

Einleitung:

Der Versuchstag befasst sich mit der Simulation von Aktionspotentialen mittels des Hodgkin-Huxley-Modells.

Viele Einzelheiten über die elektrische Aktivität von Nerven resultierten aus Experimenten in den frühen 50ern. So fanden zum Beispiel Cole und Curtis heraus, dass sich die Membranleitfähigkeit im Laufe des Aktionspotentials verändert: sie nimmt stark zu um den Faktor 40. Hodgkin und Huxley führten 1952 Experimente an einem Riesenaxon des Tintenfisches durch und fanden heraus (auch durch Cole und Curtis' Erkenntnisse), dass das Membranpotential nicht nur bis auf 0 mV zurückgeht, sondern ins Positive ansteigt. Desweiteren stellten sie fest, dass das Aktionspotential nicht von einer allgemeinen Leitfähigkeit der Membran, sondern selektiv von Natriumionen getragen wird! Hodgkin und Huxleys Analysen sind eine vernünftige Einführung in das makroskopische Verhalten von Membranleitfähigkeiten der Nerven.

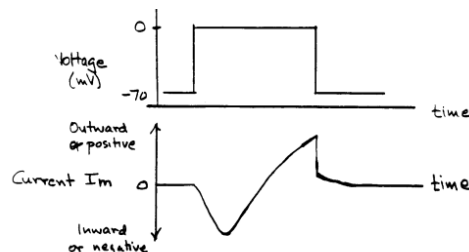
Nehmen wir an, dass Spannung der ausschlaggebende Faktor ist, dann braucht man eine Methode, die es erlaubt, die Membranspannung zu beeinflussen bzw. zu kontrollieren und festzulegen, so dass es möglich ist, die spannungsabhängigen Membraneigenschaften zu untersuchen. Die Voltage-Clamp Methode ist hierfür sehr geeignet. Das ist eine Methode, um die wechselseitige Kopplung von Änderungen des Membranpotentials sowie von Natrium- und Kaliumströmen zu trennen. Sie erlaubt eine experimentielle Festlegung (clamp) des Membranpotentials, so dass das Membranpotential nicht mehr durch Ionenflüsse beeinflussbar ist. Man konnte zum ersten Mal die Membranleitfähigkeiten für die verschiedenen in Zellen ein- und ausströmende Ionen genau bestimmen. Wenn das Membranpotential auf Werten oberhalb des Membranruhepotentials (Membranpotential ruhender Zellen mit charakt. Größe bei einzelnen Zelltypen; normalerweise zwischen -55 und -100 mV, bei glatten Muskelzellen bei -30 mV) festgehalten wird (Klemmspannung, clamp potential), dann fließt ein Strom über die Membran, welcher aus dem Einstrom positiver Ladung zusammengesetzt ist, gefolgt von einem Ausstrom, der lang andauernd ist, besteht.

Beispiel:

Nehmen wir an, die Membranspannung wird schrittweise von -70 mV auf 0 mV erhöht:

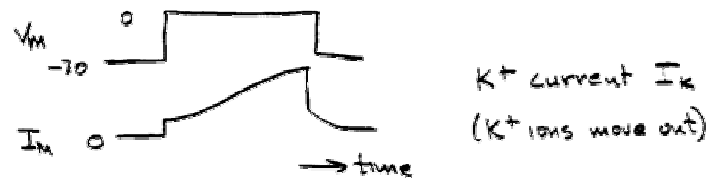
Die Bezeichnung inward oder negative für Strömung stehen für Einstrom (negativ) und die Bezeichnung outward und positive für Strömung stehen für Ausstrom (positiv).

Ein Einströmen von positiven Ionen in die Zelle ist definiert als Negativ- oder Einstrom, hingegen löst ein Ausströmen von positiven Ionen einen positiven oder Ausstrom aus. Auf elektrischer Basis gesehen, kann ein Einströmen von Anionen nicht von einem Ausströmen von Kationen unterschieden werden. So induzieren ausströmende Anionen einen positiven Strom (Auswärtsstrom).



Der gemessene Strom ist durch die Bewegung von Ionen induziert, jedoch sagt er nichts darüber aus, was für Ionen sich bewegt haben. Ein Ausstrom könnte durch ausströmendes Kalium oder Natrium erfolgen oder auch durch den Einstrom von Chlorid in die Zelle. Um zu bestimmen welche Ionen nun dafür verantwortlich sind, kann man entweder die Konzentrationen der Ionen im Extrazellulärraum verändern oder Chemikalien anwenden, die das Diffundieren von bestimmten Ionen verhindern. Diese Chemikalien sind Gifte wie das TTX (Tetrodotoxin), welches im Kugelfisch vorkommt (v.a. in Haut,

Leber, Eierstöcke) und spezifisch die Natriumkanäle blockiert, sowie das TEA (Tetraethylammonium) und das 4AP (4-Aminopyridin), welche die spannungsabhängigen Kaliumkanäle blockieren. Würde man das extrazellulär befindliche Natrium entfernen und dieselbe Depolarisation wie schon in der Abbildung oben auslösen, so würde eine man einen anderen Strom erhalten, nämlich nur einen Kaliumstrom. Man erhielte kein Aktionspotential. Daraus ließe sich schließen, dass Natrium für die Entstehung eines Aktionspotentials wichtig sei.



Würde man jetzt wieder Natrium zur Außenlösung dazutun und dafür die spannungsabhängigen Kaliumkanäle mit einem der beiden genannten Gifte blockieren, so würde der gemessene Strom ein Natriumstrom sein und das Aktionspotential würde sehr lange dauern (sekundenlang). Das bedeutete, dass Kalium für die „spätere Phase“ bei einem Aktionspotential eine Rolle spielte.



Mit solchen Experimenten stellten Hodgkin und Huxley fest, dass die Depolarisierung einer Nervenmembran über einen bestimmten Schwellenwert einen negativen Strom durch einströmendes Natrium gefolgt von einem langsamen und lange andauernden entgegengesetzten Strom (positiver Strom) durch den Ausstrom von Kalium auslöst.

Der Influx vom positiven Natrium depolarisiert die Membran. Dieser Influx ist nur von kurzer Dauer. Darauf folgt ein Efflux von Kalium, welcher die Repolarisierung auslöst. Dabei ist nicht wirklich wichtig, dass die Kaliumleitfähigkeit abnimmt, wenn die Membran depolarisiert wird, da die Kaliumleitfähigkeit bereits schon sehr hoch ist (Membran mit Ruhepotential hat eine hohe Kaliumleitfähigkeit). Eine Membran für die die Kaliumleitfähigkeit konstant den Wert des Ruhepotentials hätte, würde repolarisieren, sobald die (kurz andauernde) Abnahme der Natriumleitfähigkeit der Membran aufgehört hat.

Die Abnahme der Kaliumleitfähigkeit während der Depolarisation beschleunigt die Repolarisation

Quantitative Bestimmung der Änderung der Leitfähigkeiten:

Hodgkin und Huxley wussten nicht, dass es ionenspezifische Kanäle in der Membran gibt, sie sprachen über Poren. Sie wollten die Zustände der Poren (offen/geschlossen) messen, indem sie ihre Leitfähigkeit messen.

Sie wendeten das Ohm'sche Gesetz $U = I \cdot R$ auf die Ionenleitfähigkeit an:

$$I = g V$$

Der Natriumstrom, den sie als I_{Na} definierten, hängt ab von der Natriumleitfähigkeit der Membran ab, g_{Na} , und von der Differenz zwischen dem existierenden Membranpotential V_m und dem Membranpotential, wo es keine elektromotorische Kraft (EMK) für Natrium gibt. Das Membranpotential, an dem es keine EMK für Natrium gibt, ist das Nernst Gleichgewichtspotential E_{Na} . Folglich :

$$I_{Na} = g_{Na} (V_m - E_{Na})$$

Eine ähnliche Gleichung wurde für Kalium aufgestellt:

$$I_K = g_K (V_m - E_K)$$

Hodgkin und Huxley beobachteten, dass V_m konstant ist, wenn die Spannung von einer Voltage-Clamp Apparatur kontrolliert wird und sich E_{Na} und E_K nicht ändern. Die Tatsache, dass die Ströme eine Funktion der Zeit sind, wies darauf hin, dass auch die Leitfähigkeiten von Natrium und Kalium sowie die Spannung Funktionen der Zeit waren. Um das zu beweisen, depolarisierten Hodgkin und Huxley Axone mit verschiedenen Potentialen und messten die Natrium- und Kaliumströme als Funktionen der Zeit. Sie teilten jeden Natriumstrom durch den Term $(V_m - E_{Na})$ und jeden Kaliumstrom durch den Term $(V_m - E_K)$. Die Werte ergaben die jeweilige Leitfähigkeit als eine Funktion der Zeit für jede Spannung:

Die Depolarisation erzeugt eine rapide Abnahme von g_{Na} und eine langsamere länger anhaltende Abnahme von g_K . Sofort nach der dem ersten Schritt der Depolarisierung ist $g_{Na} \gg g_K$, aber nachdem die Membran längere Zeit depolarisiert ist, ist $g_K \gg g_{Na}$. Sowohl g_K als auch g_{Na} sind Funktionen der Zeit und der Spannung:

$$g_{Na} = f(V, t)$$

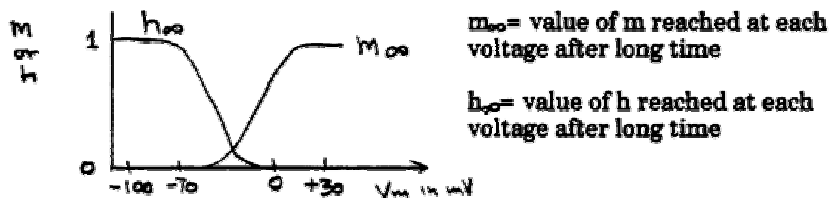
$$g_K = f'(V, t)$$

Hodgkin und Huxley führten die Variablen m , h und n ein, um die Abhängigkeit der Leitfähigkeiten von der Spannung und der Zeit zu erklären. Sie definierten für Natrium zwei willkürliche Variablen m und h . Jede davon ist eine Funktion der Spannung und der Zeit. Sie verwendeten die Gleichung:

$$g_{Na} = m^3 * h * G_{Na}$$

Hierbei ist G_{Na} die maximale Natriumleitfähigkeit der Axonmembran. Natrium durchquert die Membran durch Kanalproteine in der Membran. Diese können öffnen oder schließen. G_{Na} ist die Leitfähigkeit für Natrium welche angenommen wird, wenn alle Natriumkanäle offen sind. Die Variablen m und h können die Werte 0 oder 1 annehmen. Das Produkt $m^3 * h$ steht für totale Natriumleitfähigkeit zu jedem beliebigen vorgegebenen Zeitpunkt.

Die folgende Graphik veranschaulicht die Werte, die m und h erreichen, wenn die Membran längere Zeit auf einem bestimmten Potential gehalten wird:



Dann beschrieben sie die Zeitabhängigkeit von m und h . Wenn die Membran lange Zeit auf einer Spannung gehalten wird, dann tritt die Spannung schnell zu einer neuen Spannung über, m und h wechseln zu einem neuen stabilen Zustand (steady state). Die Werte des steady state sind in der obigen Abbildung gegeben.

Wichtig ist, dass sich der Zustand von m schneller ändert als der von h .

Der spannungsabhängige Natriumkanal besitzt 3 Zustände: zwei, in dem er geschlossen ist und einen, in dem er offen ist. Der Zustand, in dem der Kanal geschlossen aber aktivierbar ist, wird Ruhezustand genannt. Von diesem Zustand kann der Kanal durch Depolarisation in den offenen Zustand übergehen. Aber nach einer gewissen Zeit geht der Kanal daraufhin in den zweiten geschlossenen Zustand über. Aus diesem Zustand der Inaktivierung kann der Natriumkanal auch durch weitere Depolarisation nicht mehr in den offenen Zustand übergeführt werden. Erst wenn es eine Hyperpolarisation der Membran gibt, geht der Kanal wieder in den aktivierbaren Ruhezustand über. Man nimmt vier Tore pro Kanal an: 3 m -Tore und 1 h -Tor. Die m -Tore öffnen sich schnell bei einer Depolarisation über einen bestimmten Schwellenwert und die h -Tore verhalten sich genau umgekehrt: sie schließen langsam bei einer Depolarisation, bzw. nimmt die Offenwahrscheinlichkeit für m -Tore mit zunehmender Depolarisation zu und die Wahrscheinlichkeit, dass h -Tore geschlossen sind nimmt dabei auch zu. Bei einer Hyperpolarisation nimmt die Wahrscheinlichkeit, dass das h -Tor sich öffnet zu.

Da aber nur ein Strom fließen kann, wenn alle Tore gleichzeitig geöffnet sind, würde das aber bedeuten, dass der Natriumkanal bei jedem Membranpotential geschlossen sein müsste, da entweder

die m-Tore oder die h-Tore geschlossen sind. Trotzdem sind Natriumströme meßbar. Das liegt an den unterschiedlichen Geschwindigkeiten, mit denen die m- und h-Tore öffnen bzw. schließen (Zeitkonstanten τ_h und τ_m der Tore). Wie oben schon erwähnt, ändert sich der Zustand von m schneller als der von h, das bedeutet, dass sich die m-Tore schneller öffnen bei einer Depolarisation, als die h-Tore sich schließen können.

Das Produkt $m^3 * h$ ist also die Wahrscheinlichkeit, dass alle Tore geöffnet sind, so dass Natrium durch die Membran transportiert werden kann.

Die Kaliumkanäle sind etwas anders aufgebaut. Sie öffnen sich bei Depolarisation und schließen bei Hyperpolarisation der Membran. Sie werden spannungsabhängige Kaliumkanäle genannt, da die Öffnung durch das Membranpotential gesteuert ist. Der Kanal besteht aus 4 n-Toren, die bestimmen, ob der Kaliumkanal offen oder geschlossen ist. Wenn alle 4 Tore geöffnet sind, so ist der Kanal durchlässig (natürlich nur für Kalium). Jedes dieser Tore öffnet und schließt mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, deren Höhe sich mit der Membranspannung ändert. Bei einer Depolarisation nimmt die Öffnungswahrscheinlichkeit für ein Tor zu und die Wahrscheinlichkeit für das Schließen nimmt ab. Genau umgekehrt verhält es sich bei einer Hyperpolarisation. Der Kaliumkanal ist nur dann leitfähig, wenn alle seine Tore geöffnet sind. Das ist der Grund, warum die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kanal offen ist, über das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten der Tore berechnet wird. Der Kaliumkanal ist mit der Wahrscheinlichkeit n^4 geöffnet. Für die Kaliumleitfähigkeit gilt:

$g_K = m^3 * h * G_K$, wobei G_K für die maximale Kaliumleitfähigkeit der Axonmembran steht.

Das Aktionspotential kann modelliert werden, indem die Funktionen für m und h abhängig von Zeit und Membranspannung für sehr kleine Zeitschritte berechnet werden. Daraus kann man die Leitfähigkeiten für alle Arten von Ionen und somit die Ströme zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmen. Diese führen zu einer Veränderung der Ladungsverteilung und damit zu einer Änderung der Membranspannung. Einen Zeitschritt später wird die Membranspannung zur Bestimmung von m und h wieder eingesetzt. Wenn das Modell so von einem Computer berechnet wird, erhält man sehr gute Annäherungen an das Strom- und Spannungsverhalten einer realen Zelle.

Voltage-Clamp Versuche werden genauso simuliert, nur dass dabei die Membranspannung (Klemm-, Haltespannung) vorgegeben ist. Die Parameter m und h werden anhand der vorgegebenen Membranspannung berechnet. Voltage-Clamp Experimente erlauben es in der Simulation, einen realistischen Eindruck von der Rolle der Aktivierungs- und Inaktivierungszeitkonstanten zu erhalten, wenn die Membranspannung lange Zeit konstant gehalten (Haltespannung) und dann nur sprunghaft geändert wird (Klemmspannung). Nach dem Spannungssprung kann man beobachten, wie h und m sich langsam auf neue Werte einstellen.

Ziel des Versuchstages ist, sich anhand der Modellparameter, die man durch Simulation von Versuchen analog zu denen, die Hodgkin und Huxley zur Theorie dienten, ein Bild über das Zusammenspiel der verschiedenen Ionenströme einerseits und von Aktivierung und Inaktivierung andererseits zu machen. Durch die Versuche soll ein Verständnis der ionalen Geschehnisse während eines Aktionspotentials vermittelt werden.

Material und Methoden:

- Computer und darauf installiertes und lauffähiges
- Neurosim2 (Programm)

Dieses Programm ist in der Lage, eine elektrisch aktive Zellmembran sowohl unter normalen als auch unter Voltage-Clamp Bedingungen zu simulieren. Darüber hinaus gestattet es, einen Blick in das Innere eines Ionenkanals.

Simulation 1:

Durchführung:

- Computereinstellung:
 - laden von PARAM1
 - Experiment anwählen

Ergebnisse:

Siehe Graphik zu Simulation 1 im Anhang.

Diskussion:

Wie man in der Graphik sehen kann, steigt kurz nach dem Stimulus (nach 0.89 ms) die Kurve für die Natriumleitfähigkeit von 0mS/cm^2 sehr stark an und erreicht 0.5ms später ihr Maximum bei einem Wert von 32mS/cm^2 (S:= Siemens). Nach diesem Peak steigt die Kurve flacher (als der Anstieg) ab und erreicht 0mS/cm^2 zum Zeitpunkt 3.63ms. Die Kurve nimmt bis zum Ende dieser Messung keinen anderen Wert an. Der Stimulus selber beginnt am Zeitpunkt 0ms.

Die Kurve für die Kaliumleitfähigkeit hat den Wert 0mS/cm^2 bis sie nach 1.14ms ansteigt. Jedoch ist der Anstieg der Kurve nicht so stark wie bei der Kurve für die Natriumleitfähigkeit. Nach 2.74ms erreicht die Kaliumleitfähigkeits-Kurve ein Maximum bei 12mS/cm^2 . Dieser Peak ist fast 1/3 kleiner als für die Natriumleitfähigkeit. Nach diesem Peak fällt die Kurve für Kalium wieder langsam ab und erreicht den Wert 1mS/cm^2 bei 7.94 ms.

Wie man sehen kann steigt die Natriumleitfähigkeit sofort bei Depolarisation der Membran schnell an und nimmt nach dem maximalen Wert der Leitfähigkeit langsamer ab. Hingegen nimmt die Kaliumleitfähigkeit erst nach länger andauernder Depolarisation langsam zu und auch wieder langsam ab.

Während eines Aktionspotentials fließen Natrium-, Kalium-, Chlorid- und Calciumströme. Jedoch sind die beiden letzten aufgeführten Ströme nicht in der Graphik dargestellt.

