

Inhaltsverzeichnis

1 Die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik	1
1.1 Bioelektrizität	1
1.2 Die Ionentheorie	2
1.2.1 Die Spannungsklemme	3
1.2.2 Hodgkin und Huxley	3
1.3 Die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik	4
1.3.1 Die ersten Kanäle mit der Black-Film-Technik	4
1.3.2 Rauschanalyse	5
1.3.3 Die ersten Patch-Clamp-Experimente	5
1.3.4 Die Verbesserung der Methode: Gigaseals!	9
1.4 Die Weiterentwicklung der Technik	11
Literatur	13
2 Bioelektrische Phänomene und ihre Messung	15
2.1 Grundlagen	15
2.1.1 Membranpotential	15
2.1.2 Elektrische Eigenschaften von Zellen	18
2.1.2.1 Passive Eigenschaften von Zellen: Widerstand und Kapazität	18
2.1.2.2 Aktive Eigenschaften: Aktionspotentiale	19
2.2 Messmethoden (Übersicht)	20
2.2.1 Zelluläre und subzelluläre Messungen	21
2.2.2 Messungen von Summenpotentialen	25
Literatur	29
3 Technische Grundlagen der Patch-Clamp-Technik	31
3.1 Funktionsprinzip eines Patch-Clamp-Verstärkers	31
3.1.1 Voltage-Clamp	32
3.1.2 Current-Clamp	35
3.1.3 Diskontinuierliche Verstärker	37
3.2 Komplizierende Faktoren – und wie man damit umgeht	38
3.2.1 Kapazität	38
3.2.2 Serienwiderstand	40
3.2.2.1 Kompensation des Serienwiderstands	44

3.2.2.2	Regeln zur Abschätzung von Serien- und Membranwiderstand (R_s und R_m)	45
3.2.3	Offset-Potentiale	48
3.2.3.1	Elektrodenpotentiale	48
3.2.3.2	Übergangspotentiale	49
Literatur.		50
4	Messplatz und technische Geräte	51
4.1	Die Optik	52
4.1.1	Das inverse Mikroskop	54
4.1.2	Das aufrechte Mikroskop.	56
4.1.3	Einfache Binokulare oder Lupen.	58
4.1.4	Kameras.	59
4.2	Messtisch und mechanische Komponenten	59
4.2.1	Messtisch und Käfig	59
4.2.1.1	Der schwingungsgedämpfte Tisch.	60
4.2.1.2	Konfiguration des Messplatzes	61
4.2.1.3	Elektrische Abschirmung.	63
4.2.2	Mikromanipulator und Pipettenhalter	64
4.2.2.1	Mikromanipulator	64
4.2.2.2	Pipettenhalter.	66
4.2.3	Messkammern	68
4.2.3.1	Einfache Kammern	68
4.2.3.2	Temperierbare Kammern.	68
4.2.3.3	Kammern für Gewebeschnitte.	69
4.2.4	Kammerperfusion und Applikationsverfahren.	72
4.2.4.1	Langsame Perfusion.	72
4.2.4.2	Schnelle Perfusion.	75
4.3	Elektronische Komponenten	77
4.3.1	Vorverstärker und Verstärker	77
4.3.1.1	Auswahl eines Verstärkers.	79
4.3.2	Zwischenverstärker und Filter	80
4.3.3	Stimulationsgerät.	81
4.4	Gläser, Pipetten, Elektroden und Lösungen.	81
4.4.1	Die Patch-Pipette	82
4.4.1.1	Pipettengläser.	84
4.4.2	Herstellung der Pipetten	85
4.4.2.1	Das Pipettenziehgerät	85
4.4.2.2	Das Ziehen der Pipetten.	86
4.4.2.3	Polieren mit der Microforge	87
4.4.2.4	Beschichten der Pipetten	87
4.4.3	Füllen der Pipette.	88
4.4.4	Elektrodendrähte	89

4.4.4.1	Chlorieren eines Silberdrahtes	89
4.4.5	Intra- und extrazelluläre Lösungen	92
4.4.5.1	Zusätze	95
	Literatur	96
5	Die Praxis von Patch-Clamp-Experimenten	97
5.1	Herstellung einer Patch-Clamp-Ableitung	97
5.1.1	Schritt 1: Kompensation von Offset-Potentialen	98
5.1.2	Schritt 2: Abschätzung des Pipettenwiderstands	99
5.1.3	Schritt 3: Seal-Bildung	101
5.1.4	Schritt 4: Kapazitätskompensation	104
5.2	Die verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen	105
5.2.1	Die Cell-attached-Konfiguration	105
5.2.2	Die Inside-out-Konfiguration	108
5.2.3	Die Outside-out-Konfiguration	109
5.2.4	Die Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzellaufleitung)	111
5.2.4.1	Komplizierende Faktoren: Serienwiderstand und Kapazität	114
5.2.4.2	Spannungsklemme bei großen und verzweigten Zellen: Das Space-Clamp-Problem	117
5.2.4.3	Current-Clamp-Messungen	118
5.3	Brummen, Rauschen, Filterung und Digitalisierung	120
5.3.1	Störsignale	120
5.3.2	Filterung	121
5.3.3	Digitalisierung	123
	Literatur	125
6	Spezielle Anwendungen	127
6.1	Loose-Patch	127
6.2	Perforated-Patch	129
6.3	Intrazelluläre Substanzapplikation	132
6.4	Nucleated-Patch	135
6.5	Ableitung von subzellulären Strukturen	135
6.6	Kapazitätsmessungen	138
6.7	Dynamic-Clamp	141
6.8	In-vivo-Patch-Clamp	143
6.9	Mehrfachableitungen	146
6.10	Patch-Automaten	149
6.11	Histologie – Färbung nach der Messung	150
6.12	Single-cell RT-PCR und patch-seq	152
	Literatur	154
7	Daten und Datenverarbeitung	157
7.1	Dokumentation von Experimenten	157
7.1.1	Dokumentation des Patch-Clamp-Experiments	159
7.2	Was soll man wo speichern?	162

7.3	Offenheit und Transparenz.	164
	Literatur.	168
Stichwortverzeichnis.		169