



Neuronen können elektrische Signale abfeuern. Dies geschieht in der Form, dass („wie auch beim Strom aus der Steckdose“) eine Ladungsdifferenz/ „Spannung“ zwischen + und - durch sich bewegend Ladungsträger ausgeglichen wird. Ladungsträger sind geladene Teilchen wie Elektronen, Protonen, Kationen oder Anionen; sich bewegend Ladungsträger bezeichnet man als Stromfluss.

Im Gegensatz zum elektrischen Strom aus der Steckdose werden in und an Neuronen keine Elektronen bewegt, sondern hier strömen Ionen. Damit aber überhaupt Ionen strömen können, muss zunächst eine Spannung, ein sogenanntes Membranpotenzial, aufgebaut werden. Dies geschieht durch eine Ungleichverteilung von Ionen im, am und um ein Neuron. Die sich durch Ionen-Ungleichverteilungen aufbauenden Spannungen im Neuronen-Ruhezustand können mit Hilfe moderner Messmethoden bestimmt werden kann. Folgende Messtechniken wurden entwickelt:

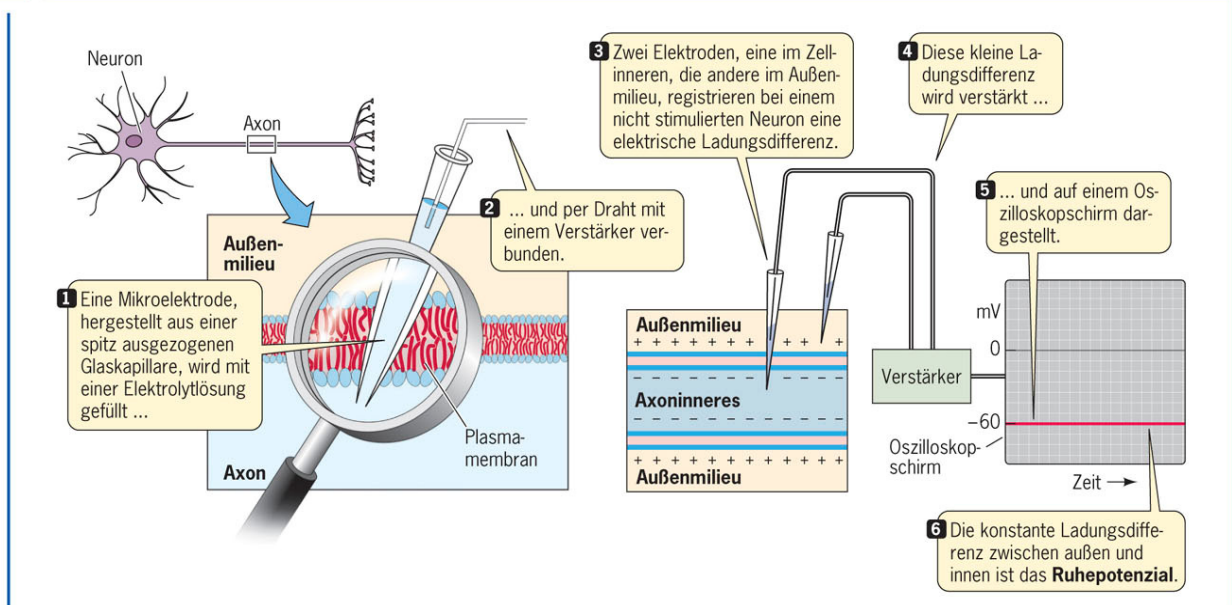
- Voltage-Clamp Methode (Ende des 18. Jahrhunderts von Luigi Galvani): Man konnte Stromableitungen an einigen cm-langen, elektrisch erregten Tintenfisch-Axonen durchführen.
- Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Verfahren (TEVC), das erlaubt, potentialabhängige Membranleitfähigkeiten an einzelnen, relativ großen Zellen im mm-Bereich zu messen. Beim TEVC werden mit Hilfe zweier Mikroelektroden, welche in die Zelle gestochen werden, der Zellmembran Potentialänderungen aufgezwungen. Gleichzeitig wird der über die Membran fließende Strom gemessen, woraus man eine Potentialabhängigkeit der Membranleitfähigkeit analysieren kann.
- Patch-Clamp-Verfahren: Neher und Sakmann gelang es 1976 erstmals mit einer einzigen Mikroelektrode Spannungs- und Strommessung zu verwirklichen, und hierbei Kanalströme einzelner, kanalbildender Proteinen sichtbar zu machen. Neher und Sakmann wurden für die Entwicklung des Patch-Clamp-Verfahrens 1991 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Heutzutage verwendet man die Patch-Clamp-Methode, wobei je nach Untersuchungsobjekt zwischen vier möglichen Patch-Clamp-Konfigurationen ausgewählt wird:

- Cell-Attached: Die einfachste Methode: Der Kanal wird vollständig in seiner natürlichen Umgebung belassen, Stoffe aus dem Inneren der Zelle (beispielsweise wichtig bei ATP-aktivierten Transportern) können weiterhin wirken.
- Inside-Out (auch einfach „excised“ genannt): Gigaseals sind nicht nur elektrisch, sondern auch mechanisch stabil. Dadurch ist es möglich, durch eine ruckartige Rückwärtsbewegung der Pipette den Patch aus der Zelle herauszureißen, ohne dass das Seal bricht. Die cytosolische Seite der Membran ist nun der Badlösung ausgesetzt (Inside-Out). Sowohl das cytosolische (Bad) als auch das luminale (Pipette) Medium können vom Experimentator vorgegeben werden, ebenso wie die über der Membran anliegende Spannung.
- Whole-Cell: In der cell-attached-Konfiguration wird das unter der Pipette liegende Membranstück durch Anlegen eines größeren Unterdruckes oder eines kurzen Spannungspulses durchbrochen. Die Pipette erhält Zugang zum Zellinneren, und es wird nunmehr der durch die gesamte Zellmembran fließende Strom gemessen. Die Pipettenlösung mischt sich mit dem Medium im Inneren der Zelle, so können z.B. Gifte appliziert werden.
- Outside-Out: Von der Whole-cell-Konfiguration ausgehend wird die Pipette zurückgezogen, und mit etwas Glück schließen sich die an der Spitze anhängenden Membranreste wieder.



Forschungsmethode





PROTOKOLL ZUR MESSUNG DES RUHEPOTENZIALS

Das Membranpotenzial einer Nervenzelle lässt sich mit zwei flüssigkeitsgefüllten Mikroelektroden messen. Meistens sind die Mikroelektroden mit KCl-Lösung gefüllt, die den Strom besonders gut leitet. Eine der beiden Elektroden ist die Messelektrode, die andere Elektrode dient als Bezugslektrode. Die Elektroden sind an einen Verstärker angeschlossen, der wiederum mit einem Oszilloskop verbunden ist, das den zeitlichen Verlauf der Spannung in mV anzeigt.

Hält man beide Elektroden in das Außenmedium, kann man keine Spannung feststellen. Das ist ja auch logisch, denn eine Spannung ist nichts anderes als eine Ladungsdifferenz. Da überall im Außenmedium die gleichen Ionen-Konzentrationen herrschen, kann es natürlich keine Ladungsdifferenz im Außenmedium geben.

Sticht man aber nun die Messelektrode mithilfe eines Mikromanipulators in die Nervenzelle hinein, so kann man bei den meisten tierischen Zellen plötzlich eine Spannung im Bereich zwischen -50 und -100 mV messen. Das Innere der Tierzelle ist dabei negativ gegenüber dem Außenmedium geladen, wie das folgende Bild zeigt: Wie hoch das gemessene Membranpotenzial (die Membranspannung) ist, hängt von der Art der Zelle und von den Ionen-Konzentrationen im Außenmedium ab, aber meistens liegt das Membranpotenzial einer Tierzelle zwischen -50 und -100 mV.

Das Membranpotenzial, das man im Ruhezustand einer Nervenzelle messen kann (wenn sie nicht erregt ist), wird auch als Ruhepotenzial bezeichnet. Das Ruhepotenzial einer Nervenzelle liegt meistens bei -70 mV.

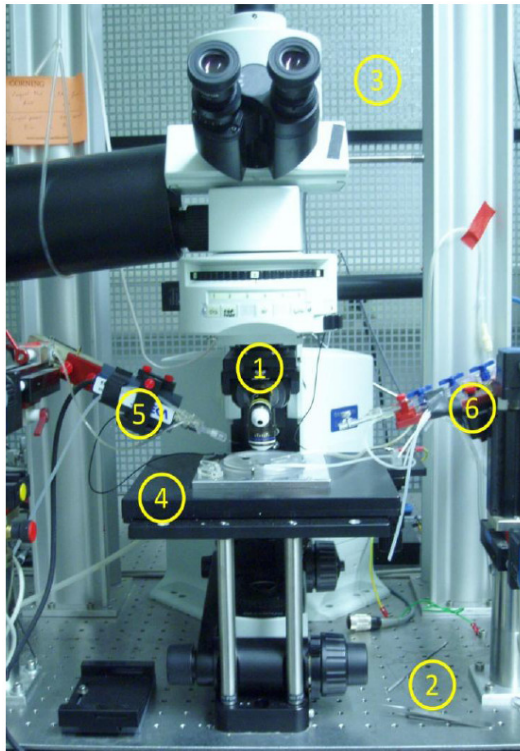
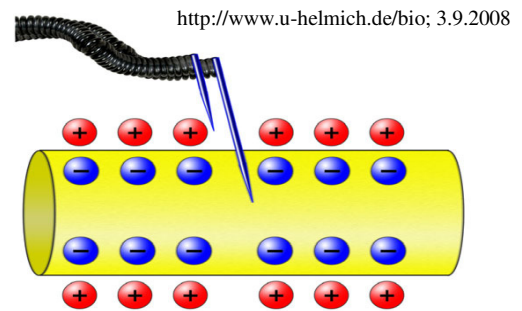
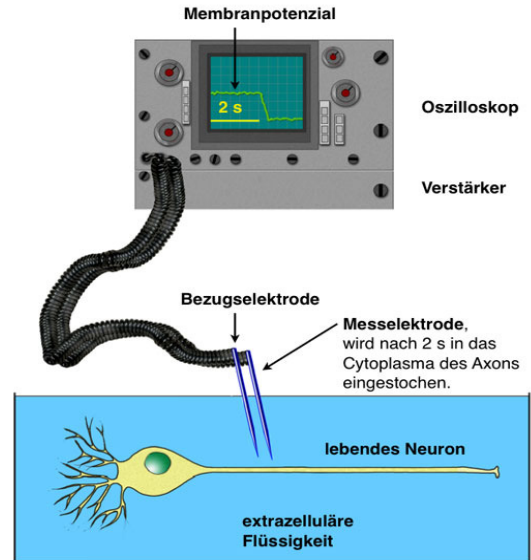


Abbildung: Messplatz mit dem Invertoskop (1), dem schwingungsgedämpften Tisch (2), dem Faraday-Käfig (3), sowie dem Objektisch (4) mit darauf befindlicher Messkammer und Lösungszuleitungen. In die Messkammer ragt der Messkopf mit Elektrodenhalter (5) (hier noch ohne Patch-Pipette). Desweiteren erkennt man die Ventilbank (6) für den Lösungswechsel.

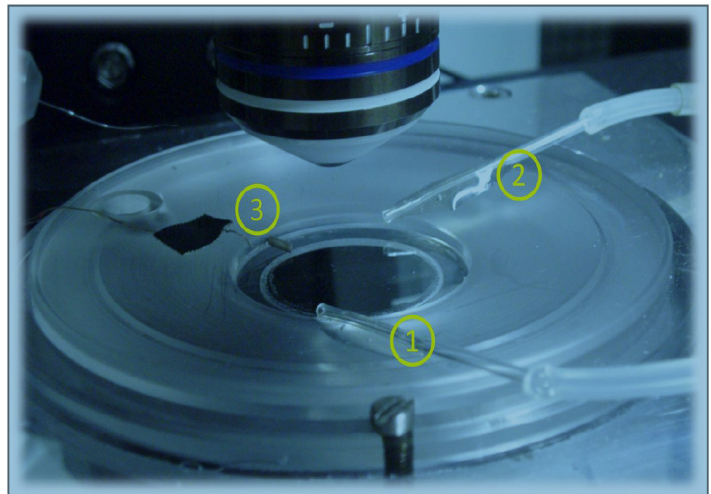
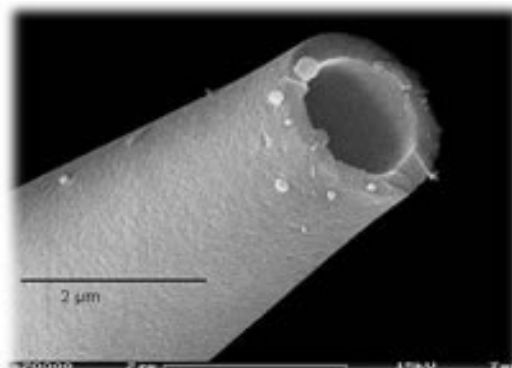


Abbildung: Darstellung der Messkammer. Lösungszufuhr (1), Absaugung (2) und Badelektrode (3) sind angezeigt. Die Zellen, welche auf einem Deckglas kultiviert wurden, werden für die Experimente samt Deckglas in die Messkammer gegeben. Quelle: <http://www.dai.physik.uni-goettingen.de/Praktika/Biophysik/Versuche/2007u/Patch-Clamp.pdf>; 3.9.08



Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Patch-Pipette

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/3/31/Patch_Pipette.jpg; 3.9.08



VERSUCHE ZUR ENTSTEHUNG DES RUHEPOTENZIALS

1. Aufgabe 1 - Vorversuch zur Entstehung des Ruhepotenzials

<p>Hier sehen wir ein Gefäß, gefüllt mit destilliertem Wasser. Das Gefäß wird durch ein Blatt Filtrierpapier in zwei Hälften geteilt. In die linke Hälfte des Gefäßes geben wir nun ein paar Tropfen eines Gemischs aus Neutralrot und Methylblau, zwei organischen Farbstoffen. Von den vielen Millionen Farbstoffmolekülen sind jeweils 10 Moleküle - sozusagen als repräsentativer Querschnitt - eingezeichnet. Was wird wohl mit der Zeit passieren?</p>	
<p>Schon nach kurzer Zeit...</p> <p>(Beschreiben Sie die Abläufe und leiten Sie aus den Abläufen Aussagen zum chemischen und elektrischen Potenzial ab.)</p>	
<p>Nach einiger Zeit...</p> <p>(Beschreiben Sie die Abläufe und leiten Sie aus den Abläufen Aussagen zum chemischen und elektrischen Potenzial ab.)</p>	

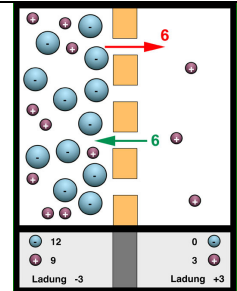
2. Aufgabe 2 - Ein Modellversuch zur Entstehung des Ruhepotenzials

<p>Links befindet sich ein Salz, dessen Anionen so groß sind, dass sie nicht durch die Membran passen. Die Kationen dagegen sind so klein, dass sie die Poren der Membran passieren können. Die Membran ist also semipermeabel, die lässt nur bestimmte Teilchen passieren, andere aber nicht. Rechts befindet sich wie im Vorversuch destilliertes Wasser.</p> <p>In dem unteren Teil der Abbildung werden nicht nur die Konzentrationen der Ionen berücksichtigt, sondern auch die Anzahl der elektrischen Ladungen auf den beiden Seiten. Zu Beginn des Versuchs befinden sich 12 Anionen und 12 Kationen auf der linken Seite (stellvertretend für viele Millionen Teilchen). Links heben sich die positiven und negativen Ladungen auf, so dass eine Gesamtladung von 0 resultiert. Rechts sind keine Ionen vorhanden, also ist die Gesamtladung auch hier Null. Die Ladungsdifferenz (links-rechts) ist also Null. Die dicke rote Pfeil in der Abbildung symbolisiert das Konzentrationsgefälle der Kationen oder das so genannte chemische Potenzial der Kationen.</p>	
<p>Nach einer gewissen Zeit sind zwei Kationen auf die rechte Seite diffundiert - getrieben durch das hohe chemische Potenzial (chem. Potenzial = Triebkraft zu chemischen Veränderungen). Durch diese Diffusion wurden zwei Dinge bewirkt: Erstens ist das chemische Potenzial der Kationen geringer geworden, was man an dem nun kleineren roten Pfeil sieht. Der Konzentrationsunterschied ist von 12 Einheiten auf 8 Einheiten gesunken. Zweitens sind elektrische Ladungen auf der rechten und auf der linken Seite entstanden, so dass jetzt eine Ladungsdifferenz oder ein elektrisches Potenzial vorliegt (elektr. Potenzial = Triebkraft der Teilchenbewegung, die auf elektrostatischen Anziehungen zwischen + und - beruht). Der grüne Pfeil symbolisiert dieses elektrische Potenzial, das zur Zeit den Wert 4 hat. Achten Sie darauf, dass das elektrische Potenzial dem chemischen Potenzial der Kationen genau entgegengerichtet ist.</p>	



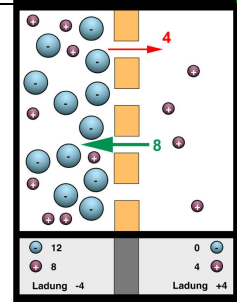
Nach weiterer Zeit...

(Beschreiben Sie die Abläufe und leiten Sie aus den Abläufen Aussagen zum chemischen und elektrischen Potenzial ab.)



Abschließend...

(Beschreiben Sie die Abläufe und leiten Sie aus den Abläufen Aussagen zum chemischen und elektrischen Potenzial ab.)



3. Ein echter Modellversuch

Wichtige Hinweise

Zur Vereinfachung missachten wir an dieser Stelle die Säure-Base-Chemie des Wassers und wir tun einfach so, als gäbe es keine Oxoniumionen/ H₃O⁺. Wichtig sollen bei der Betrachtung nur die zwei folgenden Ionensorten sein: Die recht großen Chlorid-Ionen Cl⁻ und die kleineren Protonen (Wasserstoff-Ionen) H⁺. Die Beweglichkeit der Protonen ist wesentlich größer als die der Chlorid-Ionen.

Teilversuch A

In die linke Kammer wird verdünnte Salzsäure gefüllt, in die rechte Kammer destilliertes Wasser. Zwischen die beiden Kammern wird ein Blatt Filtrierpapier eingeklemmt, dann werden die Kammern zusammenschraubt.

In jede Kammer wird eine Elektrode eingeführt, die Spannung auf Null gestellt und dann wird für einen Zeitraum von 10 Minuten die Spannung zwischen den beiden Elektroden gemessen.

Aufgabe 3A zu Teilversuch 3A

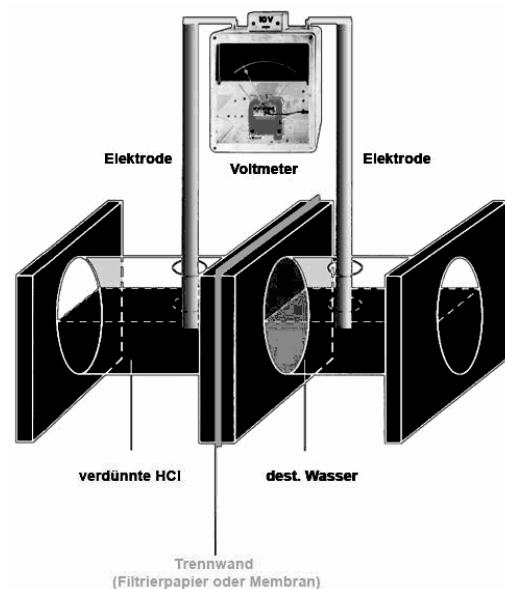
Skizzieren und begründen Sie einen Graphen, der den Spannungsverlauf der rechten Kammer wiedergibt! (x-Achse: Zeit; y-Achse: Spannung in mV; eine Skalierung der Achsen ist nicht notwendig, es geht nur um den Kurvenverlauf)

Teilversuch B

Durchführung genau wie Teilversuch A, allerdings wird das Filtrierpapier durch eine Membran ersetzt, die nur kleine Kationen durchlässt.

Aufgabe 3B zu Teilversuch 3B

Skizzieren und begründen Sie einen Graphen, der den Spannungsverlauf der rechten Kammer wiedergibt! (x-Achse: Zeit; y-Achse: Spannung in mV; eine Skalierung der Achsen ist nicht notwendig, es geht nur um den Kurvenverlauf)



4. Aufgabe 4: Vergleich des Modellversuchs (3.) mit den Prozessen in der echten Nervenzelle

Stellen Sie bezüglich der Entstehung eines Ruhepotenzials Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Modellversuch (3.) und den wirklichen Prozessen in der echten Nervenzelle tabellarisch dar! Bedenken Sie, dass bei Säugetieren werden fast 20% des ATPs dazu verwendet, die Na⁺/K⁺-Pumpen der Zellmembranen zu betreiben.