

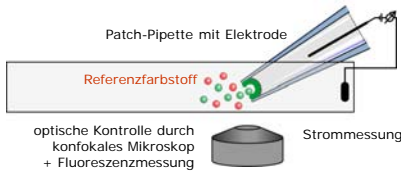
Konzentrationsabhängige Patch - Clamp - Messungen unter Berücksichtigung von Diffusionsprozessen

E. Schulz², R. Schmauder¹, T. Eick¹, S. Hummert¹, K. Benndorf¹

¹ Institut für Physiologie II, Jena Universitätsklinikum; ² Fakultät Elektrotechnik, Hochschule Schmalkalden

Thematik: Ionenkanäle sind in Organismen verantwortlich für Transportvorgänge sowie für die Reizentstehung und die Reizweiterleitung. Sie sind steuerbar und selektiv. Ihr statistisches Verhalten wird durch Markov-Modelle beschrieben, die an experimentelle Daten angepasst werden.

Etabliert: Messungen von Strom und Fluoreszenz zur Bestimmung von Offenwahrscheinlichkeit und Bindungsgrad sowohl im Gleichgewicht als auch bei sprunghaften Änderungen von Ligandenkonzentration (0→c→0) oder Spannung. Globale Fits über möglichst viele Datensätze.



Idee: schnelles Schalten zwischen vielen Konzentrationsstufen mit dem Ziel einer besseren Stringenz des Fits, genauerer Parameter und deutlicherer Unterscheidbarkeit ähnlicher Modelle.

Problem: Die Ionenkanäle im Inneren der Patch-Pipette „spüren“ die Konzentrationsänderungen infolge von Diffusionsprozessen zeitverzögert und allmählich. Quantitative Beschreibung durch Diffusionsprozesse notwendig!

Annahmen für analytische Lösung:

- Zylinderförmige Pipette (Reduktion auf Eindimensionalität)
- Pipettenöffnung und Zellmembran begrenzen den Zylinder
- Methode der Spiegelsymmetrie mit Membran in der Mitte

Ergebnisse der analytischen Lösung:

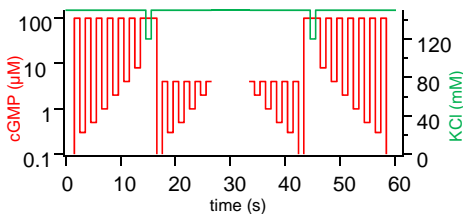
- Charakteristischer Zeitverlauf nur abhängig von D/L²
- Näherung monoexponentiell mit Verzögerung t₀
- Praktisch: größere und variable Sigmoidität / Verzögerung

Erweiterung, nur numerisch möglich (Matlab):

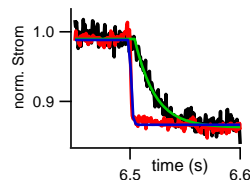
1. gewölbte Membran liefert die notwendige Verzögerung nicht
2. Konische Pipettenform: noch zu untersuchen
3. Linearer Konzentrationsübergang an Pipettenöffnung kann auftretende Verzögerungen t_v größer t₀ gut erklären.

Ergebnis → es ist wie folgt vorzugehen:

1. Auswertung KCl-Sprünge liefert mit bekannten D(Cl) den effektiven Membranabstand L sowie Zeiten τ, t₀ und t_v
2. Daraus und mit D(cGMP) lässt sich der Konzentrationsverlauf für den Liganden cGMP an der Membran bestimmen.
3. Fitberechnung

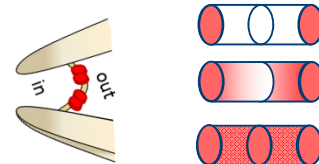
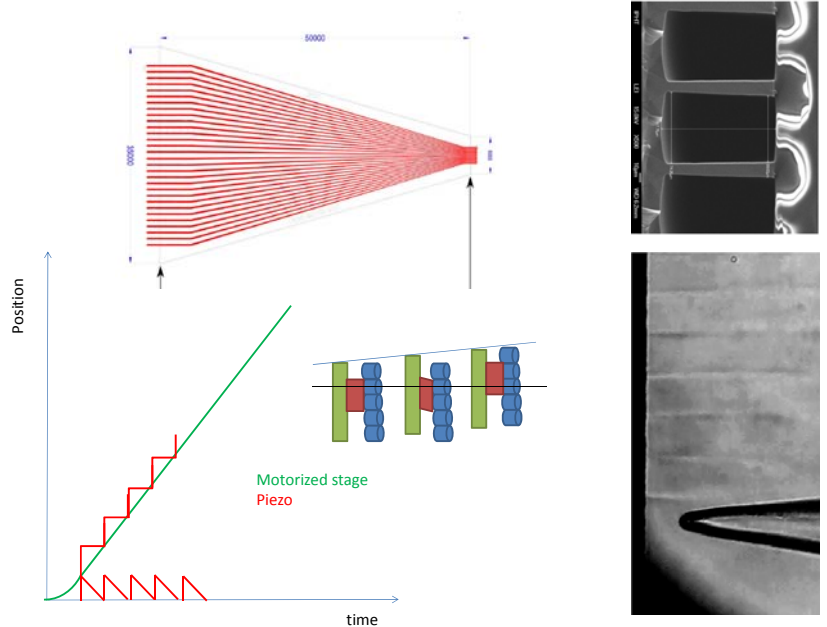


Konzentrationsprotokoll für cGMP und KCl



Bestimmung τ, t₀, t_v und effektives L aus KCl-Pulsen durch monoexponentiellen Fit

Technische Realisierung des schnellen Lösungswechsels



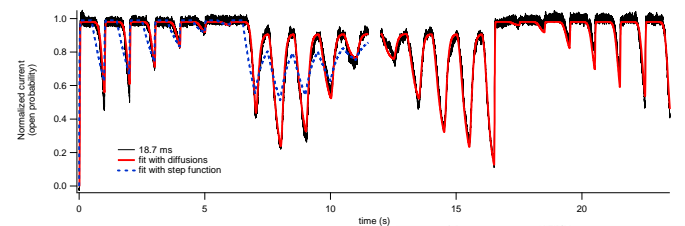
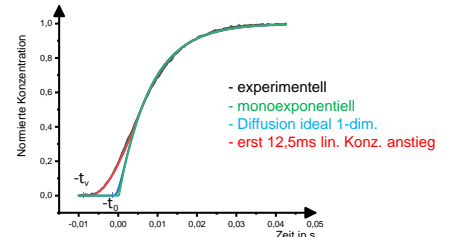
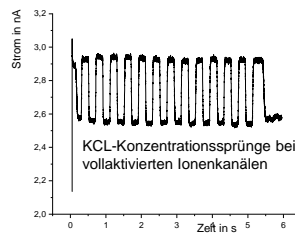
D = Diffusionskonstante
L = Abstand Öffnung-Membran
c₁ = Anfangskonzentration
c₂ = Endkonzentration
t₀ = Zeitverzögerung monoexponentiell

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

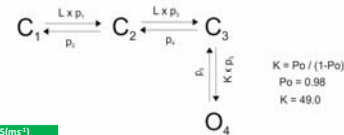
$$c(L, t) = c_2 + (c_1 - c_2) \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n-1)} \exp\left(-D(2n-1)^2 \frac{\pi^2}{4L^2} t\right)$$

$$c(L, t) \approx c_2 + (c_1 - c_2) \exp\left(-\frac{1}{\tau} \cdot (t - t_0)\right)$$

$$\tau = \frac{4L^2}{D\pi^2} \quad t_0 = \tau \ln\left(\frac{4}{\pi}\right) \approx 0,24 \tau$$



Gemessener Stromverlauf und Fitergebnisse bei rechteckigem und diffusionskorrigiertem (τ=18,7ms) cGMP-Konzentrationsverlauf



	p1 (ms ⁻¹ M ⁻¹)	p2 (ms ⁻¹)	p3 (ms ⁻¹ M ⁻¹)	p4 (ms ⁻¹)	p5 (ms ⁻¹)
1.1 ms	4210 +/- 10	0.35 +/- 0.03	55 +/- 4	0.309 +/- 0.001	61 / 2 * 10 ⁶
18.1 ms Step	795 +/- 7	0.70 +/- 0.03	58 +/- 1	0.116 +/- 0.001	20 / 1 * 10 ⁶
18.1 ms Diff.	4040 +/- 21	0.44 +/- 0.008	47 +/- 3	0.287 +/- 0.002	17 / 1 * 10 ⁶

Für den Fit verwendetes Markovmodell

$$K = P_0 / (1 - P_0)$$

$$P_0 = 0.98$$

$$K = 49.0$$