

Ionenkanäle zur Signalübermittlung in biologischen Systemen

Von E. Neher und W. Stühmer, Göttingen*)

Die meisten der bekannten Mechanismen zur Signalübermittlung zwischen lebenden Zellen, zum Beispiel synaptische Übertragung, Nervenreizleitung und Sekretionssteuerung, bedienen sich sog. Ionenkanäle. Ionenkanäle sind integrale Membranproteine (s. u.), welche in ihrem Inneren hydrophile Bereiche aufweisen, durch die Ionenpermeation stattfinden kann. Der resultierende Ionenstrom wird durch externe Signale wie Membranspannung, Neurotransmitter oder Hormone geregelt. In neuerer Zeit ist es gelungen, die Strombeiträge einzelner solcher Ionenkanäle aufzulösen und ihr reizabhängiges An- und Abschalten zu verfolgen.

In diesem Beitrag wollen wir anhand einiger Beispiele zeigen, wie sich mittels dieser neuen Techniken Konformationsänderungen von Ionenkanälen auf der Ebene von Einzelmolekülreaktionen untersuchen lassen. Weiterhin liefert die Abhängigkeit der Schaltkinetik von intensiven thermodynamischen Parametern wie Potential, Temperatur und Druck detaillierte Informationen über die molekularen Vorgänge beim Öffnen und Schließen der Kanäle. Messungen dieser Art werden im zweiten Teil dieses Artikels näher beschrieben.

Intra- und interzelluläre Signale

Jeder lebende Organismus besteht aus Millionen bis Milliarden einzelner Zellen. Diese Zellen, durch Membranen streng voneinander abgegrenzte Einheiten, müssen Informationen austauschen, wenn der Organismus als Ganzes funktionieren soll. Höhere Organismen haben dazu ein Nervensystem entwickelt, welches sie in die Lage versetzt, auf äußere Reize innerhalb von Millisekunden zu reagieren. Auch niedere Tiere, ja sogar Pflanzen, besitzen

Signalmechanismen, die der Orientierung, der Bewegung oder der Steuerung des Stoffwechsels dienen. Die Forschung der letzten 10 bis 20 Jahre hat gezeigt, daß sich die Natur zur Signalübermittlung meist sogenannter Ionenkanäle bedient, vor allem dann, wenn schnelle Reaktionen auf äußere Reize erforderlich sind. Ionenkanäle vermitteln und steuern den Fluß kleiner, in der Körperflüssigkeit vorhandener Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{++} und Cl^- . Der Fluß durch die Ionenkanäle erfolgt immer passiv; er wird getrieben durch die normalerweise an der Zellmembran anliegenden chemischen und elektrischen Gradienten. Diese werden durch Stoffwechselprozesse und daran angekoppelte Ionenpumpen (z. B. Na-, K-Pumpen, ATP-asen) aufgebaut und im langzeitigen Mittel aufrechterhalten.

Über die Membran der meisten Zelltypen mißt man einen elektrischen Potentialabfall von ca. -60 mV. Sein Wert wird hauptsächlich durch das Gleichgewichtspotential für K^+ -Ionen bestimmt. Nervenzellen haben sich auf die intrazelluläre elektrische Signalübermittlung spezialisiert. Dazu benützen sie die zur Zeit wohl am besten untersuchten Ionenkanäle, nämlich die spannungsgesteuerten Na^+ - und K^+ -spezifischen Kanäle. Nach Hodgkin und Huxley [1] bewirken diese Kanäle den Nervenimpuls, der als positive Potentialauslenkung (sog. Aktionspotential) entlang der Nervenfasern (einem zylinderförmigen Fortsatz der Nervenzelle) fortgeleitet wird. Die „erregende“ Rolle spielen dabei die Na-Kanäle, welche durch ihr spannungsabhängiges An- und Abschalten einen regenerativen Prozeß ablaufen lassen: Ein leichter Anstieg der Membranspannung bewirkt das Anschalten weniger Na-Kanäle; dies führt zum Einströmen von Na^+ , entsprechend einem nach innen gerichteten Konzentrationsgradienten, was die Membranspannung weiter ansteigen läßt. Dieser Prozeß würde sehr schnell die gesamte Nervenmembran auf den Wert des Gleichge-

wichtspotentials für Na-Ionen (ca. $+50$ mV) umladen. Zwei weitere Mechanismen bewirken jedoch, daß der Prozeß nach einigen Millisekunden abbricht und sogar umkehrt: einerseits die sog. Na-Inaktivierung, ein selbständiges verzögertes Abschalten der Na-Kanäle, andererseits ein etwa gleichzeitiges und langsames Anschalten der zweiten Klasse von Ionenkanälen, der spannungsabhängigen K-Kanäle (siehe dazu Informationskasten über das Voltage-Clamp-Verfahren). So breitet sich der Nervenimpuls als eine phasische Depolarisation entlang einer Nervenfasern aus.

Die Signalübermittlung zwischen Zellen geschieht meist an chemischen Synapsen. Der Nervenimpuls setzt an der Nervenendigung eine chemische Substanz, den sog. Neurotransmitter, frei. Dieser diffundiert innerhalb von Bruchteilen einer Millisekunde zur nachgeschalteten Zelle, wo er Leitfähigkeitsänderungen der Zellmembran bewirkt. Sowohl die „präsynaptische“ Transmitterfreisetzung als auch die „postsynaptische“ Leitfähigkeitsänderung werden durch bestimmte Typen von Ionenkanälen vermittelt. Die postsynaptische Wirkung des Transmitters Acetylcholin soll hier näher erläutert werden, da an diesem System sehr viele der molekularen Mechanismen erstmals beobachtet und aufgeklärt wurden.

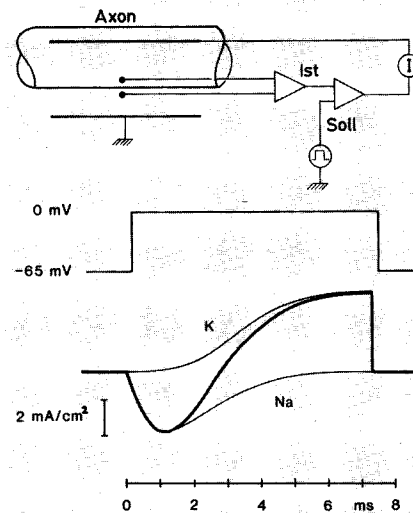
Acetylcholin (ACh) kommt als Neurotransmitter an verschiedenen Schaltstellen des Zentralnervensystems vor. Außerdem ist es die Wirksubstanz an der Schaltstelle zwischen Nerv und Muskel. Man kann die postsynaptische Wirkung simulieren, indem man ACh in geringsten Mengen auf einen Muskel (in der Nähe der neuromuskulären Synapse) aufträgt. Dann öffnen sich die sog. Acetylcholin Kanäle in der Muskelmembran, was zu einem elektrischen Signal in der Muskelzelle und letztendlich zur Kontraktion des Muskels führt. Da sich dieser Vorgang am Nerv-Muskel-Präparat am einfachsten studieren läßt, ist der Acetylcholin Kanal zum Proto-

* Dr. Erwin Neher und Dr. Walter Stühmer, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Membranbiophysik, Am Faßberg, D-3400 Göttingen.

Voltage Clamp – die klassische Spannungsklemme

Bei einem Nervenimpuls (Aktionspotential) ändert sich das Membranpotential im Zeitbereich von Millisekunden vom Ruhepotential (ca. -60 mV) auf das Gleichgewichtspotential für Na^+ (ca. $+50\text{ mV}$) und wieder zum Ruhepotential zurück. Um die Vorgänge bei diesem Phänomen besser in den Griff zu bekommen, wurde die Spannungsklemme entwickelt [9, 10]. Diese besteht im wesentlichen aus einem Rückkopplungsverstärker, der die Membran-Istspannung – gemessen als Differenz zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Potential – mit einer vorgegebenen Sollspannung vergleicht. Mittels einer zweiten intrazellulären Elektrode wird der nötige Strom in die Zelle geleitet, um den gewünschten Sollwert zu erhalten (oberes Teilbild). Hierdurch wird es möglich, das Membranpotential jederzeit unter Kontrolle zu halten und so das spannungsabhängige Verhalten der Ionenkanäle zu untersuchen.

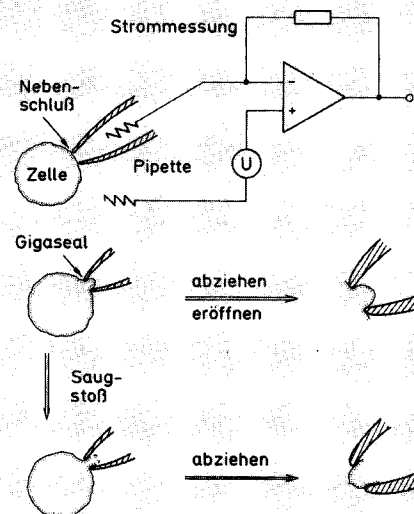
Als klassisches Präparat hat sich der Riesennerv des Tintenfisches bewährt. Wegen seines Durchmessers von ca. einem halben Millimeter ist es möglich, Elektroden in der Längsrichtung einzu-



führen. Der gemessene Strom setzt sich aus Ionenströmen und Strömen zum Umladen der Kapazitäten zusammen. Der Einfachheit halber sind im unteren Teilbild nur die Ionenströme wiedergegeben, die bei einer Depolarisation der Membran von -65 mV auf 0 mV fließen. Durch selektives Ausschalten einzelner Stromkomponenten kann man zeigen, daß der Gesamtstrom hauptsächlich von zwei Ionensorten getragen wird. Die im Bild nach unten gerichteten Ströme entstehen durch

nie perfekt ist. Trotzdem gelang es in besonders günstigen Fällen, Einzelkanalströme aufzulösen.

Hamill et al. [8] beschrieben ein einfaches Verfahren, mit dem dieser Kontakt um Größenordnungen verbessert werden kann. Durch einfaches Ansaugen des Membranareals und Verwendung frischer sauberer Glasoberflächen ließen sich Abdichtwiderstände (Widerstände zwischen Pipetteninnerem und äußerer Badflüssigkeit) im Bereich von Gigaohm erzielen („Gigaseal“). Dies eliminiert den Nebenschluß als dominierende Rauschquelle und erlaubt hochauflösende Messung des Stromes durch das in der Pipettenöffnung ein-



Die Methode der hochauflösenden Strommessung in biologischen Membranen ist unter dem Namen „Patch Clamp“ in die Literatur eingegangen, was soviel heißt wie „potentiostatische Messung an kleinen Membranarealen“. Das Meßproblem besteht darin, Ströme im Picoamperebereich mit einer zeitlichen Auflösung von Mikro- bis Millisekunden in einer biologischen Membran zu messen. In diesem Bereich liegen typischerweise die Strombeiträge einzelner Ionenkanäle. Eine Strommessung mit solcher Spezifikation ist an sich kein großes Problem. Die Schwierigkeit liegt am biologischen Objekt, praktisch immer einer in sich geschlossenen Membran. Auch ist zu bedenken, daß das Meßobjekt sehr „klein“ sein muß, um diese Spezifikation zu erreichen. Bereits die intrinsische Kapazität der Membran einer kugelförmigen Zelle von $15\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser führt zusammen mit unvermeidlichen Rauschquellen im Verstärker zu exzessivem Hintergrundrauschen. Neher und Sakmann [7] setzten daher mikroskopische Meßpipetten berührend auf Zelloberflächen auf, um kleinste Membranareale für die elektrische Messung zu isolieren (siehe Bild). Das gravierendste Problem bei dieser Strommessung war das eines Nebenschlusses, da der Kontakt zwischen Glaspipette und Zelloberfläche

in die Nervenfasern hineinfließende Na^+ -Ionen. Der Natriumstrom fällt nach einigen Millisekunden auf Null ab – er schaltet sich selbsttätig ab. Der Auswärtsstrom wird von K^+ -Ionen getragen; er besitzt eine langsamere Anschlagkinetik, erreicht nach einigen Millisekunden ein Maximum und bleibt dort stehen. Diese zwei Komponenten sind in der Abbildung mit Na und K gekennzeichnet.

Hodgkin und Huxley [1] beschrieben diese beiden Stromkomponenten in einem mathematischen Modell als Produkte von spannungs- und zeitabhängigen Leitfähigkeiten mit treibenden Kräften $V - V_i$, wobei V_i die Nernstschen Gleichgewichtspotentiale für die beteiligten Ionensorten sind. Durch Kombination dieser phänomenologischen Beschreibung der Ströme mit der Gleichung für ein elektrisch leitendes Kabel, dem die Nervenfasern ähnlich ist, gelang es ihnen, den Spannungsverlauf eines sich entlang der Nervenfasern fortpflanzenden Aktionspotentials zu rekonstruieren. Das Aktionspotential kann somit durch ionenselektive Kanäle modelliert werden, die spannungs- und zeitabhängig öffnen und schließen. Die Entwicklung der Patch-Clamp-Methode erlaubt es, Strombeiträge aufzulösen, die durch einzelne solcher Kanäle fließen.

geschlossene Membranareal. Die Tatsache, daß in Serie zu diesem Membranareal noch die Membran der Restzelle liegt, ist meist irrelevant, da die Restmembran sehr viel größer ist und damit nur einen vernachlässigbaren Serienwiderstand bietet.

Der „Gigaseal“-Kontakt zwischen Pipette und Membran ist nicht nur elektrisch, sondern auch mechanisch sehr stabil. Man kann durch einen kurzen Saugstoß die in der Pipette eingeschlossene Membran perforieren, ohne daß sich der Kontakt zwischen Membran und Meßpipette löst. Damit werden intrazelluläre Messungen möglich. Diese Art der Penetration von Zellen mit Meßpipetten hat sich als wesentlich schonender erwiesen als die herkömmliche Methode des Einstechens von Glasmikroelektroden, vor allem bei sehr kleinen Zellen.

Eine einfache mechanische Manipulationen erlauben es, die mikroskopisch kleinen Membranareale aus dem Zellverband herauszulösen, und entweder die ehemalige Zelloberseite oder die ehemalige zytoplasmatische Seite nach außen zu kehren. Diese verschiedenen Meßkonfigurationen des Patch-Clamp-Verfahrens sind in idealer Weise komplementär: Die zellgebundene Registrierung von Ionenströmen ist eine Methode, die die zellulären Abläufe am wenigsten stört; die Registrierung bei isolierten Membranfragmenten hingegen ermöglicht Messungen unter veränderbaren und genau kontrollierbaren Verhältnissen der Ionenumgebung.

typ für einen transmittergesteuerten Ionenkanal geworden.

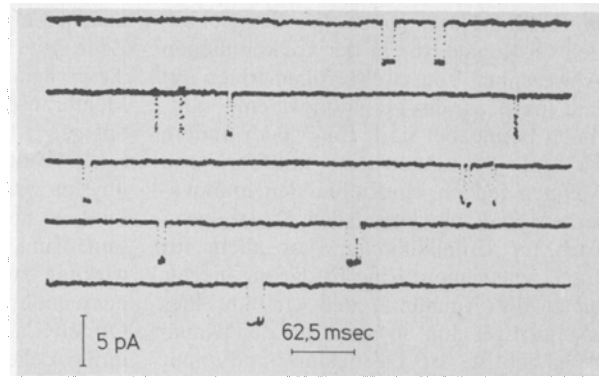
Der Acetylcholin Kanal ist auch biochemischen Studien zugänglich. Dies verdankt man der Tatsache, daß im elektrischen Organ des Zitterrochenes, welches als weiterentwickeltes Muskelgewebe aufzufassen ist, die Acetylcholin Kanäle einer ganzen Batterie von Zellen zur Erzeugung von Hochspannungsimpulsen „mißbraucht“ werden. Der Acetylcholin Kanal liegt dort in sehr großer Dichte vor und läßt sich in ausreichender Menge isolieren und biochemisch untersuchen. Er ist ein „integrales Membranprotein“, d. h. ein Protein, das die Lipiddoppelschicht der Membran ganz durchdringt. Er ist aus fünf Untereinheiten aufgebaut. In allerjüngster Zeit ist es gelungen, diese Untereinheiten mit gentechnischen Methoden herzustellen. Jede weist vier bis sieben Bereiche auf, die als hydrophobe α -Helices oder als amphiphile Helices die Membran durchdringen können. Es wird angenommen, daß letztere durch Aneinanderlagern hydrophile Kanäle bilden.

Der Austausch von Signalen zwischen Zellen ist nicht auf das Nervensystem und nicht auf die beiden Mechanismen der Nervenreizleitung und der synaptischen Übertragung beschränkt. Ionenkanäle wurden inzwischen in nahezu allen Zelltypen tierischer Organismen, ja sogar in Pflanzenzellen gefunden. Weitere Beispiele von Zellfunktionen, die von Ionenkanälen gesteuert werden, sind: die Freisetzung von Hormonen und anderen Sekreten, die Fortbewegung von Einzellern, die Signalumsetzung in verschiedenen Sinneszellen und die Folgereaktionen nach Befruchtung einer Eizelle.

Elementarströme durch einzelne Ionenkanäle

Wie im Informationskasten über das Patch-Clamp-Verfahren beschrieben, kann man heute die Strombeiträge einzelner Ionenkanäle auflösen. Als Meßobjekt benutzt man dabei ein möglichst kleines Membranareal, um das Hintergrundrauschen zu minimieren und um Überlappungen der Elementarströme mehrerer Ionenkanäle zu vermeiden. Meist befindet sich eine größere Anzahl funktionsfähiger Ionenkanäle auf der betrachteten Membranfläche. In diesem Fall wählt man die Meßbedingungen so (z. B. geeignete Membranspannung oder genügend niedrige Transmitterkonzentration), daß die Wahrscheinlichkeit für jeden einzelnen Kanal, den offenen Zustand anzunehmen, sehr gering ist. Die Strombeiträge einzelner Kanäle erscheinen dann als isolierte Ereignisse. Bild 1 zeigt eine Stromregistrierung, die von einer kleinen Fläche

Bild 1: Fünf Oszillographendurchgänge aus einer Registrierung von Membranströmen an einem mikroskopischen Membranareal einer Muskelzelle. Die Pipette enthielt Suberyldicholin (ein Derivat des Acetylcholins) in einer Konzentration von 2×10^{-9} mol/l. Die Strombeiträge einzelner Ionenkanäle sind als abwärtsgerichtete Pulse variabler Dauer sichtbar. Angelegte Spannung: -120 mV; Zimmertemperatur.



einer embryonalen Muskelzelle der Ratte abgeleitet wurde. Diese Membran besitzt die oben bereits beschriebenen Acetylcholin Kanäle in geeigneter (d. h. niedriger) Dichte. Die Meßpipette enthielt eine Lösung von Suberyldicholin in einer Konzentration von 2 nmol/l. Unter diesen Bedingungen mißt man typischerweise nahezu rechteckförmige Strompulse, die das Öffnen und Schließen einzelner Ionenkanäle repräsentieren. Bei einer Spannung über der Membran von -150 mV fließt bei Kanalöffnung ein negativer Strom (nach unten aufgetragen). Die einzelnen Pulse erscheinen in der Registrierung stochastisch; die Öffnungsdauer ist ebenso eine stochastische Größe. Dies ist zu erwarten, da das An- und Abschalten durch Konformationsänderungen einzelner Makromoleküle (der Ionenkanäle) bedingt wird. Die Pulshöhe ist bei gegebener Spannung und Ionenkonzentration mehr oder weniger konstant. Aus ihr läßt sich berechnen, daß während einer Öffnungsperiode typischerweise 10^4 bis 10^5 Elementarladungen den Kanal passieren.

Das Schaltverhalten eines Ionenkanals läßt sich in erster Näherung als das eines Makromoleküls beschreiben, welches zwei Konformationszustände annehmen kann:



Die Zufallssequenz der Verweildauern in den Zuständen A und B wird durch einen Markov-Prozeß 1. Ordnung beschrieben. Man würde demnach erwarten, daß die Verteilungen der Lebensdauern des offenen Zustandes (Pulsbreite) und des geschlossenen Zustandes (Abstand zwischen Pulsen) durch einfache Exponentialfunktionen anpaßbar sind. Die Zeitkonstanten wären dann durch die Kehrwerte der Übergangsraten α und β gegeben. Bei genauerer Messung stellt sich jedoch heraus, daß beide Verteilungen multimodal sind. Dieses deutet darauf hin, daß es mehrere kinetisch unterscheidbare offene und geschlossene Zustände gibt. Eine Analyse der Verteilungen unter Variation der Konzentration des Transmitters Acetylcholin erlaubt de-

taillierte Aussagen über den Reaktionsmechanismus der Anlagerung von ACh an den Kanal und die dadurch induzierte Konformationsänderung [2].

Der Acetylcholin Kanal ist hinsichtlich der Permeation von kleinen Kationen nicht sehr spezifisch. Daher ist sein Gleichgewichtspotential unter physiologischen Bedingungen (hohe Na-Konzentration außen, hohe K-Konzentration innen) nahe Null. Bei Variation der Spannung verhält er sich nahezu wie ein Ohmscher Widerstand. Die meisten anderen Kanaltypen sind in dieser Hinsicht viel komplizierter. Der Na-Kanal der Nervenmembran z. B. hat ein Gleichgewichtspotential nahe dem Nernstschen Wert für Na^+ ; seine Strom- und Spannungskennlinie ist gekrümmt, wie das aus den Gesetzen der Elektrodifusion (Konstantfeldgleichung) bei asymmetrischen Konzentrationen permeabler Ionen abzuleiten ist. Nahezu alle bislang studierten Kanäle zeigen ein Sättigungsverhalten bei Erhöhung der Konzentration permeabler Ionen. Dies deutet auf diskrete Bindeplätze für permeierende Ionen innerhalb der Kanäle hin. Eine Auswertung der Einzelkanalamplituden erlaubt, das Problem der Ionenpermeation losgelöst vom Problem des Überganges zwischen Zuständen zu studieren. Die Abhängigkeit der Einzelkanalamplitude von der Membranspannung und den anliegenden Ionenkonzentrationen läßt sich am besten durch einen Eyring-Ansatz beschreiben. Dieser geht davon aus, daß das Ion beim Kanaldurchtritt Energiebarrieren und Bindungsplätze überwinden bzw. durchlaufen muß. Die Barrierenstruktur wird entweder zeitlich fixiert (während der Dauer der Kanalöffnung) oder aber als fluktuierend angenommen; letzteres, um den sicher vorhandenen internen Strukturfluktuationen des Makromoleküls „Ionenkanal“ Rechnung zu tragen [3]. Manche Ionenkanäle verhalten sich wie einfache „Ein-Ionen-Kanäle“, d. h. aufgrund elektrostatischer Abstoßung kann sich jeweils nur ein Ion im Kanal aufhalten. Andere Ionenkanäle jedoch zeigen ein kompliziertes Verhalten mit Erscheinungen, die sich gut durch elektrostatische Abstoßung zweier Ionen

im Kanal erklären lassen. Ein Beispiel bilden Ca-Kanäle, die in der vollkommenen Abwesenheit von zweiwertigen Ionen gut und unspezifisch für monovalente Kationen permeabel sind. Ca^{++} oder andere bivalente Kationen in mikromolaren Mengen jedoch blockieren den monovalenten Fluß und lassen den Kanal spezifisch für Erdalkalitionen, vor allem für Ca^{++} , erscheinen. Eine Erklärung hierfür bietet die Annahme, daß ein einzelnes zweiwertiges Ion so stark an den Kanal gebunden ist, daß Dissoziation und damit Permeation nur sehr langsam ablaufen. Bei Anwesenheit eines zweiten Erdalkalitionen jedoch wird die Bindung durch elektrostatische Abstoßung destabilisiert, so daß die Permeationsraten ansteigen [4].

In den letzten Jahren wurde eine große Zahl verschiedenartiger Ionenkanaltypen mit der Einzelkanalmethode untersucht, darunter die spannungsabhängigen Kanäle der Nervenmembran und eine Gruppe von Kanälen, die auf verschiedene Transmittersubstanzen (Acetylcholin, Glutamat, γ -Amino-Buttersäure, Glycin) reagieren. Als besonders interessant hat sich eine dritte Klasse von Kanälen herausgestellt: Kanäle, die spannungsabhängig sein können, daneben jedoch in ihrem Schaltverhalten auch von der Anwesenheit und Konzentration intrazellulärer Substanzen beeinflusst werden. Der am besten untersuchte Vertreter dieser Klasse ist der sog. Ca-abhängige K-Kanal. Er kommt in sehr vielen Zelltypen vor und besitzt einen sehr großen Einzelkanalleitwert (100 – 200 Picosiemens). Bei nor-

malem Ca-Spiegel, der in einer ruhenden Zelle bei 100 nmol/l liegt, schaltet sich dieser Kanal nur bei sehr stark positiver Membranspannung an. Steigt der Ca-Spiegel jedoch in den mikromolaren Bereich, so öffnet sich der Kanal bereits bei physiologischen Membranspannungen. Dies ist aus zwei Gründen sehr interessant: Zum einen zeigt sich eine Wechselwirkung zwischen dem K-Kanal und einem anderen Kanaltyp, dem Ca-Kanal: Öffnen Ca-Kanäle, so strömen Ca-Ionen in die Zelle hinein, der Ca-Spiegel steigt, und in der Folge ändert sich das Schaltverhalten des Ca-abhängigen K-Kanals. Zum anderen werden eine ganze Reihe zellulärer Prozesse (z. B. Muskelkontraktion, Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, Mobilität von Nicht-Muskelzellen) durch Veränderungen des Ca-Spiegels in genau diesem Bereich gesteuert. Die Ca-abhängigen Kanäle können somit eine wichtige Rolle als Meßsonden oder Stellglieder in diesen Steuerungsprozessen übernehmen.

Untersuchungen der Schaltkinetik als Funktion thermodynamischer Variablen

Änderungen kinetischer Eigenschaften bei Variation von intensiven thermodynamischen Variablen hat man schon immer dazu benutzt, um Informationen über das zu untersuchende System zu gewinnen. Zum Beispiel lassen sich Enthalpieänderungen aus Änderungen der Reaktionsraten bei verschiedenen Temperaturen er-

mitteln. Bei spannungsabhängigen Kanälen sind die Reaktionsraten α und β für das Öffnen beziehungsweise das Schließen des Kanals (siehe Gl. 1) von der angelegten Potentialdifferenz abhängig. Aus der Steilheit dieser Spannungsabhängigkeit läßt sich die Größe der äquivalenten Ladung bestimmen, die das Membranprotein (der Ionenkanal) „spürt“ und als Steuersignal für Zustandsänderungen verwendet:

$$\alpha/\beta = k_0 \exp n F (E - E_0)/RT. \quad (2)$$

Hier ist n die effektive Wertigkeit einer permeablen Ionensorte, die als „Spannungssensor“ fungiert, F die Faraday-Konstante, R die universelle Gaskonstante, T die absolute Temperatur, k_0 ein Proportionalitätsfaktor, der von anderen thermodynamischen Parametern abhängt, und E_0 das Potential E , bei dem der offene und der geschlossene Zustand der Kanäle die gleiche Besetzungswahrscheinlichkeit haben.

Dieser Ansatz, der auf Eyrings Theorie der absoluten Reaktionsraten basiert, kann um einen weiteren intensiven thermodynamischen Parameter erweitert werden, nämlich den des äußeren Druckes. Damit wird Gl. 2 zu:

$$\alpha/\beta = k' \exp (n F (E - E_0) + P(V^o - V^c))/RT. \quad (3)$$

wobei V^o und V^c die Volumina der Kanäle im offenen bzw. geschlossenen Zustand sind. Die Änderung des Druckes ermöglicht die Messung der Volumenänderungen beim Übergang von einem Zustand in den anderen. Diese Methode wird schon seit langem bei der Untersuchung chemischer Reaktionsabläufe angewandt und hat sich dort bei der Bestimmung von Reaktionsvolumina als fruchtbar erwiesen. Erst in den letzten Jahren ist es möglich geworden, dieses Vorgehen auch auf lebendes Gewebe anzuwenden, nämlich auf Nervenfasern des Tintenfisches. Durch Messung der Potentialänderung, die nötig ist, um eine Gleichverteilung der offenen und geschlossenen Zustände unter verschiedenen hydrostatischen Drücken bis zu 6×10^7 Pa zu erreichen, läßt sich ein Unterschied von 26 \AA^3 zwischen den Volumina des Na-Kanals im offenen und im geschlossenen Zustand ermitteln [5].

Nach Eyring ist die Reaktionsrate nur von der Höhe der Energiebarriere, der sog. Aktivierungsenergie, abhängig, die ein Molekül beim Übergang von einem Zustand in den anderen überwinden muß. Man kann einen „Zustand“ definieren, der dieser maximalen Energiebarriere entspricht, nämlich den sog. aktivierten Zustand. Ein Beitrag zur Aktivierungsenergie stammt von Volumenänderungen, die beim Übergang von einem stabilen

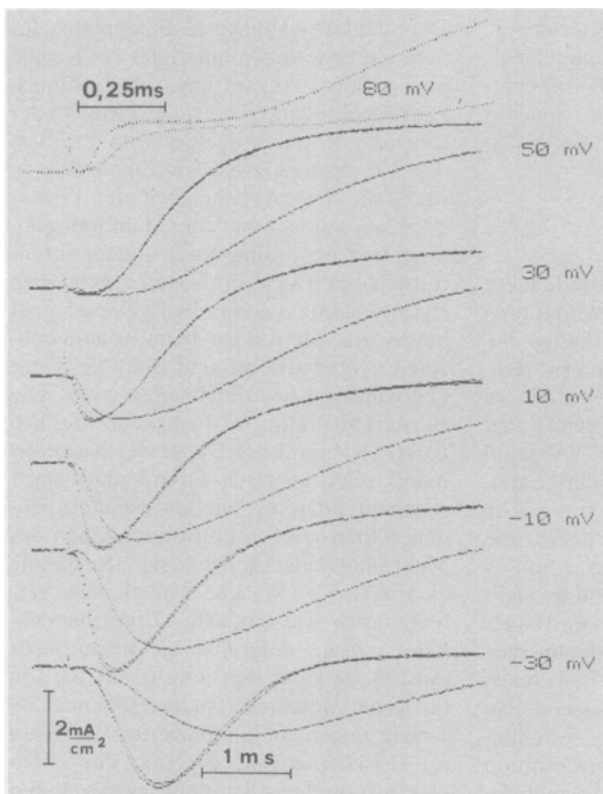


Bild 2: Ionenströme im Riesenaxon des Tintenfisches bei atmosphärischem Druck und bei 6×10^7 Pa (nach [5]). Das Membranpotential wurde von -80 mV auf die rechts aufgeführten Potentiale gebracht. Bei der Depolarisation zu -30 mV fließt fast nur Na^+ -Strom, bei $+50$ mV fast nur K^+ -Strom. Für jede Depolarisation sind drei Kurven abgebildet: Eine repräsentiert die erste Kontrollmessung bei atmosphärischem Druck, die nächste eine Messung bei 6×10^7 Pa und die dritte Kurve schließlich eine weitere Kontrollmessung bei atmosphärischem Druck. Die Amplitudenkalibrierung ist für alle Ströme gültig. Die Depolarisation zu 80 mV hat eine andere Zeitskala. Die Meßpunkte wurden in Abständen von $10 \mu\text{s}$ gespeichert. Temperatur: 10°C . Deutlich ist die langsamere Kinetik der Ionenströme bei höherem Druck zu erkennen.

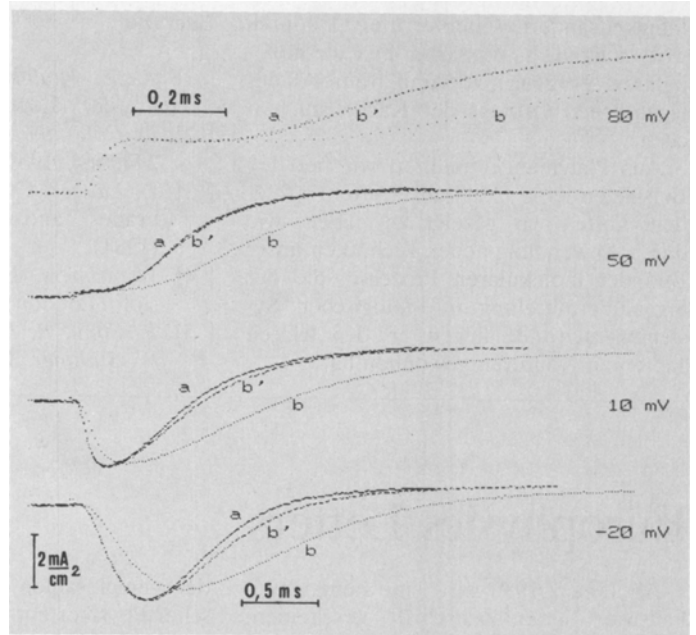
Zustand in den aktivierten Zustand entstehen. Jede Änderung des äußeren Druckes wird die Aktivierungsenergie beeinflussen, wenn der aktivierte Zustand ein vom Ausgangszustand verschiedenes Volumen einnimmt. In anderen Worten: Im allgemeinen werden die Reaktionsraten druckabhängig sein. Daher lassen sich aus der Druckabhängigkeit der Reaktionsraten die Aktivierungsvolumina bestimmen. Zum Beispiel wird die Kinetik der Na^+ - und K^+ -Ströme durch eine Druckerhöhung von 6×10^7 Pa um einen Faktor von ca. 2,7 langsamer. Hieraus läßt sich schließen, daß die Kanäle im aktivierten Zustand ein gegenüber dem geschlossenen Zustand um 58 \AA^3 größeres Volumen einnehmen. Bild 2 zeigt Ionenströme im Riesenaxon des Tintenfisches, die als Antwort auf depolarisierende Spannungsimpulse bei atmosphärischem Druck und bei 6×10^7 Pa fließen. Deutlich kann man die langsamere Kinetik der Ionenströme bei höherem Druck sehen. In Bild 3 sind die unter hohem Druck (4×10^7 Pa) gemessenen Ionenströme so skaliert worden, daß sie mit den Kontrollmessungen (bei atmosphärischem Druck) übereinstimmen. Die Zeitstauchung, die notwendig ist, um diese Übereinstimmung zu erreichen, ist ein direktes Maß für die Verlangsamung der Kinetik. Die veränderte Amplitude bei höherem Druck läßt sich durch eine Verschiebung des Gleichgewichtszustandes erklären, da der offene und der geschlossene Zustand eines Kanals verschiedene Aktivierungsvolumina haben. Auf die Ursache für die notwendige Zeitverschiebung werden wir im nächsten Abschnitt eingehen. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Änderung intensiver Größen wie Potential und Druck Rückschlüsse auf die effektive Ladung einer permeablen Ionensorte und auf Volumenänderungen der Kanäle zulassen.

Messung von Steuerströmen

Im letzten Abschnitt wollen wir uns mit der Untersuchung der Vorgänge beim Öffnen eines bestimmten Kanaltyps, des Na-Kanals, beschäftigen. Es gibt zwei Gründe, warum sich gerade dieser Kanal für solche Messungen besonders eignet: Erstens ist er einer der am besten untersuchten Kanäle und zweitens sind die zu messenden dielektrischen Steuerströme wesentlich größer als bei anderen spannungsabhängigen Kanälen, da der Na-Kanal eine vergleichsweise schnelle Schaltkinetik besitzt.

Was sind eigentlich Steuerströme? Spannungsabhängige Kanäle (wie der Na-Kanal), deren Öffnungswahrscheinlichkeit sich als Funktion der an der Mem-

Bild 3: Die bei einem Druck von 4×10^7 Pa gemessenen Ionenströme (b) wurden so skaliert, daß sie mit den bei atmosphärischem Druck gemessenen Strömen (a) übereinstimmen (nach [5]). Die skalierten Ströme (b') wurden durch eine Zeitstauchung, Amplitudenanpassung und eine zeitliche Verschiebung (ca. 15–40 μs) der gemessenen Ströme (b) erhalten. Das nicht perfekte Überlappen der Ströme a und b' bei kleinen Depolarisationsspannungen beruht auf verschiedenen Aktivierungsvolumina der Kanäle im offenen und geschlossenen Zustand. Temperatur: 15 °C.



bran anliegenden Potentialdifferenz ändert, müssen Änderungen dieser Potentialdifferenz „wahrnehmen“. Das können sie nur über eine Ladung, die sich innerhalb des elektrischen Feldes in der Membran befindet, und die sich aufgrund von Potentialänderungen in ihrer Lage verschiebt. Es handelt sich hier um dieselbe Ladung, die in den Gleichungen 2 und 3 vorkommt. Die Bewegung dieser Ladung ist als dielektrischer Verschiebestrom meßbar und wird als Steuerstrom (*gating current*, siehe [6]) bezeichnet. Die Ladungsmenge, die verschoben wird, läßt sich aus der Steilheit der Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit ermitteln. Die Größe des Steuerstroms hängt von der Geschwindigkeit, mit der der Kanal von einem Zustand (z. B. vom geschlossenen) in den anderen (z. B. in den offenen) übergeht, also von der Kinetik, ab. Die maximal erreichbaren Steuerströme sind um einige Größenordnungen kleiner als typische Ionenströme. Daher müssen bei Messungen des Steuerstroms die Kanäle für den Ionen-transport impermeabel gemacht werden. Hierzu verwendet man entweder spezifische Blocker (meistens natürliche Gifte wie das des Pufferfisches, das die Natriumkanäle blockierende Tetrodotoxin), oder man ersetzt die permeablen Ionensorten durch impermeable Ionensorten. Dann können die Steuerströme als Ströme gemessen werden, die bei einer Änderung des Membranpotentials fließen und die sich wie kapazitive Ströme verhalten. Sie werden natürlich nur in einem Potentialbereich fließen, in dem sich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals ändert. Außerdem hat man immer mit dem Problem zu tun, die Steuerströme vor dem Hintergrund der ohnehin großen kapazitiven Membranströme messen zu

müssen, da jede Membran einen Kondensator darstellt. Dazu zieht man die Ströme, die bei Potentialänderungen in einem Potentialbereich, in dem keine Zustandsübergänge des Kanals zu erwarten sind, vom Gesamtstrom ab.

Auch Steuerströme sind druckabhängig: Bei 6×10^7 Pa verlangsamt sich ihr Zeitverlauf. Der Zeitverlauf der verlangsamten Ströme läßt sich mit den Kontrollwerten exakt zur Deckung bringen, wenn man die Zeitachse der langsamen Ströme um einen Faktor von ungefähr 1,6 staucht. Dieses ist deutlich weniger als die Verlangsamung der Ionenströme. Hieraus läßt sich sofort schließen, daß nicht alle Prozesse, die zur Öffnung des Kanals führen, eine meßbare Ladungverschiebung mit sich bringen. Im letzten Schritt vor dem eigentlichen Öffnen muß der Kanal ein großes Aktivierungsvolumen besitzen – anders läßt sich die stärkere Verlangsamung der Ionenströme gegenüber den Steuerströmen nicht erklären. Dieser Schritt kann jedoch nicht mit einer wesentlichen Ladungverschiebung verbunden sein.

Das geringere Aktivierungsvolumen der Steuerströme gegenüber den Ionenströmen ist auch die Ursache für die Zeitverschiebung, die man vornehmen muß, um ein Überlappen der Ionenströme bei verschiedenen Drücken zu erreichen (siehe Bild 3). Die zeitliche Stauchung der Ionenströme betrifft die Steuerströme überproportional, weil sie ja im Gesamtstrom enthalten sind. Daher war es notwendig, bei den gezeigten Messungen eine Zeitverzögerung von 15–40 μs einzuführen, um eine bestmögliche Überlappung der Gesamtströme zu erreichen.

Messungen dieser Art zeigen, daß Steuerströme den Einblick in Übergänge zwischen Zuständen erlauben, die keine Leit-

fähigkeitsänderung hervorrufen. Dadurch wird es möglich, Aussagen über die molekularen Vorgänge vor und während des eigentlichen Öffnens der Kanäle zu machen.

Aus Platzmangel mußten wir bei den Beispielen eine Auswahl treffen; trotzdem hoffen wir gezeigt zu haben, wie durch Anwendung neuer Techniken unser Bild der molekularen Prozesse, die der Signalübermittlung in biologischen Systemen zugrunde liegen, in den letzten Jahren an Konturen gewonnen hat.

Literatur

- [1] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Physiol. (London) **116**, 449 (1952).
 [2] D. Colquhoun, B. Sakmann, Nature **294**, 464 (1981).
 [3] P. Läuger, Current Topics in Membranes and Transport **21**, 309 (1984).
 [4] W. Almers, E. McCleskey, J. Physiol. (London) **353**, 565 (1984).
 [5] F. Conti, R. Fioravanti, J. R. Segal, W. Stühmer, J. Membr. Biol. **69**, 23 (1982).
 [6] C. M. Armstrong, F. Bezanilla, Nature **242**, 456 (1973).
 [7] E. Neher, B. Sakmann, Nature **260**, 799 (1976).
 [8] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, Pflügers Arch. **391**, 85 (1981).
 [9] K. S. Cole, Arch. Sci. Physiol. **3**, 253 (1949).
 [10] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, B. Katz, Arch. Sci. Physiol. **3**, 129 (1949).

Europhysics Letters

Ab Januar 1986 wird eine neue physikalische Letters-Zeitschrift erscheinen: *Europhysics Letters*. Herausgeber sind die Europäische Physikalische Gesellschaft (EPS), die Französische Physikalische Gesellschaft, die Italienische Physikalische Gesellschaft und das Institute of Physics (IOP), Großbritannien. Diese vier Partner werden von acht weiteren physikalischen Gesellschaften europäischer Länder unterstützt, den sog. Associate Partners, darunter auch die DPG (mit 50 000 SFr.). In den Europhysics Letters gehen die Letters-Zeitschriften *Journal de Physique Lettres* und *Il Nuovo Cimento Lettere* der Französischen bzw. Italienischen Physikalischen Gesellschaft auf, das IOP hat als Partner-Herausgeber 150 000 SFr. eingebracht, die EPS übernimmt die wissenschaftliche Steuerung und Kontrolle der Zeitschrift.

Die neue Zeitschrift wird nach Einschätzung der meisten Mitgliedergesellschaften der EPS ein wichtiges Element zur Stärkung der Europäischen Physikalischen Gesellschaft bilden.

Das Konzept

Die Europhysics Letters veröffentlichen kurze Mitteilungen aus allen Bereichen der Physik, die den Anforderungen „hohe Qualität“ und „Verständlichkeit“ (zumindest für Physiker aus demselben Fachgebiet) genügen. Eine Zuschrift soll normalerweise nicht länger als 3000 Worte sein, wobei Titel, Bilder und Referenzen – in Wortäquivalenten umgerechnet – eingeschlossen sind; die absolute Obergrenze liegt bei 4500 Wortäquivalenten. Es wird davon ausgegangen, daß einem Letter später eine ausführliche Veröffentlichung an anderer Stelle folgt. Beiträge werden in Englisch, Französisch, Deutsch und Russisch angenommen und in der Originalsprache veröffentlicht.

Der Namensbestandteil „Euro“ soll darauf hinweisen, daß die Zeitschrift aus

der gemeinsamen Anstrengung europäischer Physiker entstanden ist. Auf keinen Fall soll damit eine Einschränkung des Kreises der Autoren oder der Leser signalisiert werden.

Europhysics Letters wird gedruckt erscheinen im Format B5 (16 × 24 cm), jeweils 64 Seiten stark sein und am 1. und 15. eines Monats herauskommen.

Die Organisation

Verantwortlicher Chefredakteur der neuen Zeitschrift (Editor-in-Chief) ist Nicholas Kurti von der Universität Oxford. Ihm stehen folgende Co-Editors zur Seite:

- G. Barbiellini, CERN, Genf
- F. Bassani, Scuola Normale Superiore Pisa
- E. Brezin, CEN, Saclay
- B. Cagnac, Université Pierre & Marie Curie, Paris
- J. Demaret, Université Liège
- L. D. Fadeev, Akademie der Wissenschaften, Leningrad
- P. Fulde, MPI für Festkörperforschung, Stuttgart
- C. J. Joachain, Université Libre, Brüssel
- M. Kaufmann, MPI für Plasmaphysik, Garching
- T. W. B. Kibble, Imperial College, London
- F. Mezei, Akademie der Wissenschaften, Budapest
- R. H. Siemssen, K. V. I., Groningen
- J. P. Toennies, MPI für Strömungsforschung, Göttingen
- G. Weber, DESY, Hamburg.

Ein Manuskript wird zwei Gutachtern zugeschickt, die ihre Stellungnahmen dem zuständigen Co-Editor übergeben. Dieser entscheidet in direkter Verantwortlichkeit anhand der Gutachten über Aufnahme oder Ablehnung, klärt Zweifelsfälle und begründet Ablehnungen.

Darüber hinaus benennt die EPS Kuratoren (Advisory Editors), die das wissen-

schaftliche Niveau, die Annahme- und Ablehnungspraxis sowie die Ausgewogenheit der Zeitschrift überwachen. Dieses Gremium soll in fachlicher und geographischer Hinsicht ein breites Spektrum repräsentieren.

Für Autoren:

Manuskripte sind in vierfacher Kopie zu schicken an:

Staff Editor
 Europhysics Letters, EPS
 P.O. Box 69
 CH-1213 Petit-Lancy 2, Schweiz

Auf dem Manuskript ist gemäß ICSU A/B (PACS)-Klassifikation das physikalische Fachgebiet anzugeben, aus dem die Arbeit stammt. Außerdem sollen 20 Schlüsselworte für den Indexband markiert werden.

Vorausgesetzt ein Manuskript wird ohne Einwände angenommen oder es sind nur sehr geringfügige Änderungen nötig, kann ein Autor damit rechnen, daß seine Arbeit innerhalb von drei Monaten nach Eingang bei der EPS veröffentlicht wird. (Manuskripte die an *Journal de Physique Lettres* oder an *Il Nuovo Cimento Lettere* adressiert sind und dort 1985 nicht mehr erscheinen, werden automatisch an *Europhysics Letters* weitergeleitet, sofern der Autor nicht widerspricht.)

Für Leser:

Persönliche EPS-Mitglieder können *Europhysics Letters* beim EPS-Sekretariat (Adresse: European Physical Society, P.O.Box 69, CH-1213 Petit-Lancy 2, Schweiz) zum Preis von 55 SFr. pro Jahr abonnieren; für Institutionen beträgt der Preis 550 SFr. pro Jahr.

(Dieser Bericht stützt sich weitgehend auf die Vorstellung der *Europhysics Letters* in der Juni-Ausgabe 1985 des EPS-Bulletins *europhysics news*.)

E. Dreisigacker