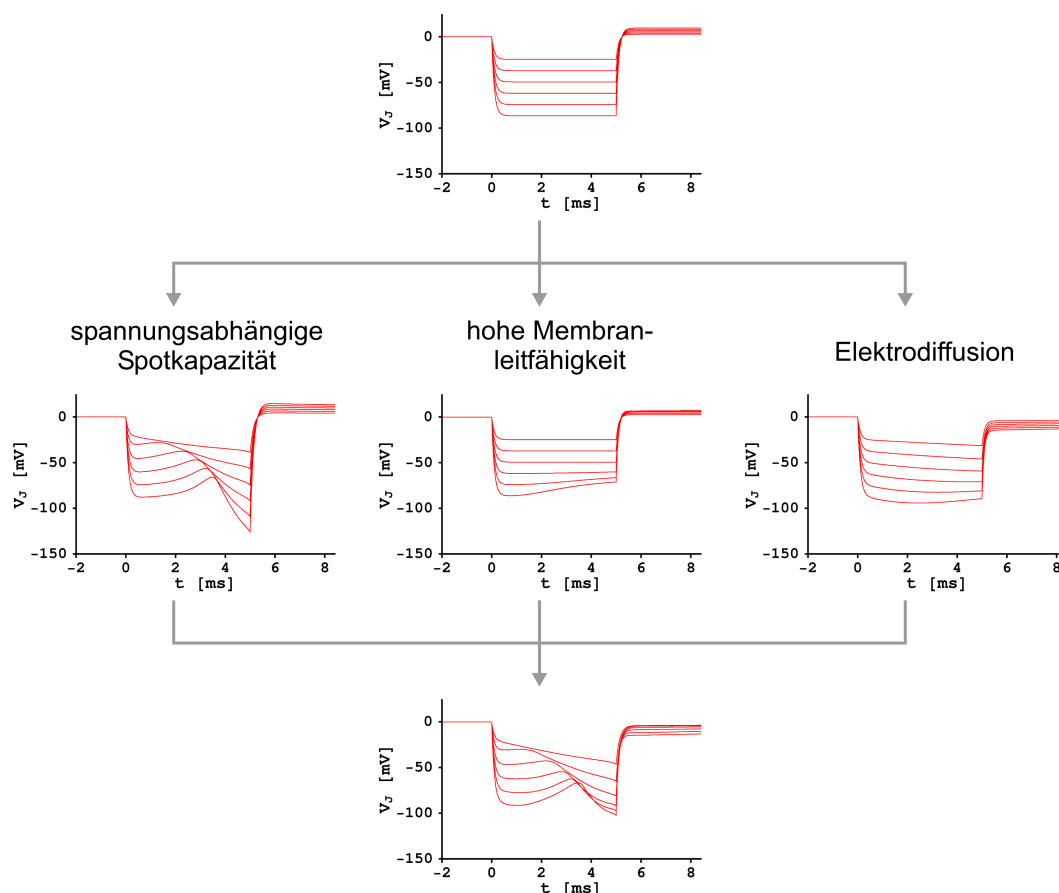


Abbildung 4.24: Übersicht über die drei Effekte, die zur Form der Spannung V_J im Spalt beitragen.

In Abbildung 4.24 sind die Einflüsse von der spannungsabhängigen Spotkapazität, den hohen Membranleitfähigkeiten und der Elektrodifffusion auf die Form der Spannung V_J in einer Übersicht zusammengestellt. Unten ist die Spannung V_J gezeigt, wie sie sich bei Berücksichtigung aller drei Effekte aus der numerischen Simulation ergibt. Die Parameter für die Simulation wurden manuell so angepasst, dass der Strom mit den Messkurven möglichst gut übereinstimmt. Folgende Werte wurden verwendet:

A_J		$616 \mu\text{m}^2$ ($r_J = 14 \mu\text{m}$)
β		0.8
d_J		50 nm
$c_{in/out}^K$		140/7.4 mM
$c_{in/out}^{Na}$		1.0/4.0 mM
$c_{in/out}^{Cl}$		141/11.4 mM
g_M^K	(Kanäle)	$14 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$
$g_M^{K/Na/Cl}$	(Leck)	$0.01 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$

Die negativen Spannungen nach dem Puls konnten nur durch eine höhere K^+ -Konzentration modelliert werden (im Na^+ -freien Medium wurde der pH-Wert mit KOH einge-

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

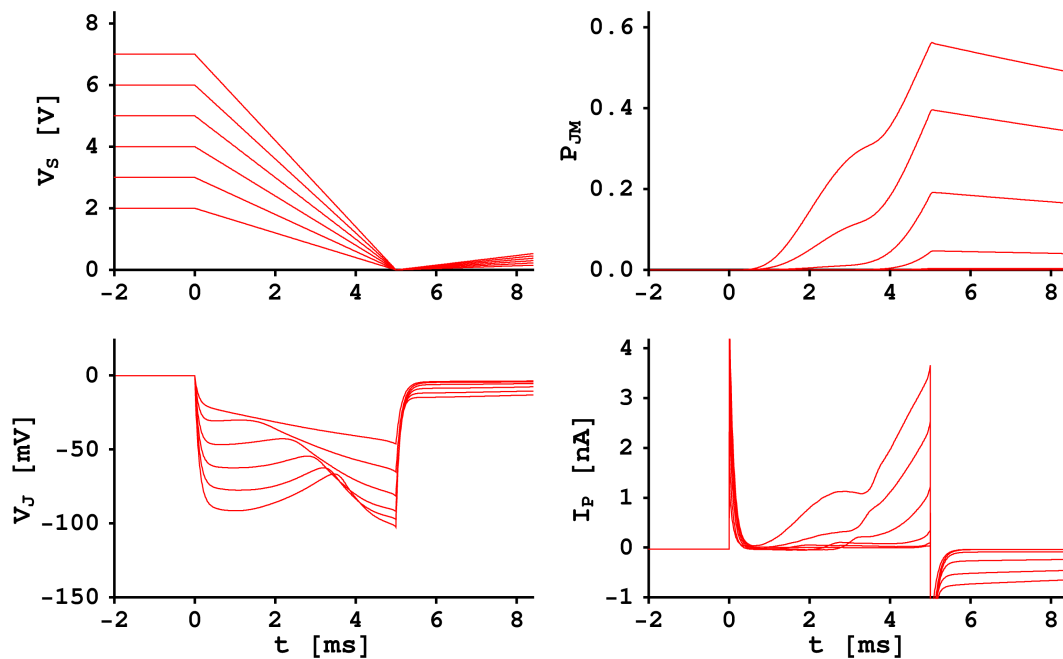
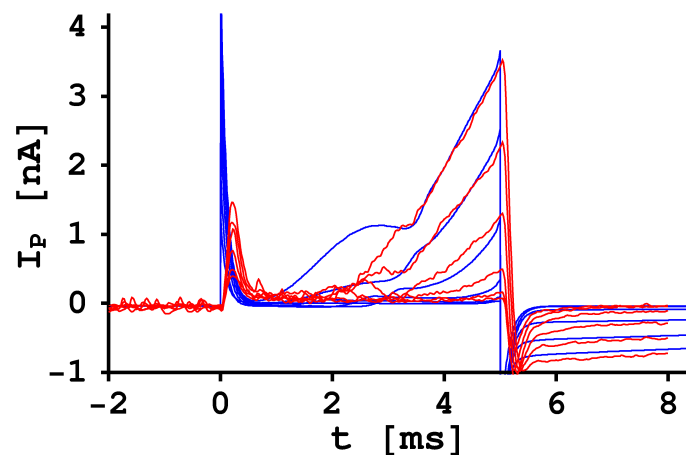


Abbildung 4.25: Simulation des Öffnens der Kanäle unter Berücksichtigung der spannungsabhängigen Spotkapazität, der hohen Membranleitfähigkeiten und der Elektrodifffusion.

stellt und damit die K^+ -Konzentration erhöht). Die weiteren unbekannt Parameter, die Einfluss auf das Ergebnis haben, sind der Radius der Adhäsionsfläche r_J , der Abstand Zelle–Chip d_J und die Membranleitfähigkeit g_M^K . Es gibt mehrere verschiedene Parametersätze, die ähnliche Kurvenscharen liefern. Das Ergebnis der Simulation ist in Abbildung 4.25 gezeigt. In Abbildung 4.26 sind die Verläufe des Stromes I_P aus der Messung und der Simulation gemeinsam dargestellt. Mögliche Ursachen für die Abweichungen sind unterschiedliches Gatingverhalten der Kanäle in Simulation und Messung, das frequenzabhängige Verhalten der Spotkapazität und eine falsche Wahl der Parameter. Die Übereinstimmung ist jedoch wesentlich besser als mit den Kurven aus der ersten Simulation (Abbildung 4.19).

Abbildung 4.26: Vergleich der Simulation (blau) mit der Messung (rot). Die Abweichungen sind deutlich, aber wesentlich geringer als ohne die Berücksichtigung der spannungsabhängigen Spotkapazität, der hohen Membranleitfähigkeit und der Elektrodifffusion.



4.4.2 Blockierung der Kv1.3-Kanäle mit Margatoxin

Dass die durch extrazelluläre Stimulation verursachte Leitfähigkeit der unteren Membran auf K^+ -Kanäle, speziell auf den Kanal Kv1.3 zurückzuführen ist, lässt sich durch das folgende Experiment bestätigen. Die Kanäle werden durch das Kv1.3-spezifische Kanalgift Margatoxin blockiert. Margatoxin ist ein Peptid mit 39 Aminosäuren, welches ab Konzentrationen von 500 pM (extrazellulär) den Kanal Kv1.3 vollständig blockiert [GC93]. Durch einen Vergleich der Messkurven mit und ohne K^+ -Leitfähigkeiten wird klar, dass durch die extrazelluläre Stimulation nur die Ionenkanäle geöffnet werden und keine sonstige Veränderung der Membranleitfähigkeit eintritt.

Im Experiment wurde an den Chip ($c_{OX} = 1.5 \frac{\mu F}{cm^2}$) eine Spannungsrampe mit $\Delta V_S = -6 V$ und $\Delta t = 4.5 ms$ angelegt. 0.5 ms nach Beendigung des extrazellulären Pulses wurde das Zellinnere auf $V_M = 30 mV$ depolarisiert. Die Filterung der Messung fand bei 5 kHz statt. Die Zugabe von Margatoxin in den Elektrolyten geschah mittels einer Pipette direkt in den Meniskus zwischen dem Messchip und dem Wasserobjektiv. Die Konzentration im Medium betrug nach Zugabe etwa 20 nM (Zugabe 30 μl zu 1.5 ml Medium, Konzentration 1 μM).

In Abbildung 4.27 oben werden die Messkurven mit (blau) und ohne (schwarz) extrazellulären Stimulus verglichen. Zu Beginn des intrazellulären Depolarisationspulses sind die Kanäle nach dem extrazellulären Puls zum Teil geöffnet (positiver Offset der Kurve nach $t = 50 ms$). Auch während des extrazellulären Pulses fließt ein Strom von einigen nA durch die Kanäle der unteren Zellmembran. Das untere Diagramm zeigt den Vergleich vor (blau) und nach (rot) Zugabe von Margatoxin. Nach Zugabe von Margatoxin sind nur noch die kapazitiven Ströme zu sehen. Dies bedeutet, die Ströme durch die Leitfähigkeiten sind allein durch die K^+ -Leitfähigkeit des Kv1.3-Kanals entstanden, da Margatoxin sehr selektiv nur diesen Kanal blockiert.

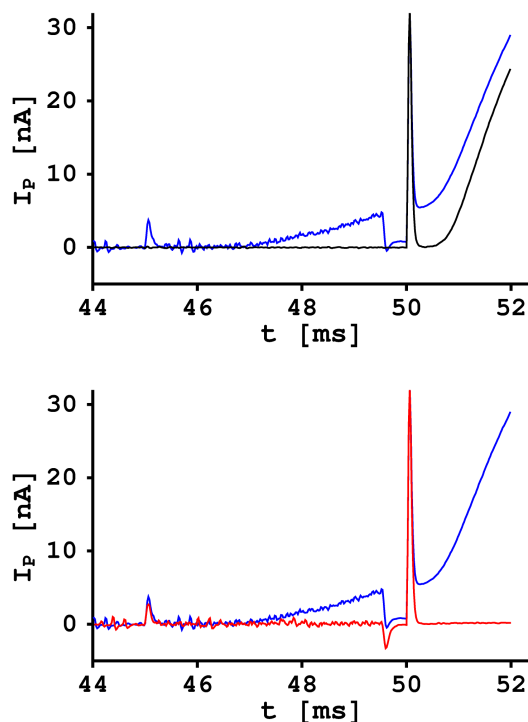


Abbildung 4.27: Blockierung der Kv1.3-Kanäle durch Margatoxin.

Oben: Vergleich einer Messung mit extrazellulärer Stimulation und ohne. Ab $t = 50 ms$ werden alle Kanäle durch intrazelluläre Depolarisation auf $V_M = 30 mV$ geöffnet. Die durch den extrazellulären Reiz geöffneten Kanäle verursachen einen Offsetstrom zu Beginn des intrazellulären Pulses.

Unten: Wird Margatoxin appliziert, verschwinden alle K^+ -Leitfähigkeiten. Nur die kapazitiven Ströme bleiben erhalten.

4.4.3 Messung der Gatingkurve durch extrazelluläre Stimulation

Wird die Leitfähigkeit der Kanäle gegenüber der des Spalts vernachlässigt, so steigt die Membranspannung proportional zur Steigung der Spannungsrampen am Chip. Trägt man die Leitfähigkeit der unteren Zellmembran am Ende des Pulses auf gegen die Spannung im Spalt, so ergibt sich daraus die „Gatingkurve“ des Kanals nach der Dauer Δt der Spannungsrampe (die eigentliche Gatingkurve eines Kanals gilt für $t \rightarrow \infty$).

Eine sinnvolle Gatingkurve lässt sich nur bestimmen, wenn bei der maximalen Spannung alle Kanäle geöffnet sind. Um die dafür notwendigen hohen extrazellulären Spannungen zu erreichen, wurden sehr steile Spannungsrampen von $\Delta t = 2$ ms Dauer über ein Intervall von $\Delta V_S = -3$ V ... -9 V an den Chip (Spotkapazität von $1 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$) angelegt. Sie führten zu Strömen von bis zu 10 nA (links).

Es ergeben sich Steigungen am Chip von $\frac{\Delta V_S}{\Delta t} = -1.5 \dots -4.5 \frac{\text{V}}{\text{s}}$. Die Stromkurve $I_P^{2\text{ms}}(\frac{\Delta V_S}{\Delta t})$ lässt sich in die Gatingkurve $G_{JM}^{2\text{ms}}(V_{JM})$ umrechnen (Abbildung 4.28 rechts). Bei einer Zeitkonstante von $\tau_{OX} = 50 \mu\text{s}$ liegt im Spalt eine Spannung von $V_J = -75 \dots -225$ mV an. Der Wert der Leitfähigkeit von 40 nS entspricht durchschnittlichen Werten. Der Verlauf zeigt gute Übereinstimmung mit der Kurve, welche sich aus der Kanaldynamik für die Gatingkurve nach $\Delta t = 2$ ms ergibt (blau gestrichelt).

Insbesondere bedeutet dies, dass die Dynamik des Kv1.3-Ionenkanals in der adhärenierten Membran gleich derjenigen in der freien Membran ist. Die Funktionalität der Ionenkanäle wird durch die Adhäsion also nicht beeinträchtigt.

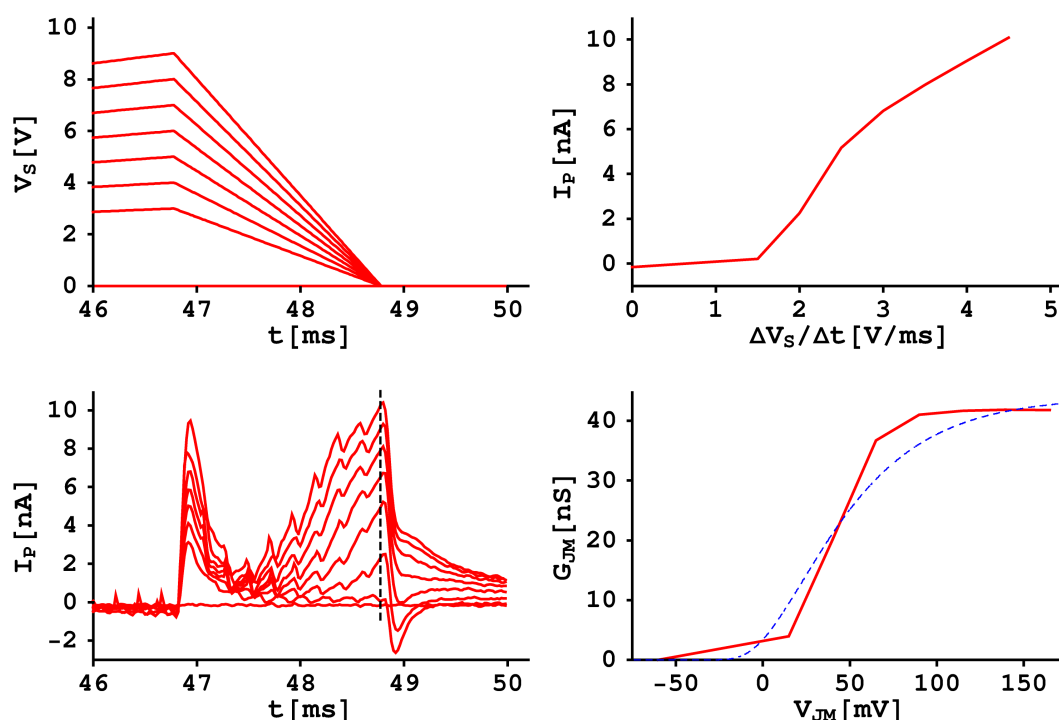


Abbildung 4.28: Links: Bei Steigungen von bis zu $\frac{\Delta V_S}{\Delta t} = -4.5 \frac{\text{V}}{\text{s}}$ fließen nach 2 ms Ströme von bis zu 10 nA (gestrichelte Linie). Die Kanäle der unteren Zellmembran sind dann vollständig geöffnet. Rechts: Die Ströme nach der Zeit $\Delta t = 2$ ms und die Steigung $\frac{\Delta V_S}{\Delta t}$ lassen sich umrechnen in die Leitfähigkeit G_{JM} und die Spannung V_{JM} über die untere Zellmembran. Der Vergleich mit der aus der Kanaldynamik berechneten Kurve (blau) zeigt eine gute Übereinstimmung.

4.4.4 Nachträgliches Öffnen durch intrazelluläre Spannung

Die Kanäle schließen sich nicht sofort, nachdem sie durch die extrazelluläre Stimulation geöffnet wurden. Durch einen intrazellulären depolarisierenden Spannungspuls lässt sich nach Beendigung des Stimulationspulses der Anteil der offenen Kanäle der unteren Membran bestimmen. Der Puls öffnet alle Kanäle der Zelle, sowohl die der unteren als auch die der oberen Membran. Der Offset der Stromkurven am Beginn des Testpulses entspricht dem Anteil der Kanäle, welche durch den extrazellulären Puls bereits geöffnet wurden (Abbildung 4.29 oben).

Der Strom nach dem Abklingen des kapazitiven Peaks wurde bestimmt (gestrichelte Linie). Der Offsetstrom, welcher ohne vorhergehende extrazelluläre Stimulation gemessen wurde (unterste Kurve), wurde von den anderen Werten zur Korrektur des Leckstromes abgezogen. Aus dem so bestimmten Strom, der Klemmspannung $V_M = 30$ mV und dem Umkehrpotential lässt sich die Leitfähigkeit der unteren Membran zu Beginn des intrazellulären Pulses bestimmen. Aufgetragen gegen die Spannung V_{JM} während dem extrazellulären Reiz ergibt sich die in Abbildung 4.29 unten rot dargestellte Kurve.

Falls die Leitfähigkeit sich nach dem extrazellulären Puls nicht geändert hat, sollte die während des extrazellulären Pulses bestimmte Leitfähigkeit (blau) mit derjenigen über-

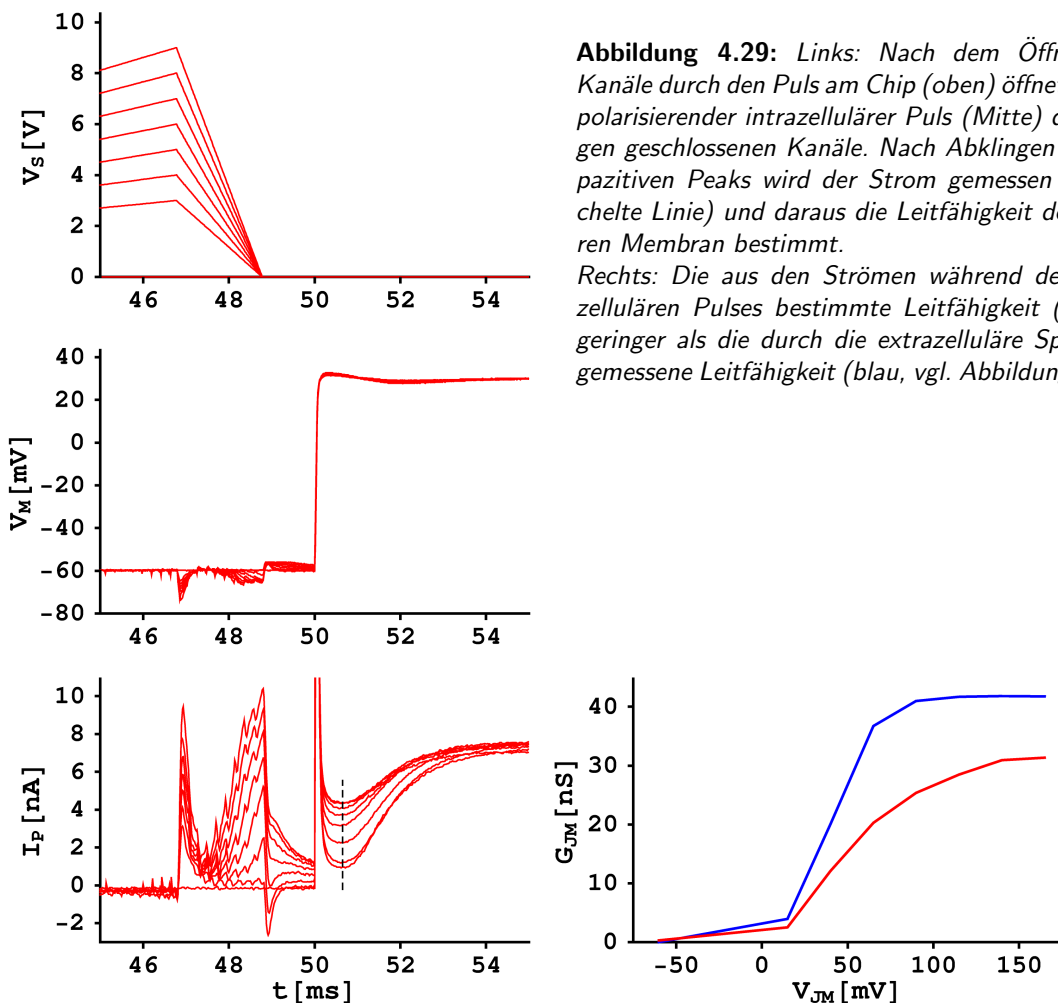


Abbildung 4.29: Links: Nach dem Öffnen der Kanäle durch den Puls am Chip (oben) öffnet ein depolarisierender intrazellulärer Puls (Mitte) die übrigen geschlossenen Kanäle. Nach Abklingen des kapazitiven Peaks wird der Strom gemessen (gestrichelte Linie) und daraus die Leitfähigkeit der unteren Membran bestimmt.

Rechts: Die aus den Strömen während des intrazellulären Pulses bestimmte Leitfähigkeit (rot) ist geringer als die durch die extrazelluläre Spannung gemessene Leitfähigkeit (blau, vgl. Abbildung 4.28).

einstimmen, die während des folgenden intrazellulären Testpulses gemessen wird (rot). Die offensichtliche Abweichung könnte mehrere Ursachen haben: 1. Es ist möglich, dass der Testpuls auf +30 mV den Kanal nicht so weit öffnet wie die extrazelluläre Spannung (bis zu +170 mV); vor allem die Kanäle der unteren Membran sind wegen der Verschiebung von V_{JM} durch den Spannungsabfall über den Spalt nicht ganz geöffnet. 2. Der Spannungspuls am Chip verschiebt das Umkehrpotential im Spalt zu positiveren Werten (wegen Anreicherung von K^+ im Spalt); dadurch wird der Strom bei hohen Spannungen V_{JM} (extraz. Puls) weniger abgesenkt als bei niedrigeren Spannungen (intraz. Puls).

Weiterhin lässt sich aus den gemessenen Kurven das Verhältnis $\beta\mu$ von den Zahlen der Kanäle in der unteren und oberen Membran bestimmen (β =Flächenverhältnis, μ =Anreicherung). In der untersten Messkurve von I_P in Abbildung 4.29 sind alle Kanäle zu Beginn des intrazellulären Testpulses geschlossen, in der obersten Kurve sind alle Kanäle der unteren Membran geöffnet. Nach einigen ms öffnen sich auch die Kanäle der oberen Membran. Für das Verhältnis der Kanalzahlen ergibt sich

$$\beta\mu = \frac{4.346 \text{ nA} - 0.928 \text{ nA}}{7.397 \text{ nA} - 4.346 \text{ nA}} = 1.12$$

Da bei sehr flachen Zellen beinahe $\beta = 1$ gilt, ist auch $\mu \approx 1$, es liegt also keine Anreicherung der Kanäle in der unteren Membran vor.

4.4.5 Messung des Schließens der Kanäle

Schließt man die Ionenkanäle der unteren Membran durch Hyperpolarisation auf einen Wert deutlich unterhalb des K^+ -Umkehrpotentials $V_K = -80 \text{ mV}$, so lässt sich ein negativer Strom durch die Ionenkanäle messen. Die Kanäle schließen aufgrund der negativen Spannung über die Membran, und der Strom fällt auf Null ab. Die Dynamik des Schließens besteht in einem exponentiellen Abfall der K^+ -Leitfähigkeit mit einer spannungsabhängigen Zeitkonstante τ_c .

Im Experiment von Abbildung 4.30 wurden die Ionenkanäle der unteren Membran durch Stimulationspulse am Chip mit $\Delta t = 2 \text{ ms}$ und $\Delta V_S = -5 \dots -10 \text{ V}$ geöffnet. Danach (ab $t = 50 \text{ ms}$) erfolgen intrazelluläre Testpulse auf $V_M = +40 \text{ mV}$ (blau) bzw. $V_M = -130 \text{ mV}$ (rot). Die Zeitkonstanten der Ströme ab $t = 51 \text{ ms}$ lassen sich durch Anfitzen einer Exponentialfunktion bestimmen. Der Wert von $\tau_c = 2.3 \pm 0.4 \text{ ms}$ für die Kurven mit Amplituden $> 200 \text{ pA}$ entspricht dem in einer anderen Messung bestimmten Wert $\tau_c = 2.2 \text{ ms}$ für das Schließen der Kv1.3-Kanäle bei -130 mV .

4.4.6 Variation des Haltepotentials

Die Spannung V_{JM} über die untere Zellmembran wird durch die Spannungen V_J im Spalt und V_M in der Zelle bestimmt. Bleibt die Spannung im Spalt dieselbe, wirkt sich eine Variation des Haltepotentials V_M auf das Öffnen der Kanäle aus. Hohe intrazelluläre Spannungen erleichtern das Öffnen der Kanäle.

In Abbildung 4.31 ist ein Experiment gezeigt, in welchem bei konstantem extrazellulären Reiz ($\Delta t = 5 \text{ ms}$, $\Delta V_S = -5 \text{ V}$) das Haltepotential von $V_M = -100 \text{ mV}$ bis $V_M = -45 \text{ mV}$ variiert wurde. Je höher das Potential innerhalb der Zelle liegt, desto mehr Kanäle öffnen sich, und der Strom steigt. Auch während des nachfolgenden intrazellulären Testpulses sind die geöffneten Kanäle als Offset erkennbar.

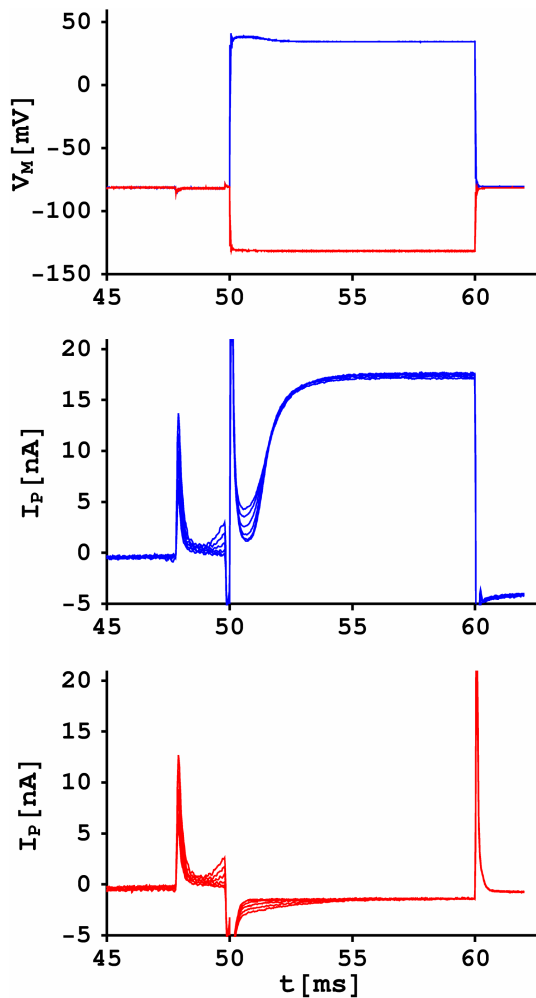


Abbildung 4.30: Nach dem Öffnen der Kanäle durch den Puls am Chip werden sie durch einen hyperpolarisierenden intrazellulären Puls wieder geschlossen.

Blau: Die extrazellulären Pulse öffnen die Ionenkanäle. Im darauf folgenden intrazellulären Testpuls (oben) auf $V_M = +40$ mV sind die offenen Kanäle als Offset im Strom zu erkennen.

Rot: Intrazelluläre Testpulse auf $V_M = -130$ mV schließen die offenen Kanäle. Die Zeitkonstante beim Schließen entspricht der Zeitkonstante des Kv1.3-Kanals.

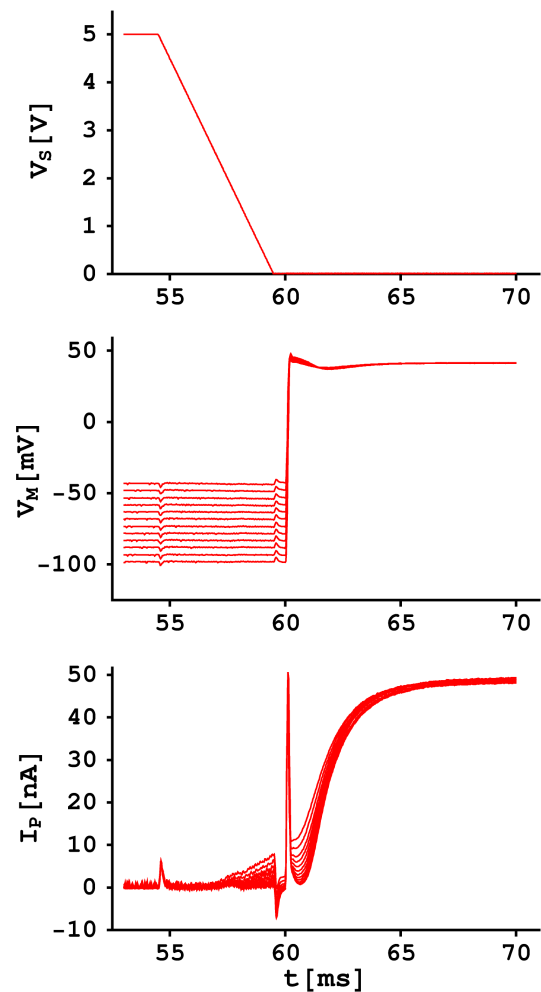


Abbildung 4.31: Eine Veränderung des intrazellulären Haltepotentials V_M (Mitte) während Anlegen des extrazellulären Stimulus (oben) beeinflusst die Spannung V_{JM} über die untere Membran. Bei hohem Haltepotential wird das Öffnen der Kanäle durch den extrazellulären Reiz erleichtert (unten).

KAPITEL 4. ÖFFNEN DER KANÄLE DURCH DIE EXTRAZELLULÄRE SPANNUNG

Kapitel 5

Periodische Stimulation der Zellen

In Kapitel 4 wurde gezeigt, dass sich die Kanäle der unteren Membran öffnen lassen, wenn die im Spalt erzeugte Spannung sich über mehrere Millisekunden aufrecht erhalten lässt. Der Faktor, durch den diese Zeit limitiert wird, ist die maximale Spannung am Chip, oberhalb derer ein Durchbruch der dielektrischen Schicht droht.

Bei Verzicht auf den nicht-physiologischen Na^+ -freien Elektrolyten und Verwendung einer normalen, d. h. physiologischen Messlösung mit höherer Leitfähigkeit kann die Spannung, die zum Öffnen der Kanäle notwendig wäre, nur für Zeiten unterhalb einer Millisekunde aufrecht erhalten werden. Diese Zeitspanne ist nicht ausreichend, um die Kanäle der unteren Zellmembran zu öffnen.

Ist es möglich, mehrmals hintereinander in schneller Folge eine Spannung im Spalt für eine kurze Zeit zu erzeugen, so kann auch auf diese Weise ein Öffnen der Kanäle erreicht werden (siehe Abbildung 5.1). In den dazwischen liegenden Zeitintervallen muss die Spannung am Chip wieder auf ihren ursprünglichen Wert gebracht werden, damit eine weitere Spannungsrampe am Chip nicht zu einem Durchbruch des Dielektrikums führt. Trotzdem soll vermieden werden, dass sich in dieser Zeit die Kanäle wieder schließen.

Diese Möglichkeit zum Öffnen der Kanäle bei physiologischem Elektrolyten soll im folgenden untersucht werden. Zuerst wird anhand eines einfachen Modellkanales das Prinzip erläutert, wie mittels vieler kurzer Pulse eine zum Öffnen der Kanäle geeignete Spannung im Spalt entsteht. Danach wird gezeigt, dass sich dieses Prinzip unter bestimmten Bedingungen auch auf komplexere Kanalmodelle anwenden lässt. Schließlich wird dies anhand einer Simulation mit dem K^+ -Kanal *Shaker* 29-4 geprüft.

5.1 Prinzip der periodischen Stimulation

5.1.1 Erzeugung einer Rechteckspannung im Spalt

Die Form der Spannung $V_J(t)$, die im Spalt zwischen Chip und Zelle entsteht, wird durch den Spannungsverlauf am Chip $V_S(t)$ und die Differentialgleichungen 2.2 bestimmt. Für die Berechnung, wie sich die Kanäle am besten öffnen lassen, ist es von Vorteil, eine einfache Form von $V_J(t)$ zu betrachten. Verwendet man die Differentialgleichungen 2.1 ohne Berücksichtigung der Elektrodifusion und setzt eine passive Zellmembran und konstante Kapazität des Dielektrikums voraus, so lässt sich die Spannung $V_S(t)$ am Chip berechnen, für welche $V_J(t)$ eine Rechteckspannung wird. Für diesen Fall lassen sich einfache

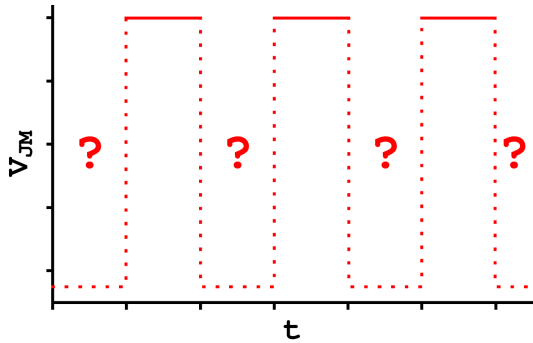
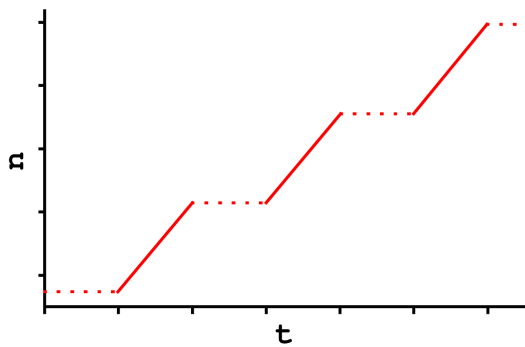


Abbildung 5.1: Wenn statt des modifizierten Elektrolyten mit niedriger Leitfähigkeit normaler Elektrolyt verwendet wird, lässt sich die Spannung über die untere Membran V_{JM} nur für kurze Zeit aufrecht erhalten.

Kann die Spannung mehrmals hintereinander erzeugt werden, lässt sich der Kanal stückweise immer weiter öffnen. Die Spannung in den dazwischen liegenden Intervallen (mit ? gekennzeichnet) sollte dazu so gewählt werden, dass die Kanäle (n) sich in dieser Zeit möglichst wenig schließen.



Bedingungen aufstellen, unter denen sich die Kanäle am weitesten öffnen (der allgemeine Fall, d. h. wenn $V_S(t)$ eine beliebige periodische Funktion darstellt, ist schwieriger zu behandeln).

Aus Gleichung 2.1 wird bei Vernachlässigung der Leitfähigkeiten der Membran und Annahme von $\frac{dV_M}{dt} = 0$ (wegen des Voltage-Clamp):

$$\frac{V_J}{R_J} + C_{OX} \cdot \frac{d(V_J - V_S)}{dt} = -C_{JM} \cdot \frac{dV_J}{dt} \quad (5.1)$$

Ist $V_J(t)$ eine Rechteckspannung, so besteht $V_J(t)$ aus Sprüngen und konstanten Teilen. Für die konstanten Teile gilt

$$\frac{dV_J}{dt} = 0$$

und damit aus Gl. 5.1

$$V_J = R_J C_{OX} \cdot \frac{dV_S}{dt}. \quad (5.2)$$

Das bedeutet, die Spannung im Spalt ist proportional zur Steigung der Spannung am Chip. Der Proportionalitätsfaktor ist die Zeitkonstante $\tau_{OX} = R_J C_{OX}$.

Sprünge in $V_J(t)$ entsprechen Sprüngen in $V_S(t)$. Ist an der Stelle t_0 ein Sprung, erhält man aus Gl. 5.1 durch Integration von $t_0 - \varepsilon$ bis $t_0 + \varepsilon$ und Grenzwertbildung $\varepsilon \rightarrow 0$:

$$\Delta V_J = \frac{C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \cdot \Delta V_S \quad (5.3)$$

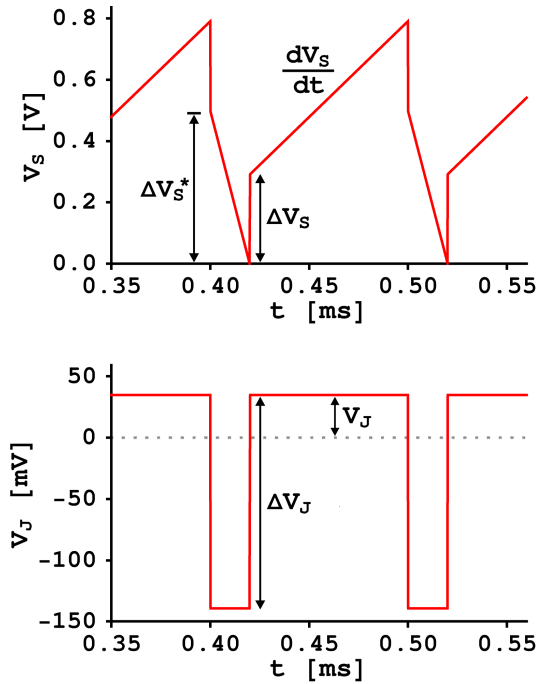


Abbildung 5.2: Damit $V_J(t)$ eine Rechteckspannung ist, muss die Spannung $V_S(t)$ aus Sprüngen und Teilstücken mit konstanter Steigung zusammengesetzt sein.

Die Spannungen ΔV_S und ΔV_J hängen über Gleichung 5.3 zusammen, die Spannung V_J berechnet sich aus $\frac{dV_S}{dt}$ über Gleichung 5.2.

Die Periode der Rechteckspannung ($100\mu\text{s}$) wurde so gewählt, dass bei $\Delta V_J \approx 200\text{ mV}$ die Spannungen ΔV_S und ΔV_S^* in derselben Größenordnung liegen.

mit

$$\Delta V_S = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} V_S(t_0 + \varepsilon) - V_S(t_0 - \varepsilon) \quad \text{und} \quad \Delta V_J = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} V_J(t_0 + \varepsilon) - V_J(t_0 - \varepsilon)$$

Ist $V_J(t)$ eine Rechteckspannung, muss die Spannung $V_S(t)$ also zusammengesetzt sein aus Sprüngen und Teilen mit konstanter Steigung. Die Größen V_J , $\frac{dV_S}{dt}$, ΔV_J und ΔV_S sind in Abbildung 5.2 eingezeichnet.

Die Höhen der Auf- und Abwärtssprünge in $V_J(t)$ sind ΔV_J und $-\Delta V_J$, die in $V_S(t)$ sind ΔV_S und $-\Delta V_S$. Deshalb sind die Spannungsintervalle, welche von den dazwischen liegenden Spannungsrampen überstrichen werden, betragsmäßig auch gleich groß, und zwar $\pm \Delta V_S^*$. Die Werte der Rechteckspannung während der depolarisierenden und der hyperpolarisierenden Phase V_{J1} und V_{J2} ergeben sich aus den Zeiten Δt_1 und Δt_2 (siehe Abbildung 5.3) über Formel 5.2:

$$\begin{aligned} V_{J1} &= R_J C_{OX} \cdot \frac{-\Delta V_S^*}{\Delta t_1} = R_J C_{OX} \cdot \frac{-\Delta V_S^*}{dc \cdot T} \\ V_{J2} &= R_J C_{OX} \cdot \frac{\Delta V_S^*}{\Delta t_2} = R_J C_{OX} \cdot \frac{\Delta V_S^*}{(1 - dc) \cdot T}, \end{aligned} \quad (5.4)$$

wobei

$$dc = \frac{\Delta t_1}{T} \quad \left[\text{und deshalb} \quad 1 - dc = \frac{\Delta t_2}{T} \right],$$

der sog. *duty cycle* oder das *Tastverhältnis*, zur Beschreibung der Asymmetrie der Rechteckspannung verwendet wird. Daraus folgt weiter

$$\Delta V_J = V_{J2} - V_{J1} = R_J C_{OX} \cdot \frac{\Delta V_S^*}{T} \cdot \left(\frac{1}{dc} + \frac{1}{1 - dc} \right) \quad (5.5)$$

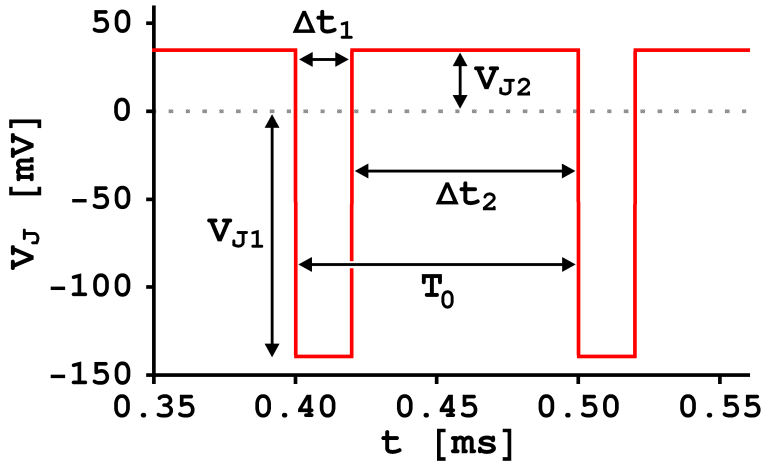


Abbildung 5.3: Die oberen und unteren Werte der Rechteckspannung sind V_{J1} und V_{J2} , die entsprechenden Zeitintervalle Δt_1 und Δt_2 . Die Periode der Rechteckspannung ist T .

und

$$V_{J2} = \frac{-dc}{1-dc} \cdot V_{J1}.$$

Die von V_{J1} und V_{J2} bezüglich der Nulllinie eingeschlossenen Flächen sind entgegengesetzt gleich, d. h.

$$V_{J1} \cdot \Delta t_1 = -V_{J2} \cdot \Delta t_2.$$

Die Spannung über die untere Membran ist $V_{JM} = V_M - V_J$. Im Voltage-Clamp ist V_M konstant und deshalb bildet auch V_{JM} eine Rechteckspannung (Abbildung 5.4). Dementsprechend sind hier die von den Spannungen $V_{JM1} = V_M - V_{J1}$ und $V_{JM2} = V_M - V_{J2}$ bezüglich der V_M -Linie eingeschlossenen Flächen gleich (bis auf das Vorzeichen).

Als frei wählbare Parameter, welche die Form des Rechtecksignals über die Membran beschreiben, werden in den nächsten Abschnitten die vier Größen V_{JM1} , V_M , dc und T verwendet. Aus diesen lassen sich gemäß den Formeln 5.3, 5.4 und 5.5 die Werte für ΔV_S^* und ΔV_S^* berechnen, aus denen man mit dc und T die Spannung $V_S(t)$ am Chip konstruiert (vgl. Abbildung 5.2).

Abschließend wird für beliebige Spannungen $V_S(t)$ am Chip die im Spalt resultierende Spannung $V_J(t)$ berechnet. Dazu wird die Gleichung 5.1 für den allgemeinen Fall gelöst. Man stellt um:

$$\frac{dV_J}{dt} + \frac{V_J}{\tau_{OX}} = \frac{C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \frac{dV_S}{dt} \quad \text{mit} \quad \tau_{OX} = R_J (C_{OX} + C_{JM}) \quad (5.6)$$

und multipliziert mit $e^{\frac{t}{\tau_{OX}}}$:

$$\frac{dV_J}{dt} \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}} + \frac{V_J}{\tau_{OX}} \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}} = \frac{C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \frac{dV_S}{dt} \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}}.$$

Die linke Seite entsteht durch die Produktregel für Ableitungen:

$$\frac{d}{dt} \left(V_J \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}} \right) = \frac{dV_J}{dt} \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}} + V_J \cdot \frac{1}{\tau_{OX}} e^{\frac{t}{\tau_{OX}}}$$

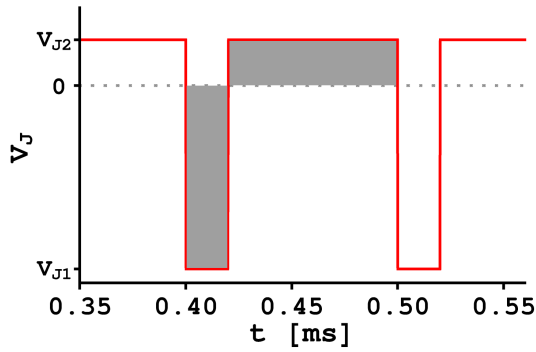
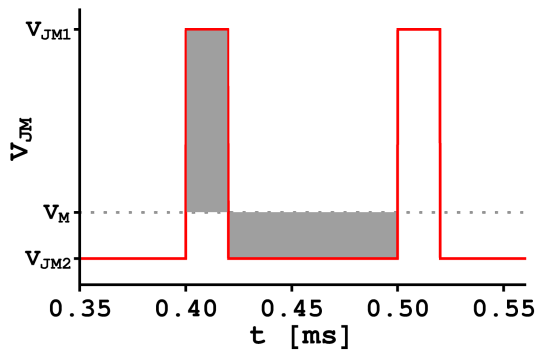


Abbildung 5.4: Betrachtet man die von der Spannung V_J oberhalb und unterhalb der Nulllinie eingeschlossenen Flächen, so erkennt man, dass $V_{J1} \cdot \Delta t_1 = -V_{J2} \cdot \Delta t_2$ ist. Dasselbe gilt für die von den Spannungen V_{JM1} und V_{JM2} bezüglich der V_M -Linie eingeschlossenen Flächenstücke.



Man erhält also

$$\frac{d}{dt} \left(V_J \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}} \right) = \frac{C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \frac{dV_S}{dt} \cdot e^{\frac{t}{\tau_{OX}}}$$

und durch Integration über die Zeit

$$V_J \cdot e^{\frac{\tau}{\tau_{OX}}} \Big|_{t_0}^t = \frac{C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \cdot \int_{t_0}^t \frac{dV_S}{d\tau} e^{\frac{\tau}{\tau_{OX}}} d\tau$$

woraus man durch Auflösen nach $V_J(t)$ das gewünschte Ergebnis erhält:

$$V_J(t) = V_J(t_0) e^{-\frac{t-t_0}{\tau_{OX}}} + \frac{C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{OX}}} \cdot \int_{t_0}^t e^{\frac{\tau}{\tau_{OX}}} V_S'(\tau) d\tau$$

Für periodische Funktionen $V_S(t)$ ist auch $V_J(t)$ periodisch, und das Integral von $V_J(t)$ über eine Periode verschwindet (aus Gl. 5.6):

$$\int_0^T V_J(t) dt = \int_0^T \frac{\tau_{OX} C_{OX}}{C_{OX} + C_{JM}} \frac{dV_S}{dt} - \tau_{OX} \frac{dV_J}{dt} dt = 0,$$

d. h. die Flächen unterhalb und oberhalb der Nulllinie in einer Periode sind gleich, genauso wie beim Spezialfall der Rechteckkurve. Im folgenden wird nur der Fall der Rechteckspannung weiter behandelt.

5.1.2 Öffnen des Modellkanals mit periodischer Stimulation

Es wird untersucht, wie die Parameter V_{JM1} , V_M , dc und T , durch welche die Form der Rechteckspannung bestimmt wird, zu wählen sind, damit sich die Ionenkanäle in der unteren Zellmembran durch die Spannung im Spalt öffnen. Dazu wird ein mathematisches Modell eines Ionenkanals verwendet. Das einfachste Modell eines Ionenkanals mit einem offenen und einem geschlossenen Zustand und exponentiell anwachsenden Übergangsraten wurde in Abschnitt 2.2.2 erklärt. Die relevanten Formeln 2.5 und 2.10, welche das Verhalten des Kanals beschreiben, sind hier noch einmal wiederholt. Das zeitabhängige Verhalten der Wahrscheinlichkeit n , dass ein Kanal offen ist (bzw. den Anteil der offenen Kanäle in einem Ensemble) ist gegeben durch die Differentialgleichung 5.7. Die Gleichungen 5.8 für die Ratenkonstanten α und β , mit denen der Kanal bei einer bestimmten Spannung öffnet bzw. schließt, ergeben sich aus dem Doppelminimumpotential (siehe Abbildung 2.7).

$$\frac{dn}{dt} = \alpha \cdot (1 - n) - \beta \cdot n \tag{5.7}$$

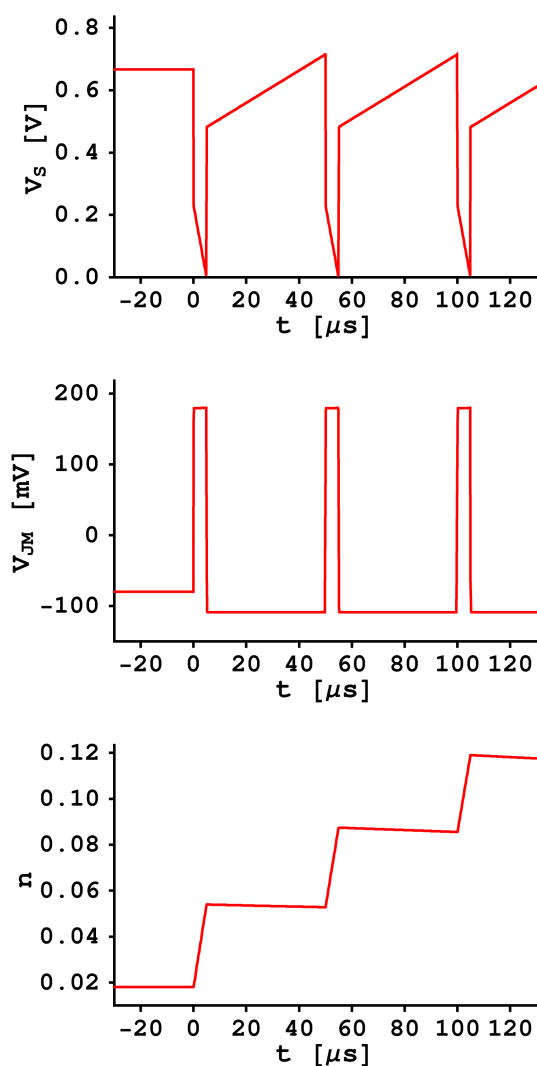


Abbildung 5.5: Mit einer Periode der Stimulierungsspannung $V_S(t)$ am Chip von $T = 50 \mu s$ und $V_{JM1} = 180 \text{ mV}$ als dem oberen Wert der Rechteckspannung im Spalt ergeben sich die links dargestellten Kurven für $V_S(t)$, $V_{JM}(t)$ und $n(t)$. Unten ist der Verlauf von $n(t)$ über einen Zeitraum von 5 ms, d. h. 100 Perioden, dargestellt.

Die Rechnung wurde mit einem Kanal mit zwei Zuständen durchgeführt, der durch die Gleichungen 5.7 und 5.8 beschrieben wird. Die Werte der Modellparameter sind:

$$\begin{aligned} \tau_0 &= 1 \text{ s}^{-1} \\ V_{0.5} &= -40 \text{ mV} \\ V_g &= 10 \text{ mV} \\ \delta &= 1/3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\alpha(V_{JM}) &= \tau_0^{-1} \cdot e^{\frac{\delta(V_{JM}-V_{0.5})}{V_g}} \\ \beta(V_{JM}) &= \tau_0^{-1} \cdot e^{-\frac{(1-\delta)(V_{JM}-V_{0.5})}{V_g}}\end{aligned}\quad (5.8)$$

Dabei bezeichnet $n(t)$ die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal zur Zeit t geöffnet ist, und V_{JM} die Spannung über die Junctionmembran. τ_0 , δ , V_g und $V_{0.5}$ sind die Parameter, durch welche die Dynamik des Kanals bestimmt ist.

Wird als Spannung V_{JM} eine periodische Rechteckspannung eingesetzt, so nehmen abwechselnd α und β hohe Werte an, und der Kanal öffnet und schließt sich jeweils. Die Parameter V_M , V_{JM1} , dc und T , welche die Form der Rechteckspannung bestimmen, werden so gewählt, dass der Kanal innerhalb einer Periode stärker öffnet als schließt. Dies ist in Abbildung 5.5 verdeutlicht. Als Kanalparameter wurden die Werte $\tau_0 = 1 \text{ s}^{-1}$, $V_{0.5} = -40 \text{ mV}$, $V_g = 10 \text{ mV}$ und $\delta = 1/3$ verwendet. Die Stimulationsparameter sind $V_M = -80 \text{ mV}$, $V_{JM1} = 180 \text{ mV}$, $dc = 0.1$ und $T = 50 \mu\text{s}$.

Liegt über die Membran eine konstante Spannung V_{JM} an, so sind α und β konstant, und Gleichung 5.7 zeigt, dass $n(t)$ einem stationären Wert zustreben wird. Um diesen stationären Wert $n_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} n(t)$ zu finden, wird $\frac{dn}{dt} = 0$ gesetzt:

$$n_\infty = \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

Ist die Spannung $V_{JM}(t)$ nicht konstant, so ist kein Grenzwert von $n(t)$ für $t \rightarrow \infty$ definiert. Wenn $V_{JM}(t)$ eine periodische Funktion ist, lässt sich aber eine Bedingung aufstellen, welche dem stationären Wert sinngemäß entspricht, und zwar soll $n(t)$ nach Durchlaufen einer Periode wieder denselben Wert annehmen, d. h.

$$n(t_0 + T) - n(t_0) = 0, \quad (5.9)$$

wobei T die Periode von $V_{JM}(t)$ bezeichnet. In Abbildung 5.6 ist diese Bedingung anschaulich dargestellt. Der Wert $n_\infty = n(t_0)$ wird im folgenden als quasistationärer Wert bezeichnet.

Es wird zuerst der Grenzfall $T \rightarrow 0$ behandelt, weil sich der Wert n_∞ dann einfacher berechnen lässt. Danach wird der kompliziertere allgemeine Fall dargestellt, aus welchem sich die gesamte Dynamik des Öffnens bestimmen lässt.

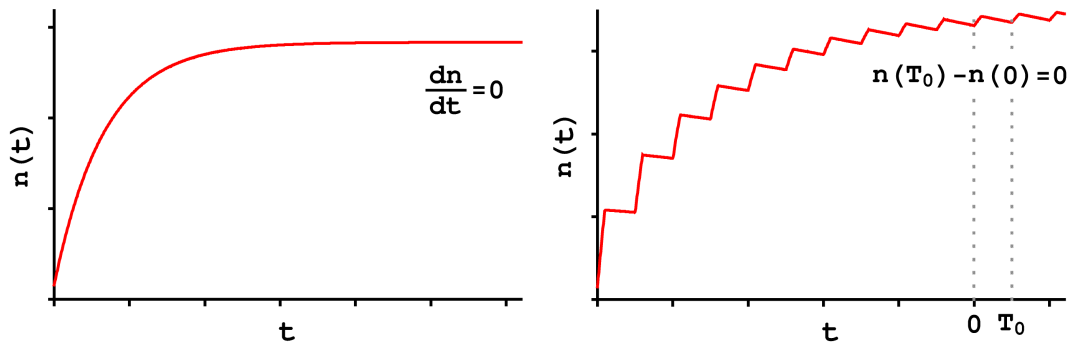


Abbildung 5.6: Links: Für eine konstante Spannung $V_{JM}(t)$ lautet die Bedingung für eine stationären Wert von $n(t)$: $\frac{dn}{dt} = 0$. Rechts: Wird die Spannung $V_{JM}(t)$ periodisch moduliert, so kann man die Bedingung für den quasi-stationären Fall als $n(t_0 + T) - n(t_0) = 0$ formulieren .

5.1.3 Hochfrequenter Grenzfall $T \rightarrow 0$

Gleichung 5.9 lässt sich umformen, indem die linke Seite als Integral geschrieben wird:

$$n(t_0 + T) - n(t_0) = \int_{t_0}^{t_0+T} \frac{dn}{dt} dt = \int_{t_0}^{t_0+T} \alpha(1-n) - \beta n dt = 0$$

Für hohe Frequenzen ist n beinahe konstant (vgl. Abbildung 5.6) und kann aus dem Integral herausgezogen werden; für α und β gilt dies nicht, da sie spannungsabhängig sind und sich deshalb während einer Periode ändern. Für die Näherung $n = \text{const.}$ gilt dann

$$n_\infty = \frac{\int_{t_0}^{t_0+T} \alpha dt}{\int_{t_0}^{t_0+T} \alpha + \beta dt}$$

Im folgenden wird der oben behandelte Fall betrachtet, dass $V_{JM}(t)$ eine Rechteckform besitzt. Mit

$$\alpha_1 = \alpha(V_{JM1}), \quad \alpha_2 = \alpha(V_{JM2}), \quad \beta_1 = \beta(V_{JM1}), \quad \beta_2 = \beta(V_{JM2})$$

und den Bezeichnungen aus Abschnitt 5.1.1 gilt:

$$n_\infty = \frac{\Delta t_1 \cdot \alpha_1 + \Delta t_2 \cdot \alpha_2}{\Delta t_1 \cdot (\alpha_1 + \beta_1) + \Delta t_2 \cdot (\alpha_2 + \beta_2)} \quad (5.10)$$

Wegen

$$\Delta t_1 = dc T \quad \text{und} \quad \Delta t_2 = (1 - dc) T$$

lässt sich T kürzen und n_∞ wird für $T \rightarrow 0$ unabhängig von T (Abbildung 5.7).

Verwendet man die Näherung

$$\alpha_1, \beta_2 \gg \alpha_2, \beta_1,$$

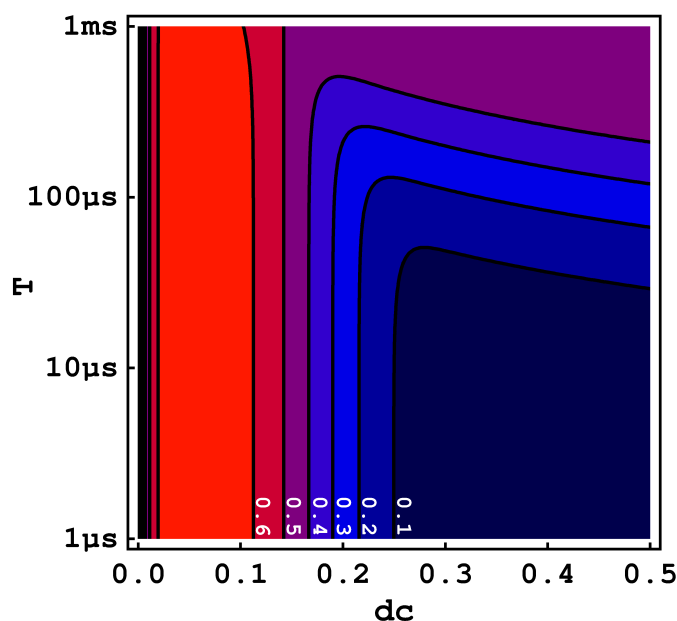


Abbildung 5.7: Darstellung von $n_\infty(dc, T)$ bei festen Spannungsparametern $V_M = -80 \text{ mV}$ und $V_{JM1} = 180 \text{ mV}$. n_∞ nimmt Werte von 0 (blau) bis 0.69 (rot) an.

Für hohe Frequenzen, d. h. $T \rightarrow 0$, wird n_∞ unabhängig von T . Für größere T wurde hier der Mittelwert von $n(t)$ dargestellt.

welche für $V_{JM1} - V_{0.5} > V_g \cdot \min(3, 1/\delta)$ und $V_{0.5} - V_M > 3V_g$ gilt (hergeleitet aus Formel 5.8), erhält man

$$n_\infty = \frac{dc \cdot \alpha_1}{dc \cdot \alpha_1 + (1 - dc) \cdot \beta_2}$$

Setzt man $\alpha(V)$ und $\beta(V)$ aus Formel 5.8 ein und drückt V_{JM2} durch V_{JM1} und V_M aus, so ergibt sich

$$n_\infty = \frac{1}{1 + \frac{1-dc}{dc} e^{\frac{(1-dc)V_{0.5} - (\delta-dc)V_{JM1} - (1-\delta)V_M}{(1-dc)V_g}}} \quad (5.11)$$

In diese Formel für n_∞ gehen neben den Kanalparametern δ , V_g und $V_{0.5}$ noch die drei Parameter der Stimulationsspannung V_M , V_{JM1} und dc ein. Im folgenden wird die Abhängigkeit von n_∞ von diesen drei Parametern untersucht.

Die Fälle $dc > \delta$ und $dc < \delta$ unterscheiden sich grundsätzlich: Für hohe Spannungen V_{JM1} wird der mittlere Ausdruck im Exponenten $-(\delta - dc)V_{JM1}$ im ersten Fall positiv, im zweiten negativ. In diesem zweiten Fall, also bei $dc < \delta$, kann durch eine entsprechend hohe Spannung V_{JM1} der gesamte Exponent beliebig hohe negative Werte annehmen, und somit n_∞ beliebig nahe an 1 herangebracht werden. Im ersten Fall für $dc > \delta$ wird der Exponent bei hohem V_{JM1} positiv und n_∞ geht gegen 0.

Bei festen Spannungswerten V_M und V_{JM1} wächst der zweite Summand im Nenner des gesamten Ausdrucks mit fallendem dc stark an, deshalb gilt für $dc \rightarrow 0$ auch $n_\infty \rightarrow 0$. Es muss in diesem Fall also ein dc geben, bei welchem $n_\infty(dc)$ maximal wird. Die Abhängigkeit $n_\infty(dc, V_{JM1})$ mit $T \rightarrow 0$ und festem V_M ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

Der Zusammenhang zwischen V_M und V_{JM1} ist offensichtlich: Bei einer Änderung des mittleren Membranpotentials V_M wird durch eine entsprechende Veränderung von V_{JM1} um $\Delta V_{JM1} = -\frac{1-\delta}{\delta-dc} \Delta V_M$ derselbe Wert für n_∞ angenommen (Abbildung 5.9).

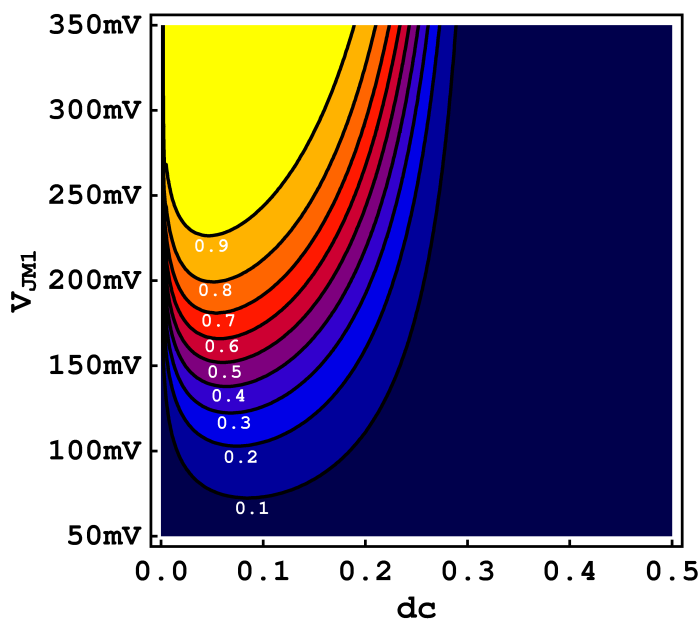


Abbildung 5.8: Darstellung von $n_\infty(dc, V_{JM1})$ für $T \rightarrow 0$ und festes $V_M = -80 \text{ mV}$. Von blau über rot bis gelb ist hier der Bereich $0 \leq n_\infty \leq 1$ in Schritten von 0.1 dargestellt.

Die Kanäle öffnen sich für hohe V_{JM1} im Bereich $0 < dc < \delta$ (hier ist $\delta = 1/3$). Für eine feste Spannung V_{JM1} wird bei einem bestimmten dc ein Maximum für n_∞ erreicht. Für ein festes $dc < \delta$ kann durch Erhöhung von V_{JM1} der Wert von n_∞ beliebig nahe an 1 gebracht werden.

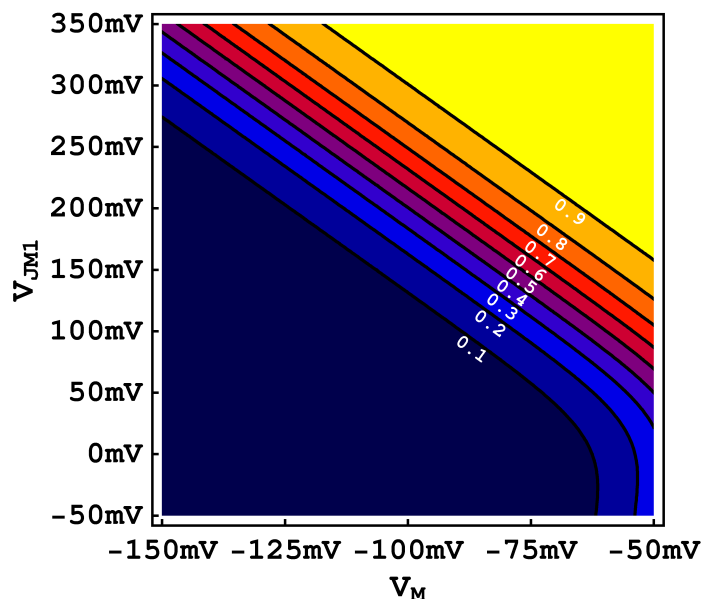


Abbildung 5.9: Darstellung von $n_\infty(V_M, V_{JM1})$ für $T \rightarrow 0$ und festes $dc = 0.1$.

Eine Verringerung des mittleren Membranpotentials V_M kann durch eine entsprechende Vergrößerung von V_{JM1} kompensiert werden, um denselben Wert von n_∞ zu erhalten.

5.1.4 Allgemeiner Fall für beliebige Frequenzen

Im oben behandelten hochfrequenten Grenzfall muss die Frequenz so hoch sein, dass sich $n(t)$ innerhalb des Ablaufs einer Periode wenig ändert. Die oben durchgeführten Vereinfachungen sind bei einer niedrigeren Frequenz der anregenden Spannung nicht mehr möglich. Die Differentialgleichung 5.7 kann trotzdem noch analytisch gelöst werden.

Für konstante Spannung V_M sind auch α und β konstant, und man erhält

$$\begin{aligned} \frac{dn}{dt} &= \alpha - (\alpha + \beta) \cdot n(t) \\ n(t) &= \frac{\alpha}{\alpha + \beta} - \left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta} - n(0) \right) e^{-(\alpha + \beta)t} \end{aligned}$$

Löst man die Gleichung für die hyperpolarisierende Phase Δt_2 und verwendet die Lösung als den Startwert für die depolarisierende Phase Δt_1 , so ergibt sich für den Wert von $n(t)$ nach Ablauf einer Periode

$$\begin{aligned} n(\Delta t_1 + \Delta t_2) &= \frac{\alpha_1}{\alpha_1 + \beta_1} - \left(\frac{\alpha_1}{\alpha_1 + \beta_1} - \left(\frac{\alpha_2}{\alpha_2 + \beta_2} \right. \right. \\ &\quad \left. \left. - \left(\frac{\alpha_2}{\alpha_2 + \beta_2} - n(0) \right) e^{-(\alpha_2 + \beta_2)\Delta t_2} \right) \right) e^{-(\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1} \end{aligned}$$

Mit den Abkürzungen

$$\begin{aligned} r_1 &= \frac{\alpha_1}{\alpha_1 + \beta_1}, & e_1 &= e^{-(\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1}, \\ r_2 &= \frac{\alpha_2}{\alpha_2 + \beta_2}, & e_2 &= e^{-(\alpha_2 + \beta_2)\Delta t_2}, \\ a &= e_1 e_2 \quad \text{und} \quad b &= r_1(1 - e_1) + r_2 e_1(1 - e_2) \end{aligned}$$

erhält man für den Öffnungszustand des Kanals nach Ablauf von k Perioden:

$$n(k \cdot T) = b \cdot \frac{1 - a^k}{1 - a} + a^k n(0)$$

Der Grenzwert dieses Ausdrucks für $k \rightarrow \infty$ bildet den Wert von $n(t)$ nach der depolarisierenden Phase im quasistationären Grenzfall und beträgt:

$$n_{\infty}^+ = \lim_{k \rightarrow \infty} n(k \cdot T) = \frac{b}{1 - a}$$

Entsprechend ergibt sich bei Vertauschung von e_1 mit e_2 und r_1 mit r_2 der Grenzwert n_{∞}^- nach Ablauf der hyperpolarisierenden Phase. Der Mittelwert ist

$$n_{\infty} = \frac{1}{2}(n_{\infty}^+ + n_{\infty}^-)$$

Die Veränderung der Darstellungen von $n_{\infty}(dc, V_{JM1})$ und $n_{\infty}(V_M, V_{JM1})$, wenn statt $T \rightarrow 0$ (wie in den Abbildungen 5.8 und 5.9) eine Periodendauer von $T = 100 \mu\text{s}$ angenommen wird, zeigen die Abbildungen 5.10 und 5.11.

Für $T \rightarrow 0$ ist $n_{\infty}^+ = n_{\infty}^- = n_{\infty}$, und die Exponentialfunktion lässt sich linearisieren:

$$\begin{aligned} \lim_{T \rightarrow 0} n_{\infty} &= \frac{\frac{\alpha_1}{\alpha_1 + \beta_1} (1 - e^{-(\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1}) + \frac{\alpha_2}{\alpha_2 + \beta_2} e^{-(\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1} (1 - e^{-(\alpha_2 + \beta_2)\Delta t_2})}{1 - e^{-(\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1 - (\alpha_2 + \beta_2)\Delta t_2}} \\ &= \frac{\frac{\alpha_1}{\alpha_1 + \beta_1} \cdot (\alpha_1 + \beta_1) \Delta t_1 + \frac{\alpha_2}{\alpha_2 + \beta_2} (1 - (\alpha_1 + \beta_1) \Delta t_1) \cdot (\alpha_2 + \beta_2) \Delta t_2}{(\alpha_1 + \beta_1) \Delta t_1 + (\alpha_2 + \beta_2) \Delta t_2} \\ &= \frac{\alpha_1 \Delta t_1 + \alpha_2 \Delta t_2 (1 - (\alpha_1 + \beta_1) \Delta t_1)}{(\alpha_1 + \beta_1) \Delta t_1 + (\alpha_2 + \beta_2) \Delta t_2} \end{aligned}$$

Für $T \rightarrow 0$ wird $(\alpha_1 + \beta_1) \Delta t_1$ klein gegenüber 1, und man erhält wieder Gleichung 5.10.

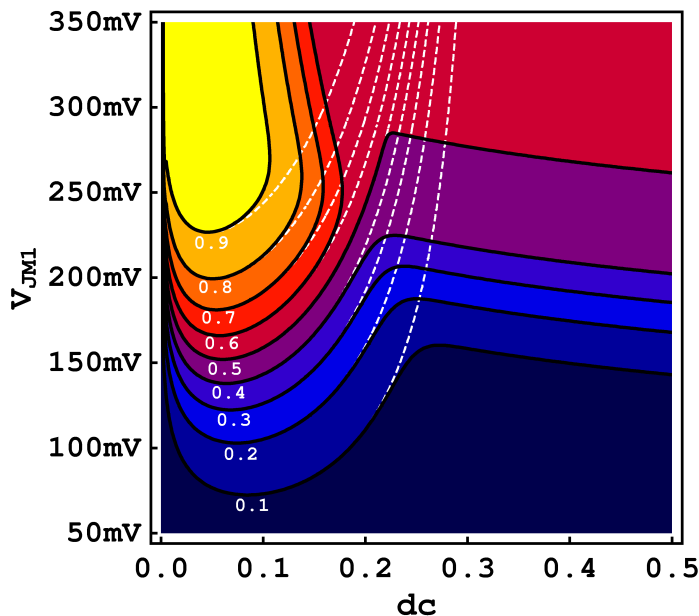


Abbildung 5.10: Darstellung von $n_{\infty}(dc, V_{JM1})$ für $T = 100 \mu\text{s}$ und $V_M = -80 \text{ mV}$. Weiß gestrichelt eingezeichnet sind die Höhenlinien für $T \rightarrow 0$ (vgl. Abbildung 5.8).

Für kleine dc und geringe Spannungen V_{JM1} stimmen die Werte von n_{∞} für $T = 100 \mu\text{s}$ und $T \rightarrow 0$ überein. Im Bereich $dc > 0.25$ ist $n_{\infty}^- \approx 0$ und $n_{\infty} \approx \frac{1}{2}n_{\infty}^+$.

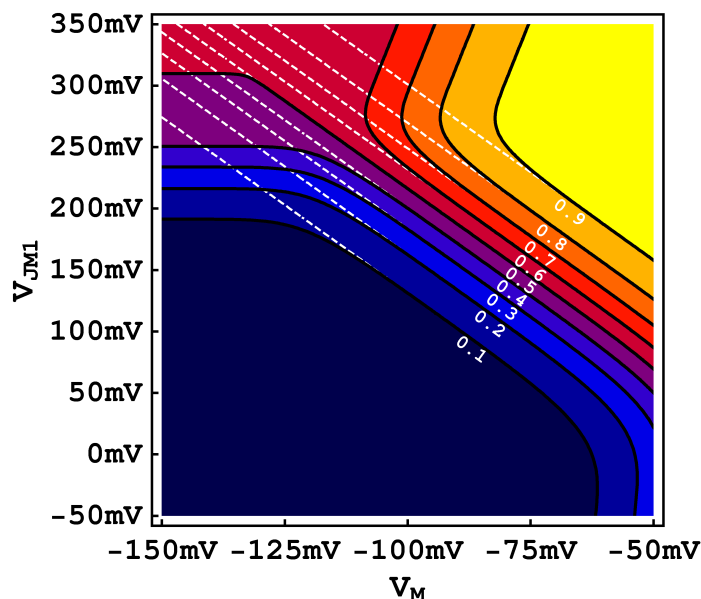


Abbildung 5.11: Darstellung von $n_\infty(V_M, V_{JM1})$ für $T = 100 \mu\text{s}$ und $dc = 0.1$. Weiß gestrichelt eingezeichnet sind wieder die Höhenlinien für $T \rightarrow 0$ (vgl. Abbildung 5.9).

Das Absinken von n_∞ im Bereich $n_\infty > 0.5$ und der Anstieg im Bereich $n_\infty < 0.5$ gegenüber dem Fall $T \rightarrow 0$ geschieht durch die Aufspaltung von n_∞ in zwei unterschiedliche Werte n_∞^+ und n_∞^- aufgrund der vergrößerten Periodendauer T .

Aus obigen Formeln lässt sich berechnen, mit welcher Zeitkonstante der Kanal durch die periodische Spannung im Spalt geöffnet wird. Zwischen aufeinander folgenden Perioden beträgt das Verhältnis der Abweichungen vom Grenzwert:

$$\frac{(n_\infty^+ - n(k \cdot T))}{(n_\infty^+ - n((k-1) \cdot T))} = a$$

und damit erhält man als Zeitkonstante τ_{qs} für die Annäherung des Kanals an den quasi-stationären Zustand

$$\tau_{qs} = \frac{T}{1-a} = \frac{T}{1-e_1 e_2} = \frac{T}{1-e^{-(\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1 - (\alpha_2 + \beta_2)\Delta t_2}}$$

Im Grenzfall für $T \rightarrow 0$ lässt sich die Exponentialfunktion wieder linearisieren, und es ergibt sich für die Zeitkonstante analog zur oben durchgeführten Rechnung:

$$\begin{aligned} \lim_{T \rightarrow 0} \tau_{qs} &= \frac{T}{1 - (1 - (\alpha_1 + \beta_1)\Delta t_1 - (\alpha_2 + \beta_2)\Delta t_2)} \\ &= \frac{1}{(\alpha_1 + \beta_1) \cdot dc + (\alpha_2 + \beta_2) \cdot (1 - dc)} \end{aligned}$$

5.2 Anwendung auf Kanalmodelle mit mehr als zwei Zuständen

Für Modelle von Ionenkanälen, die mehr als nur zwei Zustände besitzen, werden die oben dargestellten Formeln auf die Matrixschreibweise übertragen. Dazu formuliert man das Übergangsschema als System linearer Differentialgleichungen 1. Ordnung:

$$\begin{pmatrix} \frac{dy_1}{dt} \\ \frac{dy_2}{dt} \\ \vdots \\ \frac{dy_n}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & \cdots & a_{nn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} \quad (5.12)$$

5.2. ANWENDUNG AUF KANALMODELLE MIT MEHR ALS ZWEI ZUSTÄNDEN

wobei die Koeffizienten a_{mn} sich aus den Ratenkonstanten α_n und β_n für die Übergänge zwischen den jeweiligen Zuständen des Kanals berechnen. Zur Vereinfachung wird im folgenden die Matrix als $\mathbf{A}(V_{JM}) = (a_{mn}(V_{JM}))$ geschrieben.

$$\frac{dy}{dt} = \mathbf{A} \cdot y \quad (5.13)$$

Die Definition des quasistationären Zustandes erfolgt entsprechend dem bereits behandelten Fall mit zwei Kanalzuständen. Es wird zuerst der allgemeine Fall für beliebige Periodendauern untersucht. Im letzten Abschnitt zeigte sich, dass sich daraus der Spezialfall für $T \rightarrow 0$ ableiten lässt.

Im folgenden werden die Gleichungen für einen beliebigen Kanal hergeleitet und danach anhand des Modells für den K^+ -Kanal *Shaker* 29-4 mit konkreten Werten gerechnet.

5.2.1 Vereinfachung der Differentialgleichungen für stückweise konstante, periodische Spannungen

Für eine konstante Spannung V_{JM} und damit konstante Übergangsmatrix \mathbf{A} kann man die Lösung der Differentialgleichung 5.13 mithilfe des Exponentialoperators für Matrizen angeben:

$$y(t) = e^{\mathbf{A}(V_{JM})t} \cdot y(0)$$

Wenn die Stimulationsspannung V_{JM} periodisch und stückweise konstant ist, gilt das auch für die Übergangsratenkonstanten. Damit erhält man als Lösung der Differentialgleichung zum Zeitpunkt t_i :

$$y(t_i) = e^{\mathbf{A}(V_i)(t_i-t_{i-1})} \cdot \dots \cdot e^{\mathbf{A}(V_1)(t_1-t_0)} \cdot y(0),$$

wobei $V_i = V_{JM}(t_i)$ die Spannung im i -ten Intervall ist. In unserem Fall wechseln sich die de- und die hyperpolarisierende Phase ab, es gibt also nur zwei unterschiedliche Exponentialmatrizen:

$$\begin{aligned} \mathbf{A}_1 &= e^{\mathbf{A}(V_{JM1})\Delta t_1} \\ \mathbf{A}_2 &= e^{\mathbf{A}(V_{JM2})\Delta t_2} \end{aligned}$$

Nach Ablauf von k Perioden erhält man das Ergebnis

$$y(kT) = (\mathbf{A}_2 \cdot \mathbf{A}_1)^k \cdot y(0),$$

Diese Methode ermöglicht eine schnelle Berechnung des Zeitverlaufs von $y(t)$ während der periodische Stimulation.

Wie in Formel 5.9 ist die Bedingung für den quasi-stationären Fall, dass $y(t)$ nach Durchlaufen einer Periode wieder denselben Wert hat. Für den quasistationären Wert $y_\infty = y(t_0)$ gilt also die Bedingung

$$y(t_0 + T) - y(t_0) = 0.$$

Handelt es sich bei der Stimulationsspannung um eine periodische Funktion mit abwechselnd de- und hyperpolarisierenden Phasen, so lässt sich die oben behandelte Lösungsmethode mit Exponentialmatrizen anwenden:

$$y(t_0 + T) - y(t_0) = \mathbf{A}_2 \cdot \mathbf{A}_1 \cdot y(t_0) - y(t_0) = (\mathbf{A}_2 \cdot \mathbf{A}_1 - \mathbf{1}) \cdot y(t_0) = 0,$$

wobei $\mathbf{1}$ die Einheitsmatrix bezeichnet. Jeweils nach der depolarisierenden bzw. der hyperpolarisierenden Phase ergeben sich zwei unterschiedliche Werte für y_∞ , welche mit y_∞^1 (nach der depolarisierenden Phase) und y_∞^2 (nach der hyperpolarisierenden Phase) bezeichnet werden. Die Lösung der entsprechenden Gleichungen lässt sich also auf das Problem reduzieren, zu einer gegebenen Matrix den Eigenvektor zum Eigenwert 0 zu finden:

$$\begin{aligned} (\mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{A}_2 - \mathbf{1}) \cdot y_\infty^1 &= 0 \\ (\mathbf{A}_2 \cdot \mathbf{A}_1 - \mathbf{1}) \cdot y_\infty^2 &= 0 \end{aligned}$$

5.2.2 Hochfrequenter Grenzfall $T \rightarrow 0$

Im Grenzfall für $T \rightarrow 0$ lassen sich die Exponentialmatrizen linearisieren. Dazu muss die Periode so kurz werden, dass sowohl in der depolarisierenden als auch in der hyperpolarisierenden Phase alle Elemente der Matrix im Exponenten kleiner als Eins werden:

$$\begin{aligned} T \cdot dc \cdot |a_{mn}(V_{JM1})| &\ll 1 \quad \forall m, n \\ T \cdot (1 - dc) \cdot |a_{mn}(V_{JM2})| &\ll 1 \quad \forall m, n \end{aligned} \tag{5.14}$$

Die Linearisierung erfolgt wie bei der normalen Exponentialfunktion mittels Entwicklung um einen bestimmten Wert (hier um 0) und Abbruch der Reihe nach dem ersten Glied. Im Fall des Exponentialoperators ergibt sich dann

$$e^{\mathbf{A}t} \doteq \mathbf{1} + \mathbf{A}t$$

und für die Matrixprodukte

$$\begin{aligned} \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{A}_2 - \mathbf{1} &= e^{\mathbf{A}(V_{JM1})\Delta t_1} \cdot e^{\mathbf{A}(V_{JM2})\Delta t_2} - \mathbf{1} \\ &\doteq (\mathbf{1} + \mathbf{A}(V_{JM1})\Delta t_1) \cdot (\mathbf{1} + \mathbf{A}(V_{JM2})\Delta t_2) - \mathbf{1} \\ &\doteq \mathbf{A}(V_{JM1})\Delta t_1 + \mathbf{A}(V_{JM2})\Delta t_2 \end{aligned}$$

Da die Matrixaddition im Gegensatz zur Matrixmultiplikation kommutativ ist, gilt $y_\infty^1 = y_\infty^2 = y_\infty$. In der Bedingung für die Quasistationarität lässt sich der Faktor T ausklammern, und es ergibt sich

$$(dc \cdot \mathbf{A}(V_{JM1}) + (1 - dc) \cdot \mathbf{A}(V_{JM2})) \cdot y_\infty = 0$$

D. h. für hohe Frequenzen wird die Lösung y_∞ unabhängig von der Periode T .

Im folgenden Abschnitt wird die Abhängigkeit der Lösung y_∞ von den Parametern V_{JM1} , V_M , dc und T am konkreten Beispiel des Kanals *Shaker 29-4* untersucht.

5.2.3 Periodische Stimulation des Kanals *Shaker* 29-4 – Simulation

Um zu untersuchen, wie weit sich ein realer Kanal mit einer periodischen Spannung öffnen lässt, ist ein Modell des Kanals notwendig, in welchem die verschiedenen Zustände des Kanals und die dazugehörigen Ratenkonstanten beschrieben werden. Als Beispiel wurde der Kanal *Shaker* 29-4 ausgewählt, da er seit vielen Jahren als Modellkanal für die Untersuchung des Gatingverhaltens dient und daher ein sehr sorgfältig aufgestelltes Gating-schema mit den zugehörigen Übergangsratenkonstanten existiert [Sch98a, Sch98b, Sch98c] (vgl. Abschnitt 2.2.5). Zudem weist das Gatingverhalten große Ähnlichkeit zu dem in den Experimenten verwendeten Kanal Kv1.3 auf.

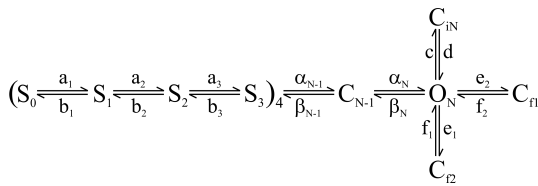


Abbildung 5.12: Aus diesem Zustandsdiagramm vom Kanal *Shaker* 29-4 ([Sch98c]) lässt sich das entsprechende lineare Differentialgleichungssystem 1. Ordnung aufstellen.

Aus dem Zustandsdiagramm (Abbildung 5.12) lässt sich ein lineares Gleichungssystem mit insgesamt 40 Zuständen konstruieren. Mit der in Abschnitt 5.2.1 erläuterten Matrixmethode wird das Öffnen des Kanals bei einer gegebenen Form der periodischen Stimulationsspannung berechnet. Die Wahl der vier Parameter V_M , V_{JM1} , dc und T bestimmt den genauen Kurvenverlauf. Für die erste Simulation wird der Punkt $(V_M, V_{JM1}, dc, T) = (-60 \text{ mV}, 200 \text{ mV}, 0.05, 100 \mu\text{s})$ gewählt. Diese Wahl stellt einen Kompromiss dar zwischen der experimentellen Durchführbarkeit und einem möglichst hohen Wert für den quasistationären Öffnungszustand des Kanals:

- Das Membranpotential von -60 mV entspricht in etwa dem Ruhepotential im Hodgkin-Huxley-Modell und lässt sich über die K^+ -Konzentration auch als K^+ -Umkehrpotential einstellen.
- Die maximale Membranspannung während der depolarisierenden Phase ist einerseits durch den bei ca. 300 mV einsetzenden Durchbruch der Membran beschränkt, andererseits durch die begrenzte Gültigkeit der Ratenkonstanten im aufgestellten Modell (in der entsprechenden Veröffentlichung [Sch98a, Sch98b, Sch98c] untersucht bis 147 mV).
- Durch die Wahl von $dc = 0.05$ und $T = 100 \mu\text{s}$ ergibt sich eine Zeitdauer für die depolarisierende Phase von $\Delta t_1 = 5 \mu\text{s}$. Dies liegt gerade im Bereich, in dem noch keine Filterwirkung des Systems Chip-Bad einsetzt. Dessen Filterfrequenz liegt bei etwa $1 \text{ nF} \cdot 1 \text{ k}\Omega = 1 \mu\text{s}$.

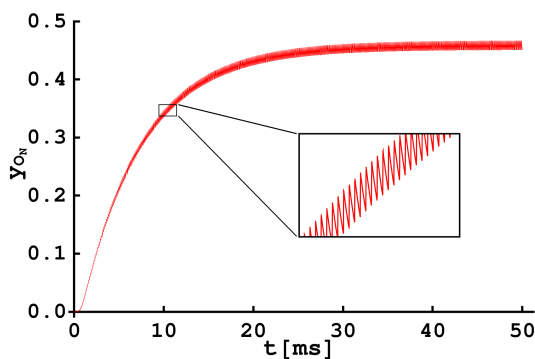


Abbildung 5.13: Öffnen des Kanals *Shaker* 29-4 mittels einer periodischen Spannung in der numerischen Simulation. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des offenen Zustandes steigt auf 46%. Das Insert zeigt einen stark vergrößerten Ausschnitt aus dem Kurvenverlauf bei $t = 2 \text{ ms}$.

In Abbildung 5.13 ist der Zeitverlauf der Besetzungswahrscheinlichkeit des offenen Zustandes $y_{O_N}(t)$ dargestellt. Für die gewählten Parameter erhält man den quasistationären Wert für die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals von $(y_\infty)_{O_N} = 0.46$. Aus der Übergangsmatrix erhält man außerdem eine Zeitkonstante von $\tau_{qs} = 6.86$ ms (Kehrwert des zweitkleinsten Eigenwerts der Übergangsmatrix). Das Insert zeigt einen Ausschnitt aus dem Kurvenverlauf zum Zeitpunkt $t = 10$ ms.

5.2.4 Abhängigkeit des Öffnungszustands von den Stimulationsparametern

Durch eine Änderung der vier Parameter, welche die Stimulationsspannung definieren, wird der quasistationäre Zustand y_∞ des Kanals beeinflusst. Im folgenden wird dies, ausgehend vom oben gewählten Punkt $(V_M, V_{JM1}, dc, T) = (-60$ mV, 200 mV, 0.05, 100 μ s) im Parameterraum, untersucht. Besonders interessant ist die Besetzung des offenen Zustandes $(y_\infty)_{O_N}$ (vgl. Übergangsschema Abbildung 5.12), auf den sich alle im folgenden gezeigten Diagramme beziehen. In den meisten Darstellungen wird jeweils nur der Mittelwert $(y_\infty)_{O_N}$ aus den Werten $(y_\infty^1)_{O_N}$ nach der depolarisierenden und $(y_\infty^2)_{O_N}$ nach der hyperpolarisierenden Phase gezeigt, da diese nur sehr gering voneinander abweichen. Nur bei einer Vergrößerung der Periodendauer T auf Werte über 0.5 ms findet eine merkliche Aufspaltung der Kurve statt.

Der Kurvenverlauf bei unterschiedlichen Periodendauern T ist in Abbildung 5.14 für die Werte $T = 1$ μ s, 10 μ s, 30 μ s, 100 μ s, 1 ms gezeigt. Bei langen Perioden erkennt man die bereits angesprochene Verbreiterung der Kurve. Außerdem wurde für $T = 1$ ms auf das Lösungsverfahren durch die Multiplikation mit Exponentialmatrizen verzichtet, da hierbei nur die Werte von $y(t)$ an den Übergangspunkten zwischen den beiden Phasen berechnet werden können. Da $y(t)$ im Falle längerer Perioden zwischen den Wendepunkten jedoch deutlich vom linearen Verlauf abweicht, wurde hier die Differentialgleichung komplett gelöst. Es ergeben sich dadurch innerhalb jeder Periode gekrümmte Kurvenstücke.

Die Abhängigkeit der quasistationären Endwerte $(y_\infty^{1/2})_{O_N}$ von der Periodendauer T ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Für $T \rightarrow 0$ geht $(y_\infty)_{O_N}$ gegen den hochfrequenten Grenzwert. Für große T sieht man die Aufspaltung in die Kurven für die Werte nach der de- bzw. hyperpolarisierenden Phase. Die roten Kurven beschreiben den Verlauf von $(y_\infty^{1/2})_{O_N}$ für einen duty cycle von $dc = 0.05$, die grünen für $dc = 0.1$. Für mittlere T um etwa 200 – 500 μ s erreichen die $(y_\infty^{1/2})_{O_N}$ ein Minimum, steigen bei längeren T aber wieder an. Eine mathematische Begründung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden.

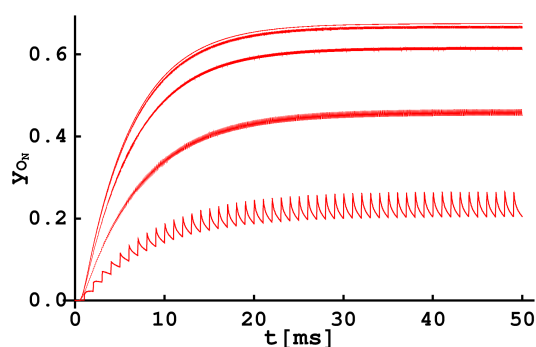


Abbildung 5.14: Durch Variation der Periode T ändert sich der Kurvenverlauf. Hier sind Kurven für $T = 1$ μ s, 10 μ s, 30 μ s, 100 μ s, 1 ms gezeigt.

5.2. ANWENDUNG AUF KANALMODELLE MIT MEHR ALS ZWEI ZUSTÄNDEN

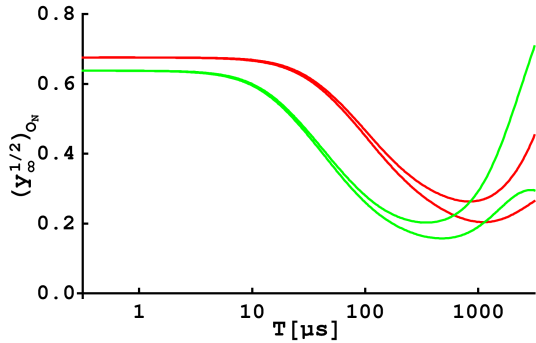


Abbildung 5.15: Abhängigkeit der quasistationären Grenzwerte $(y_\infty^1)_{ON}$ und $(y_\infty^2)_{ON}$ von der Periodendauer T .

Rote Kurve: $dc = 0.05$
Grüne Kurve: $dc = 0.1$

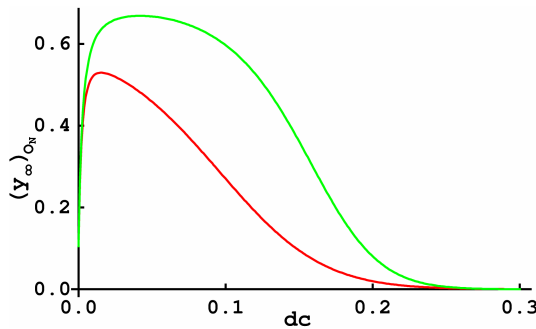


Abbildung 5.16: Abhängigkeit des quasistationären Grenzwerts $(y_\infty)_{ON}$ vom duty cycle dc .

Rote Kurve: $T = 100 \mu s$
Grüne Kurve: $T = 10 \mu s$

Der Wert des quasistationären Zustandes $(y_\infty^{1/2})_{ON}$ wird stark vom duty cycle dc beeinflusst (Abbildung 5.16). Die rote Kurve beschreibt $(y_\infty)_{ON}$ in Abhängigkeit von dc für eine Periodendauer von $T = 100 \mu s$, die grüne Kurve für $T = 10 \mu s$. Besonders für lange Perioden fällt $(y_\infty)_{ON}$ schnell auf geringe Werte ab und nur für kleine $dc < 0.1$ lässt sich der Kanal auf ein nennenswertes Maß öffnen. Für kurze Periodendauern (grün) lassen sich deutlich höhere Werte für $(y_\infty)_{ON}$ erzielen. Weil aber durch die Filterwirkung des Chip-Bad-Systems die Dauer der kürzeren depolarisierenden Phase nach unten beschränkt ist, kann nur bis zu einer maximalen Frequenz stimuliert werden. Im folgenden werden diese maximale Frequenz und der optimale Wert für den duty cycle dc bestimmt.

Der limitierende Faktor bei der Wahl von T und dc ist die Dauer der depolarisierenden Phase Δt_1 . Aus der minimalen Dauer, die die depolarisierende Phase anhalten soll, lässt sich bei gegebenem dc eine Periodendauer T ableiten. Weil die Dauer der depolarisierenden Phase $\Delta t_1 = dc \cdot T$ ist, ergibt sich bei minimalem Δt_1^{min} für die Periodendauer $T = \Delta t_1^{min} / dc$. Die Filterfrequenz des Chip-Bad-Systems liegt bei ungefähr $1 \mu s$, und die Dauer der depolarisierenden Phase sollte mindestens das fünffache, also $\Delta t_1^{min} = 5 \mu s$, betragen. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 5.17 dargestellt. Die Grafik zeigt die Höhenlinien für $(y_\infty)_{ON} = 0.1 \dots 0.6$ (Mittelwert aus $(y_\infty^1)_{ON}$ und $(y_\infty^2)_{ON}$) in Abhängigkeit vom duty cycle dc und der Periodendauer T . Die beiden anderen Parameter behielten den ursprünglich gewählten Ausgangswert $(V_M, V_{JM1}) = (-60 \text{ mV}, 200 \text{ mV})$. Die Kurve für $\Delta t_1 = dc \cdot T = 5 \mu s$ ist weiß eingezeichnet. Es lässt sich ablesen, dass der maximale quasistationäre Wert $(y_\infty)_{ON} = 0.46$ ungefähr bei $(dc, T) = (0.05, 100 \mu s)$ (Kreuz) erreicht wird (deshalb wurden diese Werte als Ausgangspunkt für die Rechnungen gewählt).

Die Abbildung 5.17 entspricht der Abbildung 5.7, die die Abhängigkeit des Öffnungszustands für den Modellkanal mit zwei Zuständen beschreibt. Beim Kanal *Shaker* 29-4 beginnt das maximale $(y_\infty)_{ON}$ schon bei $T \approx 100 \mu s$ abzusinken und nimmt bei $T \approx 1 \text{ ms}$

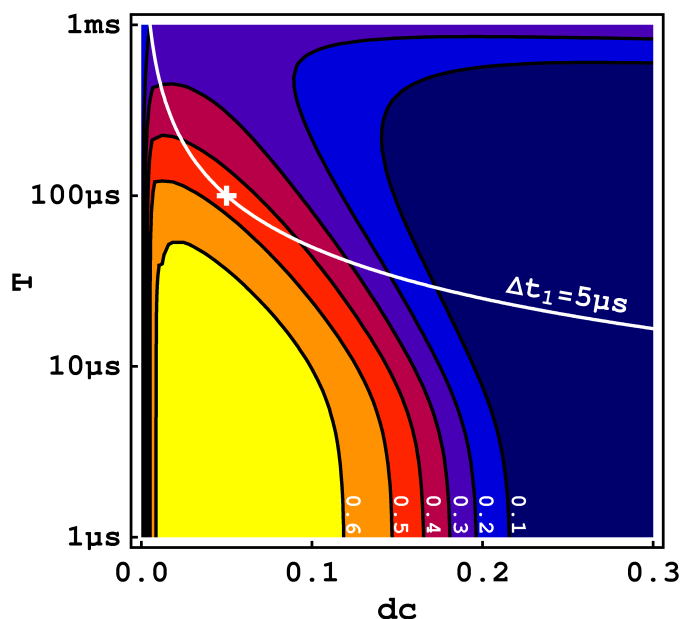


Abbildung 5.17: $(y_\infty)_{O_N}(dc, T)$ -Höhenprofil. Die Höhenlinien von $(y_\infty)_{O_N}$ für 0.1 bis 0.6 sind eingezeichnet. Die weiße Linie zeigt, welche Paare (dc, T) zu einer Dauer der depolarisierenden Phase von $\Delta t_1 = 5 \mu s$ führen. Der maximale Wert für $(y_\infty)_{O_N}$ wird etwa bei $(dc, T) = (0.05, 100 \mu s)$ erreicht (Kreuz). Für die beiden Spannungsparameter gilt $(V_M, V_{JM1}) = (-60 \text{ mV}, 200 \text{ mV})$.

geringe Werte um 0.2 an; der Modellkanal dagegen öffnet für alle Periodendauern bis $T > 1 \text{ ms}$ bei geringen dc auf Werte > 0.6 .

Berechnet man wie beim Modellkanal die Abhängigkeit des Öffnungszustands $(y_\infty)_{O_N}$ von den Parametern dc und V_{JM1} bei festen Werten $T = 100 \mu s$ und $V_M = -60 \text{ mV}$, so erhält man Abbildung 5.18 (weiße Linien: $T \rightarrow 0$). Auch der Kanal *Shaker* 29-4 wird durch hohe Spannungen V_{JM1} und geringe dc -Werte am besten geöffnet. Allerdings sieht man, dass auch bei $T \rightarrow 0$ der Kanal durch die periodische Spannung nicht weiter als bis etwa 0.77 geöffnet werden kann und nicht wie der Modellkanal auf Werte, die beliebig nahe an 1 liegen. Ursache hierfür sind die inaktivierten Zustände, die bei hohen Spannungen (C_{iN}) bzw. spannungsunabhängig (C_{f1}, C_{f2}) besetzt werden.

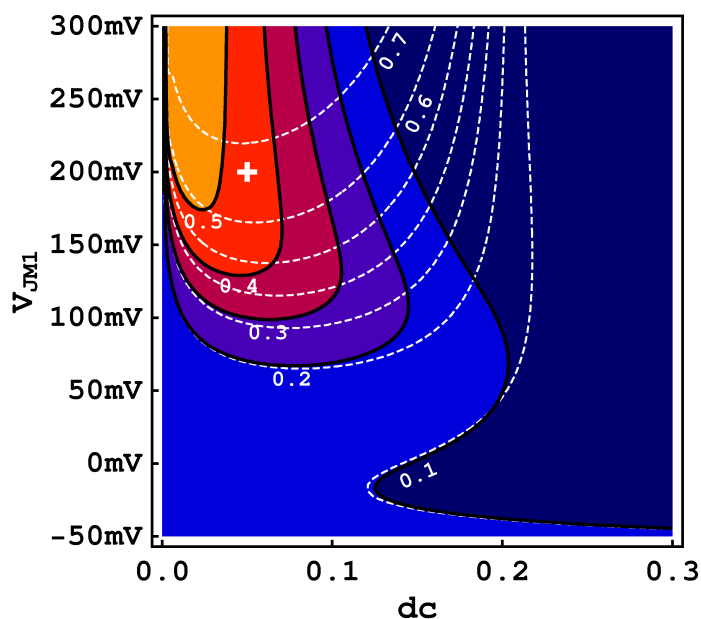


Abbildung 5.18: Darstellung von $(y_\infty)_{O_N}(dc, V_{JM1})$ für feste Werte $T = 100 \mu s$ und $V_M = -60 \text{ mV}$. Die weißen gestrichelten Linien sind die Höhenlinien für $T \rightarrow 0$. Das weiße Kreuz markiert wieder den anfangs ausgewählten Punkt $V_{JM1} = 200 \text{ mV}$ und $dc = 0.05$.

Am weitesten kann der Kanal durch geringe Werte für dc und hohe Anregungsspannungen V_{JM1} geöffnet werden.

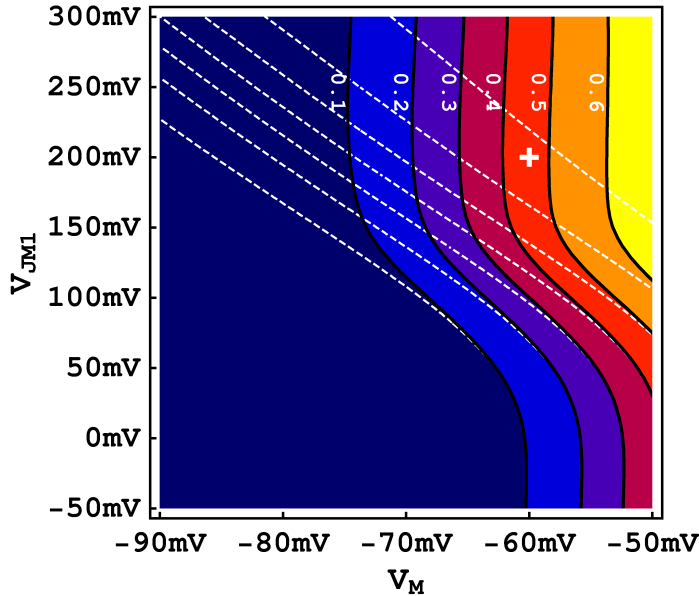


Abbildung 5.19: Darstellung von $(y_\infty)_{O_N}(V_M, V_{JM1})$ für feste Werte $T = 100 \mu\text{s}$ und $dc = 0.05$. Weiß gestrichelt: Höhenlinien für $T \rightarrow 0$. Weißes Kreuz: $V_M = -60 \text{ mV}$ und $V_{JM1} = 200 \text{ mV}$.

Für $T \rightarrow 0$ besteht wie beim Modellkanal ein linearer Zusammenhang zwischen V_M und V_{JM1} , wenn $(y_\infty)_{O_N}$ festgehalten wird.

Im folgenden wird der Einfluss der beiden Spannungsparameter V_M und V_{JM1} auf das Öffnen der Kanäle untersucht. Duty cycle und Periodendauer werden auf die Werte $(dc, T) = (0.05, 100 \mu\text{s})$ gesetzt. In Abbildung 5.19 ist gezeigt, wie $(y_\infty)_{O_N}$ von V_M und V_{JM1} abhängt. Klar ist, dass bei steigender Spannung V_M sich der Kanal öffnet, da dadurch sowohl die Spannung in der hyperpolarisierenden Phase V_{JM2} als auch diejenige in der depolarisierenden Phase V_{JM1} größer werden, der Kanal also langsamer schließt und schneller öffnet. In der Abhängigkeit von V_{JM1} zeigt sich, dass $(y_\infty)_{O_N}$ von $V_{JM1} = -50 \text{ mV}$ bis $V_{JM1} = 150 \text{ mV}$ ansteigt, bei höheren Spannungen jedoch auf einem konstanten Wert bleibt, da die höhere Öffnungsrate durch eine ebenso erhöhte Rate für das Schließen kompensiert wird.

Anders dagegen verhält es sich im hochfrequenten Grenzfall $T \rightarrow 0$ (weiße Linien). Wird die Spannung V_M niedrig gewählt, lässt sich der Kanal trotzdem weit öffnen, indem die Spannung während der depolarisierenden Phase hoch genug gewählt wird. In der Simulation zeigt sich, dass sogar für $V_M = -100 \text{ mV}$ der Kanal auf $(y_\infty)_{O_N} = 0.7$ geöffnet werden kann, wozu aber eine Spannung von $V_{JM1} = 500 \text{ mV}$ notwendig wäre. Im Experiment ist dies nicht möglich, weil einerseits die hohen Spannungen die Membran zerstören, und andererseits die Periodendauer T nach unten beschränkt ist. Hier bietet sich allerdings ein Ansatzpunkt für Untersuchungen an anderen, langsameren Kanälen.

Vergleicht man Abbildung 5.19 mit Abbildung 5.11 für den Modellkanal, zeigt sich eine starke Ähnlichkeit im Verlauf der Höhenlinien. Im Fall $T \rightarrow 0$ ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen V_{JM1} und V_M , wenn man $(y_\infty)_{O_N}$ bzw. n_∞ festhält. Wählt man eine geringere Frequenz der periodischen Spannung, so kann der Kanal in beiden Modellen auch durch hohe Anregungsspannungen V_{JM1} nicht über einen bestimmten, vom Haltepotential V_M abhängigen Wert geöffnet werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Abhängigkeit von n_∞ bzw. $(y_\infty)_{O_N}$ von den Parametern V_M , V_{JM1} , dc und T beim Modellkanal und dem Kanal *Shaker* 29-4 große Ähnlichkeit aufweisen. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Erkenntnisse auch auf andere Kanäle (z. B. Na^+ -Kanäle) übertragen lassen.

5.3 Einschränkungen bei der experimentellen Umsetzung

Versucht man, die Stimulation der Kanäle mit einer periodischen Rechteckspannung im Experiment zu verwirklichen, so stößt man auf mehrere Probleme. Erstens ist es nicht einfach, eine Spannung mit definierter Amplitude und geringer Abweichung von der Rechteckform im Spalt zu erzeugen. Dafür verantwortlich sind die Filterung der Spannung durch das System Chip-Bad, die Veränderung der Spannung im Spalt, wenn die Kanäle sich öffnen, und auch die spannungsabhängige Kapazität des Chips. Zweitens kommt es bei Stimulationsfrequenzen > 10 kHz zu Interferenz mit dem Patch-Clamp-Verstärker. Drittens ist fraglich, ob die Übergangsratenkonstanten das Verhalten der Kanäle bei hohen Frequenzen richtig beschreiben. Im folgenden werden die genannten Punkte genauer untersucht und die Grenzen der experimentellen Umsetzbarkeit der periodischen Stimulation (insbesondere bei hohen Frequenzen) erörtert.

5.3.1 Abweichung der Stimulationsspannung von der Rechteckform durch Chip-Bad-Filterung

Wenn für die Stimulationsspannung eine kurze Periodendauer gewählt wird und die Dauer der depolarisierenden Phase in den Bereich der Filterzeitkonstante des Systems Chip-

Abbildung 5.20: Durch die aus der Chipkapazität und dem Badwiderstand entstehende Filterwirkung liegt am Chip nicht die gesamte Stimulationsspannung V_S an. Ein Teil fällt am Badwiderstand ab. Dadurch verliert die Spannung V_{JM} über die untere Zellmembran ihre Rechteckform.

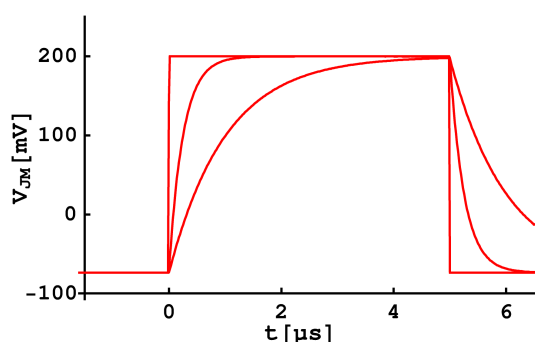
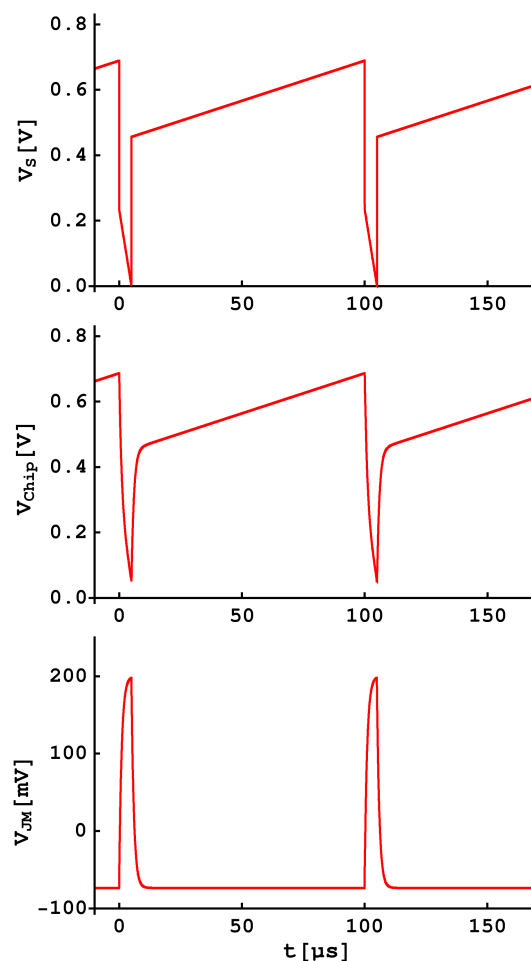


Abbildung 5.21: Für Filterzeitkonstanten von 0, 0.25 und 1 μ s werden die Kanten in der Spannung V_{JM} über die untere Zellmembran verschieden stark abgeflacht.



Bad kommt, so weicht der Verlauf der Spannung $V_{JM}(t)$ über die untere Zellmembran von der Rechteckform ab. Während der Aufladung der Chipkapazität entsteht am Badwiderstand ein Spannungsabfall, so dass nur ein Bruchteil V_{Chip} der Stimulationsspannung am Chip anliegt (Abbildung 5.20). Die Sprünge in der Stimulationsspannung werden durch den Tiefpass herausgefiltert und damit zu Exponentialfunktionen verzerrt. Die Form von V_{JM} während der $5\ \mu\text{s}$ dauernden depolarisierenden Phase ist vergrößert in Abbildung 5.21 für Filterzeitkonstanten von $0\ \mu\text{s}$, $0.25\ \mu\text{s}$ und $1\ \mu\text{s}$ gezeigt. Die Stimulationsspannung V_S wurde wie in Abschnitt 5.2.3 durch die Parameter $(V_M, V_{JM1}, dc, T) = (-60\ \text{mV}, 200\ \text{mV}, 0.05, 100\ \mu\text{s})$ bestimmt.

Die für die Filterung verantwortliche Chipkapazität setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: Erstens die Spotkapazität, welche sich aus der Größe des Reizspots und der spezifischen Kapazität des Dielektrikums berechnet. Bei einem Spottdurchmesser von $250\ \mu\text{m}$ und einer spez. Kapazität von $1.5\ \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ ergibt sich eine Spotkapazität von $736\ \text{pF}$. Der zweite Anteil der Chipkapazität wird durch den Rest des Chips gebildet, welcher durch ein dickeres (ca. $1\ \mu\text{m}$) Schutzoxid bedeckt ist. Bei einem Chipdurchmesser von $4\ \text{mm}$ und einer spezifischen Oxidkapazität von $0.003\ \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ erhält man hierfür eine Kapazität von $377\ \text{pF}$. Zusammen ergibt sich eine Chipkapazität von etwa $1\ \text{nF}$. Besteht die Notwendigkeit zur Reduktion der Filterwirkung, lässt sich durch Verkleinerung des Spots oder durch zusätzliche Beschichtung des Schutzoxids z. B. mit PDMS (Sylgard) die Kapazität reduzieren.

Der Badwiderstand wird ebenfalls durch zwei Komponenten gebildet, nämlich durch den Übergangswiderstand von der Badelektrode zum Elektrolyten und durch den Widerstand des Elektrolyten selbst. Der Übergangswiderstand der Ag/AgCl-Elektrode entsteht durch die chemische Reaktion an der Oberfläche der Elektrode. Der Widerstand des Elektrolyten selbst wird bestimmt durch die geometrische Anordnung von Badelektrode und Chip, dem Abstand des Mikroskopobjektives zum Chip und die Leitfähigkeit des Mediums. Wird ein Elektrolyt mit geringer Leitfähigkeit verwendet, ist es günstig, die Badelektrode ringförmig in einem Abstand von etwa $1\ \text{mm}$ um den Chip zu biegen. Damit lässt sich der Widerstand von $3\ \text{k}\Omega$ für eine Elektrode am Rand der Schale auf etwa $1\ \text{k}\Omega$ reduzieren. Bei Verwendung eines physiologischen Elektrolyten erhält man bei sinnvoller Anordnung der Badelektrode einen gesamten Badwiderstand von etwa $500\ \Omega$.

5.3.2 Veränderung der Spannung im Spalt beim Öffnen der Kanäle

Solange die Kanäle der Zellmembran geschlossen sind, fließt der kapazitive Strom während einer Spannungsrampe am Chip über die Spotkapazität und den Spaltwiderstand in das Bad. Sobald sich die Kanäle aber öffnen, entsteht eine weitere Leitfähigkeit über die Membran ins Zellinnere. Da das Zellinnere auf einer negativen Spannung liegt, fließt in diesem Fall ein Strom durch die Kanäle vom Spalt in die Zelle. Das Potential im Spalt verringert sich, und die Form der Spannung im Spalt bzw. über die Zellmembran wird von der berechneten Rechteckform abweichen.

In Abbildung 5.22 ist gezeigt, wie verschiedene Leitfähigkeiten der unteren Zellmembran die Form der Transienten im Spalt beeinflussen. Zu sehen ist die Spannung V_{JM} während der langen, hyperpolarisierenden Phase der Stimulationsspannung, da hier die Auswirkungen besonders deutlich zu erkennen sind. Die zeigen, wie sich der Spannungsverlauf von der Rechteckform (Membranleitfähigkeit: $0.2\ \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$) zu einem exponentiellen Abfall

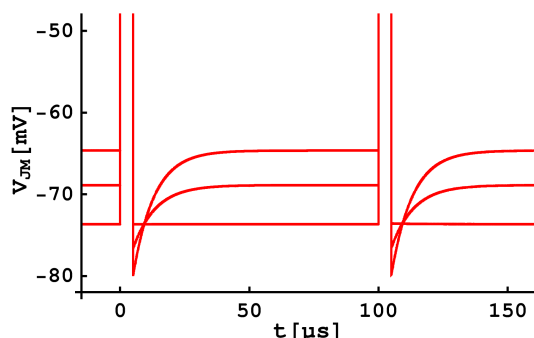


Abbildung 5.22: Wenn die Kanäle in der unteren Zellmembran sich öffnen, fließt ein Strom vom Spalt durch die Kanäle in das Zellinnere. Dadurch verändert sich die Form der Spannungstransienten über die Zellmembran. Werte für die Membranleitfähigkeit: $40 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$, $20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$, $0.2 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$.

verändert (Leitfähigkeiten: $20 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$ und $40 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$). Die Spannung kurz vor der depolarisierenden Phase fällt dabei von 74 mV auf 69 mV bzw. 65 mV ab (mittleres Membranpotential $V_M = -60 \text{ mV}$). Die übrigen Parameter der Stimulationsspannung wurden wieder auf die Werte $V_{JM1} = 200 \text{ mV}$, $dc = 0.05$ und $T = 100 \mu\text{s}$ gesetzt. Der Zellradius wurde auf $r_J = 13 \mu\text{m}$ gesetzt, was bei normaler physiologischer Lösung zu einem Spaltwiderstand von $R_J = 0.7 \text{ M}\Omega$ führt.

5.3.3 Periodische Stimulation im Current-Clamp

In allen Simulationen wurde die intrazelluläre Spannung auf einen konstanten Wert gesetzt. Experimentell lässt sich dies bei hohen Frequenzen ($> 2 \text{ kHz}$) jedoch nicht realisieren. Ursache dafür ist die prinzipielle Funktionsweise eines Patch-Clamp-Verstärkers. Im Voltage-Clamp-Modus wird abwechselnd die Spannung gemessen und dann ein entsprechender Strom injiziert, um die Zelle auf das erwünschte Potential zu bringen (vgl. Abschnitt 3.3). Spannungsmessung und Strominjektion wechseln sich mit einer Frequenz von etwa 50 kHz ab. Eine Spannungsmessung findet also maximal alle $20 \mu\text{s}$ statt. Deshalb kann bei hohen Frequenzen und kleinen Werten für den duty cycle die Spannung in der Zelle nicht konstant gehalten werden.

Eine Möglichkeit, die Zelle mit Spannungen höherer Frequenzen zu stimulieren, bietet die Messung im Current-Clamp-Modus. In Abbildung 5.23 sind die zugrundeliegenden elektrischen Schaltbilder von Voltage- und Current-Clamp (mit $I_P = 0$) gegenübergestellt. Dabei sind nur die bei der periodischen Stimulation wesentlichen Komponenten gezeigt.

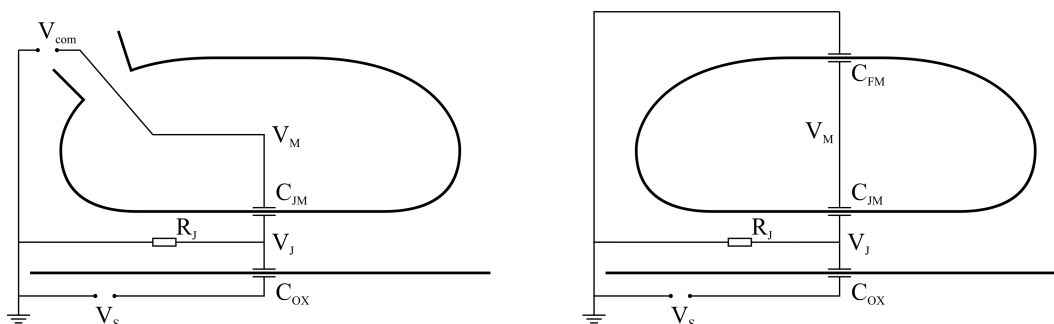


Abbildung 5.23: Reduziert man die elektrischen Modelle für Voltage-Clamp (links) und Current-Clamp (rechts) auf die für die periodische Stimulation wesentlichen Komponenten, besteht der Unterschied nur in der zusätzlichen Kapazität C_{FM} der freien Membran.

Im Current-Clamp-Modus tritt an Stelle der Kapazität der Junctionmembran C_{JM} die aus Junction- und freier Membran gebildete Kapazität, also zusammen $C_{CC} = 1/(\frac{1}{C_{JM}} + \frac{1}{C_{FM}})$. An die Stelle der geklemmten intrazellulären Spannung V_M tritt das Badpotential.

Da für das Zustandekommen der Spannung V_{JM} im Voltage-Clamp-Modell der periodischen Stimulation die Ströme durch die Membran nur kapazitiv sind, lässt sich das Stimulationsprinzip auf den Current-Clamp-Modus übertragen. Um einen bestimmten rechteckigen Spannungsverlauf über die untere Membran zu erhalten, wird in den Berechnungen in Abschnitt 5.1.1 die Kapazität C_{JM} durch $C_{CC} = 1/(\frac{1}{C_{JM}} + \frac{1}{C_{FM}})$ ersetzt. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass durch den Spannungsteiler aus C_{JM} und C_{FM} nur der Bruchteil $\frac{C_{FM}}{C_{JM}+C_{FM}}$ der Gesamtspannung über die untere Membran abfällt und dass durch die umgekehrte Orientierung der oberen Membran das Vorzeichen der Membranspannung wechselt.

5.3.4 Unbekanntes Gatingverhalten der Kanäle bei hohen Spannungen und Frequenzen

Das für die Simulationen verwendete Modell für den *Shaker* 29-4 K^+ -Kanal aus [Sch98a, Sch98b, Sch98c] wurde durch Messungen gewonnen, in denen die Spannung über die Zellmembran maximal 147 mV betrug. Für höhere Membranspannungen können deshalb keine verlässlichen Aussagen über das Gatingverhalten der Kanäle getroffen werden. Die Berechnungen in Abschnitt 5.2.3 für 200 mV wurden unter der Annahme durchgeführt, dass das Modell auch für höhere Spannungen noch gültig ist.

Gleiches gilt für die Zeitauflösung der in o. g. Veröffentlichung ausgewerteten Daten. Die Filterung wurde bei maximal 15 kHz durchgeführt, was zu einer Zeitauflösung von etwa 40 μs führt. Die Anwendbarkeit des Modells beschränkt sich auf Zeitskalen, innerhalb derer mit einer Relaxation des Kanalproteins nach Übergang in einen neuen Zustand gerechnet werden kann. Dies bedeutet, dass bei schnelleren Ereignissen, z. B. der mehrfache Änderung der Membranspannung innerhalb einiger μs , völlig veränderte Gatingeigenschaften des Kanals auftreten könnten.

Sowohl im Fall hoher Spannungen als auch hoher Frequenzen könnte eine Behandlung der Ionenkanal-Dynamik als Modell mit diskreten Zuständen unzutreffend sein. Den dabei auftretenden Prozessen werden die Diffusionsmodelle gerecht, in denen sich der Spannungssensor des Ionenkanals in einer kontinuierlichen Potentiallandschaft bewegt [Sig99]. Da die kapazitive Stimulation der Ionenkanäle in der Zellmembran auf Zeitskalen im μs -Bereich möglich ist, wäre dies ein passendes Instrument, um derartige Vorgänge auf kurzen Zeitskalen zu untersuchen.

Kapitel 6

Ergebnisse und Ausblick

Ergebnisse

- Im zentralen Experiment der Arbeit wurden die Ionenkanäle der unteren Zellmembran durch die extrazelluläre Spannung geöffnet, die im Spalt zwischen Chip und Zelle durch das Anlegen einer Spannungsrampe am Chip entsteht. Die für die starke Kopplung notwendige erhöhte Zeitkonstante im Spalt wurde durch Verwendung neuer Dielektrika hoher Kapazität und die Verringerung der Leitfähigkeit des Badelektrolyten erreicht.
- Dass es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um K^+ -Ströme durch die von der extrazellulären Spannung geöffneten Kanäle handelt, konnte durch Blockierung der Kanäle durch Margatoxin, ein für den Kv1.3-Kanal spezifisches Kanalgift, gezeigt werden. Durch Variation der extrazellulären Spannung konnte eine Gatingkurve für die Ionenkanäle bestimmt werden. Dies belegt, dass die Funktionalität der Kanäle in der Adhäsionsmembran erhalten bleibt.
- Die Charakterisierung des Chip-Zelle-Interfaces auf optischem Weg bestand aus einer Messung des Abstandes der Zelle zum Chip, einer Bestimmung der Oberflächengeometrie der Zelle und einer Messung der Spannung über die untere Zellmembran mittels spannungsabhängiger Fluoreszenzfarbstoffe. Die elektrische Charakterisierung gelang durch Kombination intra- und extrazellulärer Spannungspulse und ermöglichte eine Bestimmung der Membran- und Kopplungsparameter.
- Berechnungen am Modell des K^+ -Kanals *Shaker 29-4* ergaben, dass eine Stimulation der Zelle mit einer periodischen Spannung die Kanäle öffnen kann, obwohl das mittlere Membranpotential auf seinem Ruhewert bleibt. Der Einfluss verschiedener Parameter der periodischen Stimulationsspannung auf den Öffnungszustand der Kanäle wurde untersucht.

Ausblick

- Die Experimente, die in der vorliegenden Arbeit an K^+ -Ionenkanälen gelungen sind, müssen an Na^+ -Kanälen wiederholt werden. Das Öffnen der Na^+ -Kanäle in der adhärenierten Zellmembran ist ein wichtiger Schritt zur Konstruktion eines Silizium-Neuron-Interfaces, von dem aus Aktionspotentiale in Nervenzellen ohne Elektroporation der Zellmembran ausgelöst werden können.

- Eine wesentliche Einschränkung bei den durchgeführten Experimenten bestand in der Verwendung des Na^+ -freien Badelektrolyten, durch dessen verminderte Leitfähigkeit sich die für eine effiziente Kopplung notwendige große Zeitkonstante im Spalt erreichen lässt. Der Übergang auf einen physiologischen Elektrolyten ist nur möglich, wenn im Gegenzug die spezifische Kapazität des Reizspots erhöht wird. Gleichzeitig muss die dielektrische Schicht auch im Hinblick auf die mechanische und chemische Widerstandsfähigkeit bei häufiger Benutzung optimiert werden.
- In numerischen Simulationen ließen sich die Kanäle durch eine periodische Stimulationsspannung öffnen. Die bei der experimentellen Umsetzung auftretenden Probleme wurden bereits angesprochen und müssen bei einer weiteren Bearbeitung dieses Themas gelöst werden.

Anhang A

Verwendete Materialien

A.1 Geräte

Computer:

Syncron PC, Pentium III, 500 MHz

Messkarten:

PCI-6024E, 200 kS/s, National Instruments

PCI-GPIB, National Instruments

Software:

Betriebssystem Windows 98

Labview 5.1, National Instruments

Mathematica 4.2, Wolfram Research

Mikroskop:

BX50WI (Auflicht), Olympus

Objektiv LUMPlanFl 40×/0.80 W

Okular 10×

Hellfeldbeleuchtung mit U-LH100L, Olympus (100 W Halogenlampe)

Funktionsgenerator:

33120A, 15 MHz Function/Arbitrary Waveform Generator, Agilent

Patch-Clamp-Verstärker:

SEC-05L, npi electronics, 71732 Tamm

Mikromanipulator:

Patchman, Eppendorf, 22331 Hamburg

Puller für Mikropipetten:

DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instruments, 81377 München

Anlage für Wasserreinigung (für Lösungen):

Milli-RO und Milli-Q

Millipore GmbH, 65824 Schwalbach

A.2 Lösungen

Extrazelluläres Medium:

Angaben in mM

KCl 5.4, NaCl 135, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, Glucose 10, HEPES 5

pH-Wert 7.2 (eingestellt mit NaOH)

steril filtriert

Extrazelluläres Medium, Na⁺-frei:

Angaben in mM

KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, Glucose 250, HEPES 5

pH-Wert 7.2 (eingestellt mit KOH)

steril filtriert

Intrazelluläres Medium:

Angaben in mM

KCl 140, HEPES 10, EGTA 5

pH-Wert 7.4 (eingestellt mit KOH)

steril filtriert

Stammlösung Fibronectin:

1 mg Fibronectin F-2006 (Sigma)

aufgelöst in 1 ml sterilem H₂O (30 min, 37 °C)

aliquotiert in 200 µl

Aufbewahrung bei 4 °C (bis 1 Jahr)

Verdünnung bei der Anwendung 1:40

Kulturmedium:

Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, Sodium Pyruvate, Glucose, Pyridoxine
Cat. No. 21885-025, Gibco™, Invitrogen Corp.

Zusatz: 10% FKS, Gibco™ 40F6414K (30 min hitzeinaktiviert bei 56 °C)

Für transfizierte Zellen zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes:

zusätzlich 100 µg/ml G418 (Geneticin)

Puffermedium PBS:

PBS Dulbecco's, Cat. No. 14040-091

Gibco™, Invitrogen Corp.

A.3 Bezugsquellen

HEK-Zellen:

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH),
38124 Braunschweig

Wafer für die Stimulationschips:

ITEM # G40112
Bor-dotiert, Orientierung 100
Widerstand 0.006–0.010 Ωcm , Dicke $525 \pm 25 \mu\text{m}$
WaferNet GmbH, 85386 Eching

Kulturschalen:

FalconTM 35-3001
BD Biosciences, 69126 Heidelberg

Kleber für Chips:

medizinischer Kleber MK3, Fa. Sulzer Osypka, 79618 Rheinfelden-Herten
(identisch mit Elastosil E43, Wacker, 84489 Burghausen)

Mikropipetten:

VITREX von Modulohm A/S, DK-2730 Herlev
1.050 – 1.50 x 100 mm
zu beziehen über
Science Products GmbH, 65719 Hofheim
Produktname GB150–T10

Badelektroden:

EP05, Electrode Ag/AgCl 0.5 mm dia
World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL 34240-9258 USA

Reinigungslösung für Chips:

Tickopur RP100, Bandelin, 12207 Berlin

Margatoxin:

Bachem Biochemica GmbH, 69126 Heidelberg

Farbstoffe DiIC₁₈(3) und Fluorescein:

Molecular Probes, 2333 AA Leiden, Niederlande
Best.-Nr. D-282, H-110

Sonstige Chemikalien:

Sigma, 89552 Steinheim
Merck, 64271 Darmstadt

Literaturverzeichnis

- [Atk98] P. W. Atkins. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 6th edition, 1998.
- [Bir01] T. Birkenmaier. Dünne Schichten mit hoher DK zur Optimierung von Neurochips. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2001.
- [Bra97] D. Braun, P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy of cell adhesion on oxidized silicon. *Applied Physics A – Materials Science & Processing*, 65(4–5):341–348, 1997.
- [Bra00] D. Braun. *Capacitive stimulation of mammalian cells on silicon chips imaged at optical resolution with voltage-sensitive dyes*. Dissertation, Technische Universität München, 2000.
- [Bra01] D. Braun, P. Fromherz. Fast voltage transients in capacitive silicon-to-cell stimulation detected with a luminescent molecular electronic probe. *Physical Review Letters*, 86(13):2905–2908, 2001.
- [Cat44] A. Catsch. Eine erbliche Störung des Bewegungsmechanismus bei *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 82:64–66, 1944.
- [Cla00] J. R. Clay. Determining K^+ channel activation curves from K^+ channel currents. *European Biophysics Journal*, 29(7):555–557, 2000.
- [Con99] E. C. Conley, W. J. Brammar. *The Ion Channel Facts Book*, Einträge 48-33, 48-34, 48-41. Academic Press, 1999.
- [Fro95] P. Fromherz, A. Stett. Silicon-neuron junction – capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. *Physical Review Letters*, 75(8):1670–1673, 1995.
- [GC93] M. Garcia-Calvo, R. J. Leonard, J. Novick, S. P. Stevens, W. Schmalhofer, G. J. Kaczorowski, M. L. Garcia. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25):18866–18874, 1993.
- [Goy02] I. Goychuk, P. Hänggi. Ion channel gating: A first-passage time analysis of the Kramers type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6):3552–3556, 2002.

- [Gra77] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type-5. *Journal of General Virology*, 36(1):59–72, 1977.
- [Gur83] J. B. Gurdon, M. P. Wickens. The use of *Xenopus* Oocytes for the expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 101:370–386, 1983.
- [Ham81] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 391(2):85–100, 1981.
- [Har77] T. Harrison, F. Graham, J. Williams. Host-range mutants of adenovirus type-5 defective for growth in HeLa-cells. *Virology*, 77(1):319–329, 1977.
- [Hüb03] G. Hübener, A. Lambacher, P. Fromherz (accepted). Anellated hemicyanine dyes with large symmetrical solvatochromism of absorption and fluorescence. *Journal of Physical Chemistry*, 2003.
- [Hil01] B. Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., 3rd edition, 2001.
- [Hän90] P. Hänggi, P. Talkner, M. Borkovec. Reaction-rate theory: Fifty years after Kramers. *Review of Modern Physics*, 62(2):251–341, 1990.
- [Hod52] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its applications to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4):500–544, 1952.
- [Ive90] L. E. Iverson, B. Rudy. The role of divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derived from the *Shaker* gene of *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 10(9):2903–2916, 1990.
- [Jen97] M. Jenkner, P. Fromherz. Bistability of membrane conductance in cell adhesion observed in a neuron transistor. *Physical Review Letters*, 79(23):4705–4708, 1997.
- [Jia03] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423:33–41, 2003.
- [Joh95] D. Johnston, S. M. Wu. *Foundations of Cellular Neurophysiology*. The MIT Press, 1995.
- [Kam87] A. Kamb, L. E. Iverson, M. A. Tanouye. Molecular characterization of *Shaker*, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell*, 50(3):405–413, 1987.
- [Kam88] A. Kamb, J. Tseng-Crank, M. A. Tanouye. Multiple products of the *Drosophila Shaker* gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron*, 1(5):421–430, 1988.
- [Kra40] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7(4):284–304, 1940.

- [Kuh03] B. Kuhn, P. Fromherz (accepted). Anellated hemicyanine dyes in neuron membrane: molecular Stark effect and optical voltage recording. *Journal of Physical Chemistry*, 2003.
- [Lam96] A. Lambacher, P. Fromherz. Fluorescence interference-contrast microscopy on oxidized silicon using a monomolecular dye layer. *Applied Physics A – Materials Science & Processing*, 63(3):207–216, 1996.
- [Lam02] A. Lambacher, P. Fromherz. Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes. *Journal of the Optical Society of America B – Optical Physics*, 19(6):1435–1453, 2002.
- [Lüe36] H. Lüers. Shaker, eine erbliche Bewegungsstörung bei *Drosophila funebris*. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 72:119–126, 1936.
- [Neh76] E. Neher, B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802, 1976.
- [Nie01] M. Nieminen. *Deposition of binary and ternary oxide thin films of trivalent metals by atomic layer epitaxy*. Dissertation, Helsinki University of Technology, 2001.
- [Num96] M. Numberger, A. Draguhn. *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
- [Pap87] D.M. Papazian, T.L. Schwarz, B.L. Tempel, Y.N. Jan, L.Y. Jan. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, 237(4816):749–753, 1987.
- [Rah02] A. Rahtu. *Atomic layer deposition of high permittivity oxides: Film growth and in situ studies*. Dissertation, University of Helsinki, 2002.
- [Sal83] L. Salkoff. Genetic and voltage-clamp analysis of a *Drosophila* potassium channel. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 48:221–231, 1983.
- [Sch92] N.E. Schoppa, K. McCormack, M.A. Tanouye, F.J. Sigworth. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science*, 255(5052):1712–1715, 1992.
- [Sch98a] N.E. Schoppa, F.J. Sigworth. Activation of *Shaker* potassium channels I. Characterization of voltage-dependent transitions. *The Journal of General Physiology*, 111(2):271–294, 1998.
- [Sch98b] N.E. Schoppa, F.J. Sigworth. Activation of *Shaker* potassium channels II. Kinetics of the V2 mutant channel. *The Journal of General Physiology*, 111(2):295–311, 1998.
- [Sch98c] N.E. Schoppa, F.J. Sigworth. Activation of *Shaker* potassium channels III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *The Journal of General Physiology*, 111(2):313–342, 1998.
- [Seq] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, GenInfo Identifier 9506826.

LITERATURVERZEICHNIS

- [SG93] R. Sherman-Gold, editor. *The Axon Guide*. Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA, 1993.
- [Sig99] D. Sigg, H. Qian, F. Bezanilla. Kramers' diffusion theory applied to gating kinetics of voltage-dependent ion channels. *Biophysical Journal*, 76(2):782–803, 1999.
- [Stü89] W. Stühmer, J. P. Ruppersberg, K. H. Schröter, B. Sakmann, M. Stocker, K. P. Giese, A. Perschke, A. Baumann, O. Pongs. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO Journal*, 8(11):3235–3244, 1989.
- [Ste97] A. Stett, B. Müller, P. Fromherz. Two-way silicon-neuron interface by electrical induction. *Physical Review E*, 55(2):1779–1782, 1997.
- [Str01] B. Straub. *Kopplung von Feldeffekttransistoren mit rekombinanten Ionenkanälen*. Dissertation, Technische Universität München, 2001.
- [Sze81] S. M. Sze. *Physics of Semiconductor Devices*. John Wiley & Sons, 2nd edition, 1981.
- [Tem87] B. L. Tempel, D. M. Papazian, T. L. Schwarz, Y. N. Jan, L. Y. Jan. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science*, 237(4816):770–775, 1987.
- [Tim88] L. C. Timpe, T. L. Schwarz, B. L. Tempel, D. M. Papazian, Y. N. Jan, L. Y. Jan. Expression of functional potassium channels from *Shaker* cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 331(6152):143–145, 1988.
- [Ul99] M. Ulbrich. Selbsterregung eines Blutegelneurons durch Siliziumchip. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1999.
- [Wal03] F. Wallrapp. Halbleiter mit Hoch-DK-Beschichtung zur Stimulation von Nervenzellen. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2003.
- [Wei97] R. Weis, P. Fromherz. Frequency dependent signal transfer in neuron transistors. *Physical Review E*, 55(1):877–889, 1997.

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. P. Fromherz für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, seine Betreuung und Diskussionsbereitschaft,

Christian Figger für die Verbreitung guter Laune in unserem Labor,

Raimund Gleixner für die Messungen mit spannungsabhängigen Farbstoffen und seine Hilfe bei den FLIC- und Konfokalmessungen,

den Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik am Max-Planck-Institut für Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre,

meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für ihre finanzielle und mentale Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.