

Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik

Eine verblüffend einfache Methode ermöglicht es, einzelne Ionenkanäle in Zellmembranen auf ihre Funktion zu untersuchen. Damit ließen sich grundlegende Erkenntnisse über die Signalübertragung bei Zellen gewinnen.

Von Erwin Neher und Bert Sakmann

Ionenkanäle spielen bei der Übertragung von Signalen in und zwischen Zellen eine entscheidende Rolle. Diese porenbildenden Proteine, die in die äußere Zellmembran (die Plasmamembran) fast aller Zelltypen eines Organismus eingelagert sind, vermitteln die elektrische Aktivität von Nerven- und Muskelzellen und übersetzen physikalische oder chemische Sinnesreize in elektrische Signale für das Nervensystem. Selbst Zellen wie Blut-, Immun- oder Leberzellen, die nicht direkt an das Nervensystem gekoppelt sind, benutzen sie für Kommunikationszwecke.

Seit den fünfziger Jahren kann man die elektrischen Ströme messen, die auftreten, wenn Ionen (elektrisch geladene Atome oder Moleküle) durch solche Membrankanäle wandern. Bis in die siebziger Jahre war die Technik, gemessen an der Größe des Objektes, allerdings so grob, daß sich damit lediglich das Verhalten vieler Ionenkanäle gleichzeitig erfassen ließ. Die von uns entwickelte Patch-Clamp-Methode, für die wir im vergangenen Jahr den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten, eröffnete die Möglichkeit, solche Kanäle auch einzeln zu beobachten (vergleiche „Nobelpreis für Medizin – Messung von Strömen an einzelnen Ionenkanälen“, von Ulrich B. Kaupp, Spektrum der Wissenschaft, Dezember 1991, Seite 20).

Zwar benötigten wir mehrere Jahre für die Entwicklung und Verfeinerung dieses Verfahrens, das wörtlich mit Membranfleck-Klemme zu übersetzen wäre. Das Grundprinzip ist jedoch einfach: Indem man die Spitze einer äußerst dünnen, speziell präparierten Glaspipette dicht

auf die Zellmembran aufsetzt, isoliert man das eingegrenzte Membranareal (den Membranfleck) und die darin befindlichen Ionenkanäle elektrisch von der übrigen Membran (Bild 1 und 2). Durch chemische oder elektrische Manipulationen lassen sich dann die Eigenschaften der isolierten Kanäle erforschen. Außerdem kann man das Membranareal ablösen und getrennt von der Zelle untersuchen. Oder man saugt innerhalb des abgegrenzten Bereichs ein Loch in die lebende Zelle, um Substanzen einführen und so die chemische Zusammensetzung des Cytoplasmas (des „Zellsaftes“) künstlich verändern zu können. Mit diesen Verfahren läßt sich untersuchen, wie Ionenkanäle die Membranspannung beeinflussen und welche Rolle sie bei Zellaktivitäten wie Sekretion oder Kontraktion spielen.

Hunderte von Forschungslaboratorien benutzen inzwischen die 1976 von uns eingeführte Patch-Clamp-Technik und haben ihren Einsatzbereich inzwischen noch erweitert. Indem wir hier im Überblick darstellen, was diese Untersuchungen über Eigenschaften und Funktion von Ionenkanälen erbracht haben, schließen wir auch Ergebnisse dieser zahlreichen Arbeiten ein.

Erste Hinweise auf Ionenkanäle

Unser Interesse an Ionenkanälen hatten vor allem zwei faszinierende Publikationen aus den Jahren 1969 und 1970 geweckt (damals arbeiteten wir als Doktoranden am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München über die Biophysik von Zellmembranen). Es ging darin

um künstliche Lipid-Membranen, die – wie biologische Membranen auch – aus einer Lipid-Doppelschicht aufgebaut sind und in ihrer reinen Form als elektrische Isolatoren wirken. Doch Ross C. Bean und seine Kollegen bei der Ford Aerospace Corporation in Newport Beach (Kalifornien) sowie Steven Hladky und Denis Haydon an der Universität Cambridge (Großbritannien) hatten festgestellt, daß die Membranen elektrisch leitfähig wurden, sowie man geringe Mengen von bestimmten Antibiotika oder Proteinen in sie einbaute. Weil der hindurchfließende Strom sich stufenartig änderte, vermuteten die Wissenschaftler, daß einzelne Proteinmoleküle Kanäle durch die künstliche Membran bilden, wobei die Stufen dem Öffnen und Schließen solcher Poren entsprechen.

Womöglich war dies die Lösung der Frage, wie in Neuronen und anderen Zellen elektrische Signale zustande kommen. Schon in den fünfziger Jahren hatten in Cambridge die beiden englischen Physiologen Sir Alan L. Hodgkin und Sir Andrew F. Huxley eine Theorie der Erregungsleitung in Nervenfasern aufgestellt und dabei die Existenz von Ionenkanälen in Zellmembranen postuliert; 1963 wurden sie für ihre Theorie (gemeinsam mit Sir John C. Eccles) mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (siehe „Die Nervenzelle“ und „Ionenkanäle in Nervenmembranen“, Spektrum der Wissenschaft, Mai und November 1979). Wer immer sich damals für Membranbiophysik interessierte begriff, daß eine Meßtechnik mit besserem Auflösungsvermögen einen ganzen Mikrokosmos von Signalmolekülen erschließen würde.

In den folgenden Jahren mehrten sich die Hinweise, daß Zellmembranen tatsächlich Ionenkanäle enthalten. In erster Linie ist hier die statistische Analyse von Spannungsänderungen an der Kontaktstelle zwischen Nerven und Muskeln zu nennen, die der aus Deutschland stammende Sir Bernard Katz und Ricardo Miledi 1972 am University College in London vornahmen. (Die Verbindungsstellen, an denen ein Neuron ein Signal an eine andere Nervenzelle oder an eine

Muskelfaser weitergibt, sind die Synapsen; die spezielle signalverarbeitende Struktur an Skelettmuskelfasern heißt auch motorische Endplatte.) Die beiden Neurophysiologen kamen zu dem Schluß, daß die synaptischen Signale durch Überlagerung von sehr kleinen Elementarereignissen zustandekommen, wie man sie bei den künstlichen Ionenkanälen gemessen hatte. (Katz erhielt 1970 den Medizin-Nobelpreis, mit Julius Axelrod und Ulf von Euler-Chelpin.)

Ausschalten des Hintergrundrauschens

Die Schlußfolgerungen von Katz und Miledi waren indirekt und beruhten auf einer Reihe von Annahmen. Es gab damals noch keine Methode, um an Zellmembranen Einzelkanalströme direkt zu messen. Sie verschwanden im Hintergrundrauschen, das zwar nur ein zehnmilliardstel Ampere betrug, aber damit immer noch 100mal größer war als

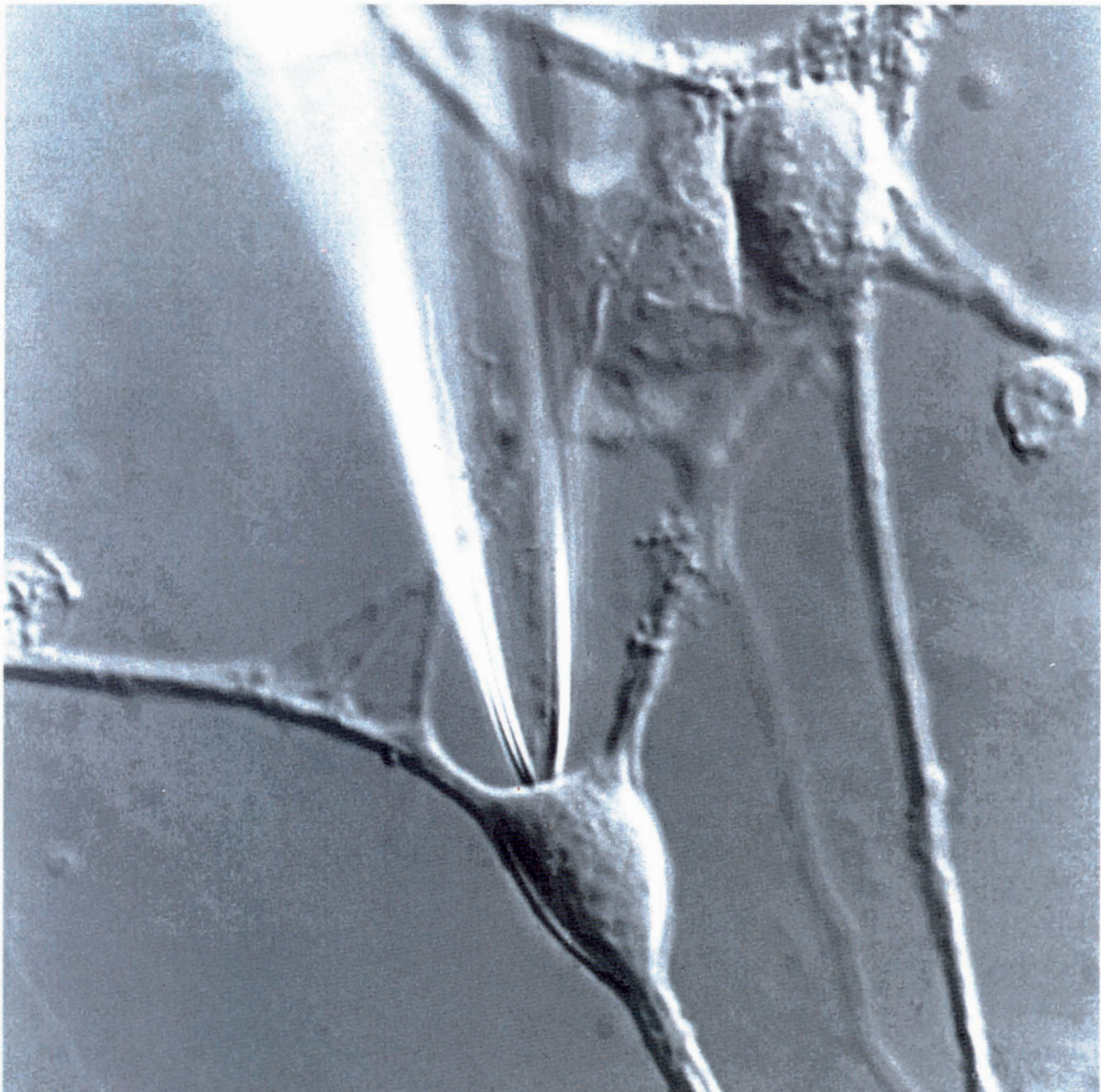


Bild 1: Durch Aufsetzen einer dünnen, speziell dafür präparierten Glaspipette auf die gereinigte Oberfläche einer Nervenzelle kann man die Aktivität einzelner Ionenkanäle in der Zellmembran messen. Die Pipette, deren Durchmesser lediglich ein Tausendstel eines Millimeters beträgt, isoliert die umschlossene Stelle physi-

kalisches und elektrisch gegenüber ihrer Umgebung. Damit ermöglicht diese Patch-Clamp-Technik (deutsch: Membranflecken-Klemme), die molekularen Ereignisse bei der Signalerzeugung und -übertragung zwischen und innerhalb von Zellen zu erforschen. Sie wird heute in der Zellphysiologie weltweit angewandt.

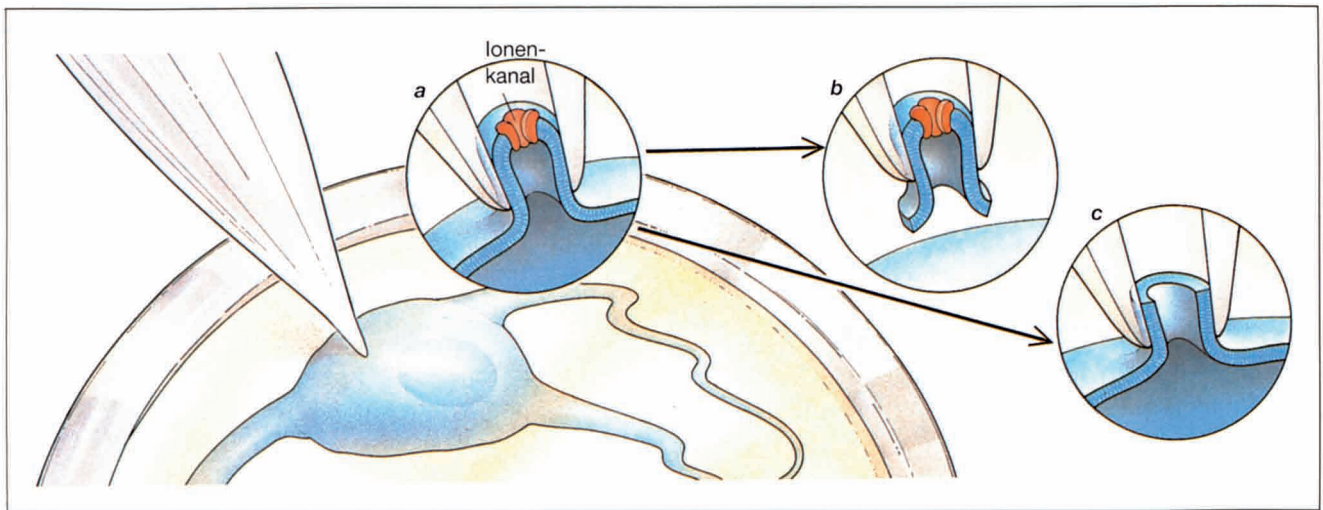


Bild 2: Drei Varianten der Patch-Clamp-Technik. Setzt man eine Patch-Pipette auf die enzymatisch gereinigte Membran einer Zelle auf und erzeugt durch leichtes Ansaugen einen schwachen Unterdruck, wird das eingeschlossene Membranareal mitsamt den enthaltenen Ionenkanälen elektrisch abgedichtet (a), wobei Widerstände zwischen innen und außen in der Größenordnung von Gigaohm auftreten. Man kann die Zelle nun über die Pipette auf

verschiedene Weise reizen und die Reaktion der Ionenkanäle darauf messen. Für andere Experimente läßt sich das Membranareal aber auch herauslösen und für sich allein untersuchen (b). Wenn es gelingt, den eingeschlossenen Membranbereich durch einen Saugstoß platzen zu lassen, ohne daß die Dichtung beschädigt wird (c), kann man durch die Pipette Substanzen zuführen und somit den Inhalt der lebenden Zelle manipulieren.

der Strom, der beim Öffnen eines Kanals durch die Membran fließt.

Im Jahre 1973 machten wir uns an dieses Problem. Wir wußten, daß die Meßgeräte nur dann mit der gewünschten Empfindlichkeit ansprechen würden, wenn es gelänge, aus der Zellmembran ein sehr kleines Areal zu isolieren. Dazu benutzten wir eine mit elektrisch leitender Flüssigkeit gefüllte Mikropipette aus Glas, die wir auf eine enzymatisch gereinigte Muskelfaser aufsetzten. Da Glas Strom nicht leitet, hofften wir, auf diese Weise einige wenige Ionenkanäle von der restlichen Membran isolieren zu können und so ein klares Meßsignal zu erhalten.

Es war allerdings nicht einfach, eine dichte Verbindung zwischen Pipette und Membran zu erzielen. Wie viele andere, die früher schon extrazelluläre Pipetten verwendet hatten, kämpften wir mit Lecks, durch welche die Flüssigkeiten außer- und innerhalb der Pipette Kontakt zueinander bekamen. Wir gaben aber nicht auf, reinigten die Zelloberfläche noch sorgsamer, verbesserten die Form und optimierten den Durchmesser der Pipettenspitze. So gelang es uns endlich doch, an der neuromuskulären Synapse Ströme durch einzelne Kanäle zu beobachten; sie wurden ausgelöst durch den Neurotransmitter Acetylcholin, der dort als signalerzeugender Botenstoff fungiert. (Bei dieser Form der Signalübertragung gibt die vorgeschaltete Zelle an der – präsynaptischen – Membran die Transmittersubstanz in den synaptischen Spalt ab; der Transmitter löst dann an der gegenüberliegenden – postsynapti-

schen – Membran der nachgeschalteten Zelle eine Reaktion aus.)

Diese erste Messung bestätigte viele ältere Annahmen über die elementaren Ströme durch Ionenkanäle – insbesondere, daß die elektrischen Signale in Pulsen stets gleicher Amplitude, aber verschiedener Dauer auftreten (Bild 3).

Da die Abdichtung zwischen Pipette und Membran immer noch zu wünschen übrigließ und wir darum das Hintergrundrauschen nicht völlig ausschalten konnten, war es uns zunächst nicht möglich, auch Ionenkanäle anderer Synapsentypen zu untersuchen. Einige Jahre später entdeckten wir durch Zufall, daß der elektrische Widerstand sich um mehrere Zehnerpotenzen auf mehr als eine Milliarde Ohm erhöhen ließ, wenn man – gleichzeitig mit einigen anderen versuchstechnischen Verbesserungen – die Membran durch die Pipette leicht ansaugte, also einen kleinen Unterdruck erzeugte (Bild 2). Zudem gelang es durch vorsichtiges Zurückziehen der aufsitzenden Pipette, ein sehr kleines Membranareal aus der Zellmembran herauszulösen, um sie dann isoliert zu untersuchen. Damit hatten wir eine Methode entwickelt, die elektrischen Ströme durch einzelne Ionenkanäle mit höchster Auflösung aufzuzeichnen.

Die Rolle der Ionenkanäle in Muskulatur und Nervensystem

Am genauesten wurden bisher Ionenkanäle von motorischen Endplatten studiert. An dieser Nerv-Muskel-Verbin-

dung setzt das Neuron kleine Pakete (Quanten) von Acetylcholin-Molekülen in den synaptischen Spalt frei. Diese Moleküle verbinden sich kurzzeitig mit Ionenkanälen auf der gegenüberliegenden Seite des Spaltes, den Acetylcholin-Rezeptorkanälen (siehe Bild 3). Daraufhin öffnen sich diese Kanäle für bestimmte Ionen, so daß ein kleiner Strom durch sie hindurchfließt. Was schließlich als Gesamtstrom an der Endplatte auftritt, ist die Summe der Einzelströme durch Hunderttausende von Kanälen.

Wie bereits beschrieben, kann man den Strom durch einzelne Kanäle messen, indem man eine extrem dünne Pipettenspitze gegen eine motorische Endplatte drückt und eine geringe elektrische Spannung anlegt. Enthält die Pipette eine Acetylcholin-Lösung geringer Konzentration, beobachtet man ein Hin- und Herspringen zwischen zwei Zuständen: Entweder fließt kein Strom, weil der oder die Ionenkanäle auf dem isolierten Membranstück geschlossen sind; oder es tritt abrupt ein Strom von etwa 2,5 Picoampere auf – ein Zeichen, daß ein Kanal sich geöffnet hat. Nach jeweils unterschiedlich langer Zeitspanne springt das Rezeptormolekül in den geschlossenen Zustand zurück, und der Stromfluß bricht wieder ab.

In dieser variablen Dauer spiegelt sich die stochastische Natur der Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und seinem Liganden wider. Die Amplitude, also Höhe eines Stromstoßes entspricht der Transportkapazität eines Kanals für Ionen – im Falle des Acetylcholin-Rezeptorkanals sind das Natrium- und Kali-

um-Ionen. Durch Vergleich der gemessenen Stromstärken und -dauern mit den Vorhersagen verschiedener Modelle kann man herausfinden, wie Transmitter und Rezeptor miteinander wechselwirken und wie diese Vorgänge das Öffnen und Schließen des Kanals bestimmen.

Im Zentralnervensystem sind die bekanntesten Transmitter für eine rasche synaptische Signalübertragung die Aminosäuren Glycin, Gamma-Aminobuttersäure (kurz GABA nach englisch *gamma-aminobutyric acid*) und L-Glutamat. Auch die zugehörigen Kanalrezeptoren reagieren auf ihr Andocken mit kurzen, pulsartigen Stromstößen; sie scheinen sich demnach gleichfalls einzeln und zufallsgesteuert zu öffnen und zu schließen. Allerdings verhalten sich transmittergesteuerte Kanäle im Zentralnervensystem oft komplizierter als solche an den motorischen Endplatten: Manche Arten von Kanälen gehen mitunter nur teilweise auf oder zu, und in den einzelnen Hirnregionen finden sich teils unterschiedliche Versionen eines Typs.

Befehle vom Zentralnervensystem an die Muskulatur müssen extrem schnell übermittelt werden. Dazu wandern elektrische Signale in Form von Spannungspulsen oder Aktionspotentialen die Nervenfasern oder Axone entlang: Das sind lange Ausläufer der Neuronen, die bei Wirbeltieren zur Beschleunigung der Erregungsleitung segmentweise von einer isolierenden Hülle aus Myelin umschlossen sind. Diese Signale werden von sogenannten Natrium-Ionenkanälen vermittelt, welche allerdings statt von chemischen Transmittern von Veränderungen der elektrischen Spannung zwischen der Innen- und der Außenseite der Membran geschaltet werden, was äußerst schnell vonstatten geht.

Wie Analysen der elementaren Natriumströme ergeben haben, weisen auch diese Kanäle zwei Zustände auf und öffnen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits bei kleinen Auslenkungen der Membranspannung. Der Nervenimpuls entsteht durch Überlagerung von Zehntausenden solcher elementarer Natriumströme. Spannungsgesteuerte Kanäle für andere Ionensorten, wie für Kalium oder Calcium, scheinen recht ähnlich zu funktionieren wie Natriumkanäle, was auf viele gemeinsame Strukturmerkmale zurückzuführen ist.

Wie Patch-Clamp-Untersuchungen inzwischen gezeigt haben, ist das Geschehen an den meisten Sorten von Ionenkanälen bei genauerem Hinsehen allerdings noch um einiges komplizierter als bisher geschildert. Der elementare Vorgang ist bei fast allen untersuchten Typen nicht ein einzelner Strompuls, sondern eine

Folge rascher Stöße mit kurzen Unterbrechungen. Ein Acetylcholin-Rezeptor in der motorischen Endplatte, an den sich ein Transmittermolekül gelegt hat, öffnet und schließt sich beispielsweise mehrere Male, bis das Acetylcholin sich endgültig von ihm löst.

Zusammen mit David Colquhoun vom University-College in London untersuchten wir die Art solcher Übergänge bei Endplatten-Kanälen. Mittels Wahrscheinlichkeitstheorie schätzten wir die Zahl der Zustände ab, die ein Acetylcholin-Rezeptorkanal beim mehrmaligen Öffnen und Schließen einnehmen kann, sowie die Übergangswahrscheinlichkeit von einem Zustand in den anderen. Diesen eingehenden Studien zufolge sollte der Rezeptor zwei Bindungsstellen für Acetylcholin haben (Bild 3). Sind beide besetzt, ist der Kanal mit hoher Wahrscheinlichkeit offen. In Anbetracht der hohen Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt bei einer Erregungsübertragung verhalten sich die Ionenkanäle in der motorischen Endplatte wie rasch anspringende, chemisch gesteuerte Stromschalter.

Membrankanäle sind offenbar deutlich heterogen: Oft scheinen in einem isolierten Membranstück zwei oder mehr Klassen nahe verwandter Kanäle akti-

viert zu sein. Daß es Subtypen geben muß, wissen Pharmakologen schon seit vielen Jahren. Doch erst das subtile Instrumentarium der modernen Gentechnik, insbesondere die DNA-Rekombination, hat das unvermutete Ausmaß dieser Vielfalt ans Licht gebracht. Von jedem Kanaltyp, gleich ob transmitter- oder spannungsgesteuert, gibt es mehrere Versionen, jede mit ihren eigenen Leitfähigkeits- oder Schaltcharakteristiken. Durch äußere Reize und mit dem Entwicklungsstadium kann sich das Mosaik der Subtypen auf den Zellmembranen ändern und damit zur Anpassung eines Organismus beitragen.

Die Struktur des Acetylcholin-Rezeptors

Wichtig für das Verständnis der Membrankanäle ist es, den Zusammenhang zwischen ihrer Funktionsweise und ihrem Aufbau zu erkennen. Ein Weg dazu ist, wichtige Aminosäuresequenzen des Proteins zu lokalisieren, gezielt abzuwandeln und die Auswirkung dieser Änderung auf die Funktion zu prüfen.

Solche Eingriffe sind möglich, seit man die DNA (die Erbsubstanz) der fünf Untereinheiten des Acetylcholin-Rezep-

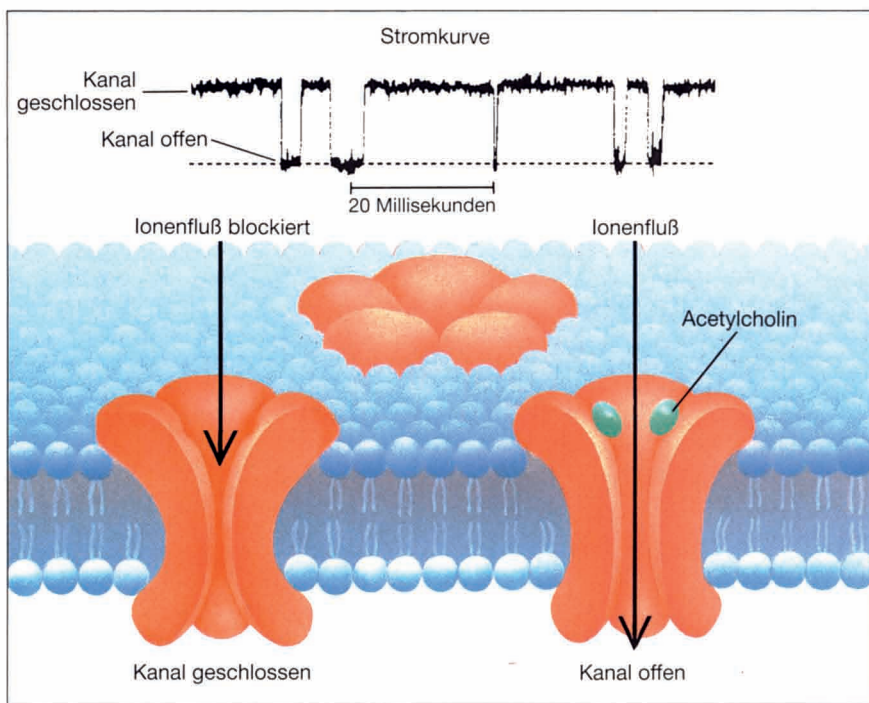


Bild 3: Rezeptorkanäle an der motorischen Endplatte (der Verbindungsstelle zwischen Neuron und Muskelfaser, an der Signale übermittelt werden) öffnen sich in Reaktion auf den Transmitter (Signalüberträger) Acetylcholin. Im Ruhezustand können den Kanal keine Ionen passieren. Erst wenn

Acetylcholin sich an den Rezeptor anlagert, öffnet sich die Pore, und es fließt ein Elementarstrom von wenigen Picoampere. Die Dauer der Ströme variiert und auch die der Pausen dazwischen – ein Indiz, daß die Interaktion zwischen Acetylcholinmolekülen und Rezeptoren zufallsgesteuert ist.

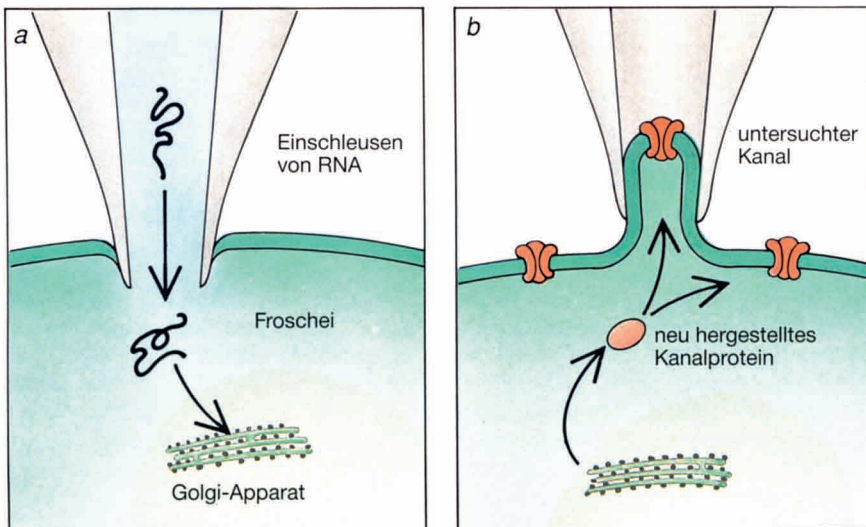


Bild 4: Gentechnisch veränderte Froscheier sind ein nützliches Hilfsmittel, um Struktur und Funktion von Ionenkanälen aufzuklären. Man schleust RNA-Sequenzen ein, in denen der Bauplan für Untereinheiten der Kanalproteine codiert ist (a). Die Eizelle synthetisiert diese Proteine und baut sie in ihre äußere Membran ein,

wo sie sich zu Kanälen zusammenlagern, die dann mit der Patch-Clamp-Technik untersucht werden können (b). Indem man genetisches Material von Organismen mit Ionenkanälen unterschiedlicher Eigenschaften kombiniert, vermag man die Bedeutung einzelner Komponenten für die Funktion der Kanäle zu erschließen.

tors cloniert und sequenziert (die Abfolge ihrer Nucleotid-Bausteine ermittelt) hat. In Zusammenarbeit mit Shosaku Numa und seiner Forschungsgruppe an der Universität Kioto (Japan) verglichen wir normale und genetisch veränderte Acetylcholin-Rezeptoren in Wirtszellen, beispielsweise in Eiern des Krallenfrosches (*Xenopus*). Dazu synthetisierten wir im Reagenzglas zur DNA des Acetylcholin-Rezeptors komplementäre Boten-RNA-Moleküle. Eizellen, denen diese RNA injiziert wurde, übersetzten die Erbinformation in Rezeptorproteine und bauten diese in die Zellmembran ein (Bild 4). Die so entstandenen Rezeptorkanäle unterschieden sich funktionell kaum von den Endplattenkanälen an der neuromuskulären Synapse.

Damit hatten wir ein geeignetes System, an dem wir die Strukturunterschiede zwischen Subtypen des Acetylcholin-Rezeptors untersuchen konnten. Aus elektrophysiologischen Ableitungen wußten wir bereits, daß an den motorischen Endplatten von Säugetieren zwei Subtypen vorkommen: einer mit niedriger Leitfähigkeit, der hauptsächlich bei Feten und Neugeborenen auftritt, und ein hochleitender mit anderen Schalteigenschaften in der Muskulatur von Erwachsenen. Nach der Geburt verschwindet der fetale Typus allmählich und macht dem adulten Platz (Bild 5). Wie Untersuchungen mit rekombinierter DNA belegten, beruht dieser Wechsel darauf, daß sich die Genexpression für die Protein-Untereinheiten umschaltet.

Mit gentechnischen Verfahren wurden auch jene Aminosäuresequenzen im Acetylcholin-Rezeptor lokalisiert, die die Innenwand des Kanals bilden. Eine frühere Analyse hatte vermuten lassen, daß jede Untereinheit des Proteinmoleküls vier die Membran durchquerende Segmente enthält: M1 bis M4. Der Kanal des Acetylcholin-Rezeptors scheint von fünf solchen Segmenten (die wie Faßdauben aneinanderliegen) ausgekleidet zu sein, einem von jeder Untereinheit (Bild 5).

Um herauszufinden, welches Segment das ist und wodurch es sich auszeichnet, schufen wir durch Neukombination der Gene einen Rezeptor, dessen Untereinheiten teils vom Rind und teils vom Zitterrochen stammten; die Acetylcholin-Rezeptorkanäle dieser beiden Tierarten unterscheiden sich in ihren Leitungseigenschaften. Durch Untersuchung der Mischrezeptoren fanden wir heraus, daß das Segment M2 und seine Nachbarregionen für den Ionentransport kritische Komponenten enthalten. Indem wir durch gezielte Mutationen bestimmte Aminosäuren in diesen Bereichen austauschten, konnten wir die kritischen Komponenten im Kanal genauer lokalisieren.

Danach scheinen drei Gruppen negativ geladener Aminosäuren an der inneren und äußeren Öffnung des Kanals jeweils einen Ring zu bilden; ein ähnlicher Ring aus polaren Aminosäuren (sie sind zwar insgesamt elektrisch neutral, enthalten aber positiv und negativ

geladene Pole) findet sich im Kanal nahe der inneren Öffnung. Diese Ringe wirken sich sehr stark auf die Größe des Ionenstroms aus und bestimmen möglicherweise auch, welche Ionenart passieren kann: Man vermag sich gut vorzustellen, wie positiv geladene Natrium- und Kalium-Ionen in den offenen Kanal regelrecht hineingesogen, negativ geladene Chlorid-Ionen dagegen abgestoßen und dadurch ferngehalten werden. Nach unseren Befunden scheint der Ring aus polaren Aminosäuren nahe der inneren Öffnung einen Engpaß zu bilden.

Ganzzell-Ableitung mit Spannungsklemme

Die Patch-Clamp-Technik eignet sich allerdings nicht nur dazu, die molekularen Details der Kanalfunktion aufzuklären; man kann sie auch für eine sogenannte Spannungsklemme verwenden, um Mechanismen der Signalübertragung auf Zellebene zu untersuchen. Das ist bei kleinen Zellen gewöhnlich vorteilhafter, als mit Mikroelektroden zu arbeiten, wie das bei der herkömmlichen Spannungsklemme geschieht.

Die Methode als solche wurde bereits 1949 von Kenneth S. Cole am Meeresbiologischen Institut der Vereinigten Staaten in Woods Hole (Massachusetts) eingeführt und hat ganz entscheidend zum heutigen Verständnis der Signalverarbeitung im Nervensystem beigetragen. Hodgkin und Huxley entschlüsselten damit das grundlegende Prinzip der Nervenregung. In Coles Worten wird bei dem Verfahren „das Axon gezähmt“, indem man ihm ein Transmembranpotential aufzwingt (praktisch aufklemmt). Die resultierenden Membranströme lassen sich registrieren und interpretieren.

Allerdings muß man in der Regel sehr feine Drähte oder mindestens zwei Mikroelektroden in die Zelle einführen, was gewöhnlich nur bei den allergrößten Zellarten von Tieren oder Pflanzen gelingt. Typische Säugetierzellen mit Durchmessern von nur 10 bis 30 Mikrometern (tausendstel Millimetern) beispielsweise überstehen schon das Einstechen mit einer einzigen Standard-Mikroelektrode kaum. Das ist der Grund, weshalb man bis zur Entwicklung der Patch-Clamp-Technik über die Nervenleitung in den Riesenneuronen des Tintenfisches besser Bescheid wußte als über die Erregungsvorgänge im menschlichen Gehirn und im Pflanzenreich die Signalübertragung bei riesenzelligen Algen viel genauer bekannt war als bei Weizen, Mais oder Zuckerrübe.

Mit der neuen Pipette, die ein Membranareal durch perfekte Abdichtung eingrenzt, wurden auch Säugetierneuronen und andere kleine Zellen für Untersuchungen mit der Spannungsklemme zugänglich. Mit etwas Glück kann man nämlich das isolierte Membranstück durch stärkeres Ansaugen platzen lassen, ohne die Dichtung zwischen Pipette und Membran zu beeinträchtigen. Durch das Loch hat man dann direkten Zugang zum Cytoplasma (siehe Bild 2c). Dies entspricht dem Einstich einer Mikroelektrode. Aber diese neue Art der Ganzzell- (oder Einzelzell-)Ableitung wird von viel kleineren Zellen toleriert. Außerdem

läßt sich das intrazelluläre Milieu dabei wesentlich besser kontrollieren.

Für Untersuchungen an Säugetierzellen in Kultur benutzt man inzwischen fast nur noch Ganzzell-Ableitungen mit Patch-Pipetten; sogar menschliche rote Blutkörperchen und Blutplättchen, die nur wenige Mikrometer messen, hat man mit der Methode der Spannungsklemme untersuchen können. Damit wurden die meisten Zelltypen von klinischem Belang einer biophysikalischen Erforschung zugänglich. Zahlreiche Krankheiten haben sich so auf eine fehlerhafte Kanalfunktion zurückführen lassen – beispielsweise die Mukoviszidose, eine

schwere Erbkrankheit, bei der unter anderem die Sekretion der Schleimdrüsen nicht normal funktioniert.

Besonders vorteilhaft war die höhere Genauigkeit von Ganzzell-Ableitungen in der Gehirn- und Rückenmarksforschung. Mit der herkömmlichen Technik ließen sich oft nur isolierte Neuronen untersuchen. Die biologische Bedeutung der dabei gewonnenen Ergebnisse war jedoch begrenzt, weil sich die Zellen nicht in Kontakt mit ihren natürlichen Nachbarn befanden. Außerdem reagieren Ionenkanäle, die an Zellen in Kultur untersucht werden, möglicherweise anders als in intaktem Gewebe. Solche Unsicherheiten sind beim zentralen Nervensystem mit seiner äußerst komplizierten Architektur aus hochspezialisierten und vielfach vernetzten Zellen besonders problematisch.

Darum entwickelten wir ein Verfahren für Ganzzell-Ableitungen an Neuronen, die sich noch in ihrem natürlichen Zellverband befanden. Per Andersen von der Universität Oslo und Tomo Takahashi von der Universität Kioto hatten ausgearbeitet, wie man einen dünnen, in sich unversehrten Hirnschnitt von etwa einem Zentimeter Durchmesser entnehmen kann. Um die Oberfläche der Neuronen von den sie umhüllenden Gliazellen und anderem anhaftenden Gewebe zu befreien, richtet man Nährlösung in feinem Strahl auf das Präparat. Nun kann man die Pipette auf einen nackten Zellkörper aufsetzen und die Membran an dieser Stelle für eine Ganzzell-Ableitung perforieren. Auf diese Weise lassen sich die Membranströme 10- bis 50mal genauer messen, als es mit Einstichelektroden möglich ist (Bild 6).

Neurotransmitter wie Glutamat, welche an der präsynaptischen Membran aus Speicherkompartimenten (Vesikeln) ausgeschüttet werden, erzeugen in nachgeschalteten Neuronen postsynaptische Ströme, die erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) sein können; das heißt, sie erhöhen oder erniedrigen die Wahrscheinlichkeit, daß diese Neuronen ihrerseits Signale aussenden. Bei Ganzzell-Ableitungen fluktuieren die Spitzenamplituden von erregenden wie hemmenden Strömen an den einzelnen Synapsen in charakteristischer Weise von Fall zu Fall. Daraus kann man schließen, daß auch diese Ströme – ähnlich wie die an der motorischen Endplatte – durch Überlagerung nahezu gleichzeitig ablaufender gequantelter Ereignisse (dem Freisetzen von Transmitterpaketen) zustande kommen (Bild 6, rechts unten).

Zu unserer Überraschung fanden wir allerdings, daß pro Transmitterpaket, das

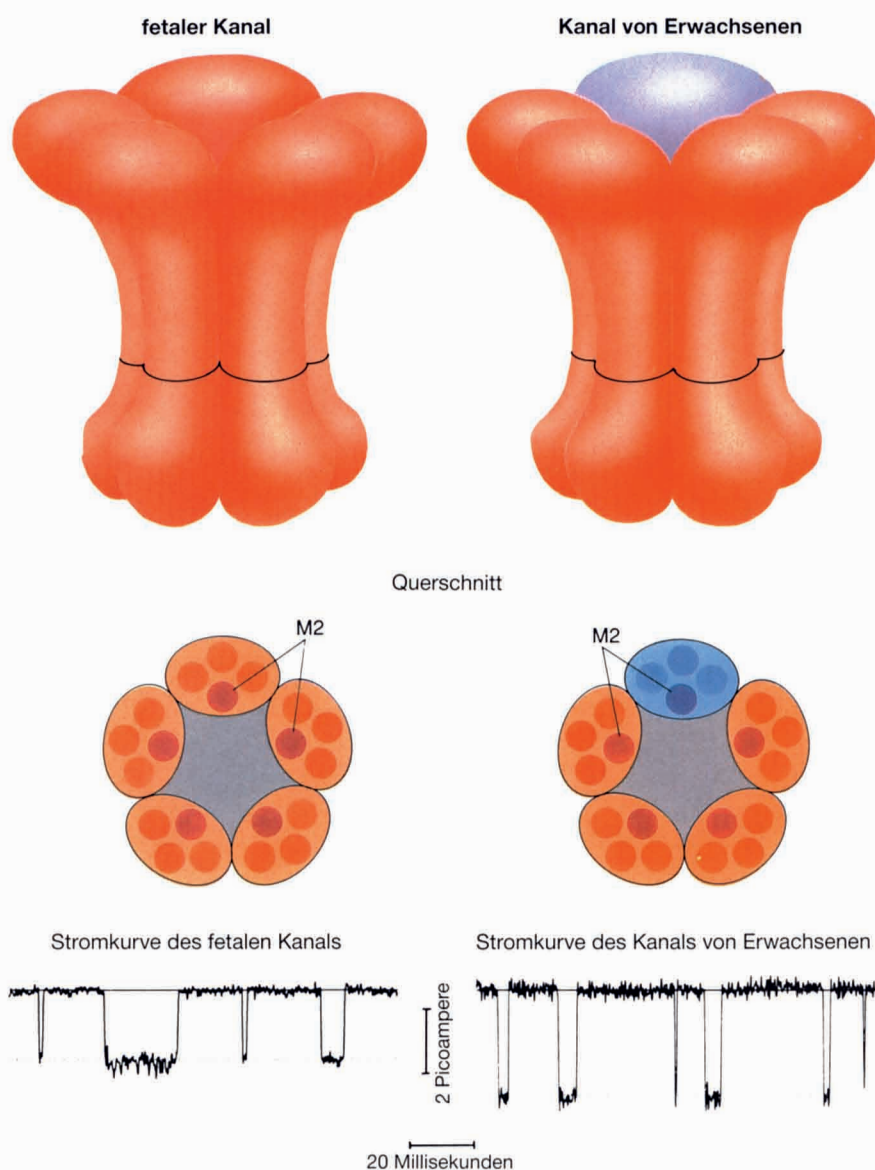


Bild 5: Die Struktur der Acetylcholin-Rezeptorkanäle bedingt unmittelbar ihre Funktion. Jeder Kanal besteht aus fünf molekularen Untereinheiten mit jeweils vier die Membran durchquerenden – M1 bis M4 genannten – Segmenten, von denen die M2-Segmente wie die Dauben eines

Fasses die Innenwand des Kanals auskleiden. Der Rezeptorkanal der motorischen Endplatte von Säugetierfeten unterscheidet sich lediglich in einer Untereinheit, M2, von dem von erwachsenen Individuen. Wegen dieses veränderten Segments fließen kleinere Ströme durch ihn hindurch.

eine präsynaptische Vesikel ausschüttet, sich nur ungefähr 20 bis 30 Rezeptorkanäle öffnen; das sind einige Zehnerpotenzen weniger als an der neuromuskulären Synapse. Vermutlich ermöglicht diese wesentlich schwächere Reaktion im Nervensystem die Feinsteuerung des einzelnen Neurons mittels erregender und hemmender Signale, die ja im Gehirn in großer Zahl auf jede Nervenzelle auftreffen.

Indem wir nun solche elementaren Ereignisse an Neuronenverbindungen im Zentralnervensystem aufzulösen vermögen, haben wir auch die Möglichkeit, zwischen prä- und postsynaptischen Faktoren zu unterscheiden, wenn sich die Effizienz der Signalübertragung an einer Synapse ändert. Solche Änderungen hat man beobachtet, wenn ein Neuron häufig erregt – gleichsam trainiert – wurde. Letztlich könnte ein tieferes Verständnis der synaptischen Effizienz Aufschluß über die Grundlagen von Lernen und Gedächtnis geben (siehe „Gedächtnisspuren in Nervensystemen und künstliche neuronale Netze“ von Daniel L. Alkon, Spektrum der Wissenschaft, September 1989, Seite 66).

Signalübertragungsprozesse innerhalb der Zelle

Ionenkanäle sind lediglich eines von vielen Gliedern im komplexen Netzwerk der Signalübermittlung. Ein anderes bilden die sekundären Botenstoffe, die durch das Cytoplasma diffundieren und dabei Signale von der Zelloberfläche ins Zellinnere weitergeben.

Die Aktivität vieler Kanaltypen, die primär auf externe Transmitter oder Spannungsänderungen an der Zellmembran reagieren, wird von solchen sekundären Botenstoffen beeinflusst oder moduliert. Umgekehrt modifizieren Ionenkanäle auch Funktionen und Konzentrationen der sekundären Botenstoffe. Praktisch alle bekannten solchen Botenstoffe treten mit bestimmten Ionenkanälen in Wechselwirkung, entweder direkt oder über andere Moleküle; das können beispielsweise Kinasen sein (Enzyme, die andere Proteine durch Anfügen von Phosphatgruppen aktivieren) oder sogenannte G-Proteine (sie koppeln Rezeptoren an Enzyme, welche daraufhin ihrerseits die Bildung sekundärer Botenstoffe katalysieren).

So wird ein großer Teil der neuronalen Kalium-Ionenkanäle sowohl von der Membranspannung als auch von der Konzentration an freien Calcium-Ionen in der Zelle beeinflusst. Ist diese niedrig, bleiben die Kanäle geschlossen, es sei denn, die Depolarisation (Veränderung der Membranspannung) ist sehr groß. Bei hoher Konzentration dagegen beginnen sie sich schon bei schwacher Depolarisation oder sogar beim Ruhepotential zu öffnen.

Die Kanäle, die den Einstrom von Calcium in die Zelle regulieren, werden selbst durch die Konzentration freier Calcium-Ionen im Cytoplasma gesteuert. Normalerweise öffnen sie sich bei Depolarisation; aber einige Typen werden durch das einströmende Calcium inaktiviert. Dies läßt sich als negative Rückkopplung ansehen, die den Calciumspiegel in der Zelle und damit die Menge eines der wichtigsten, an vielen Zellprozessen beteiligten sekundären Botenstoffs reguliert.

Daß ein dermaßen kompliziertes Regelsystem mit Rückkopplungsschleifen und Synergismen sich nicht einfach durchschauen ließ, kann nicht verwun-

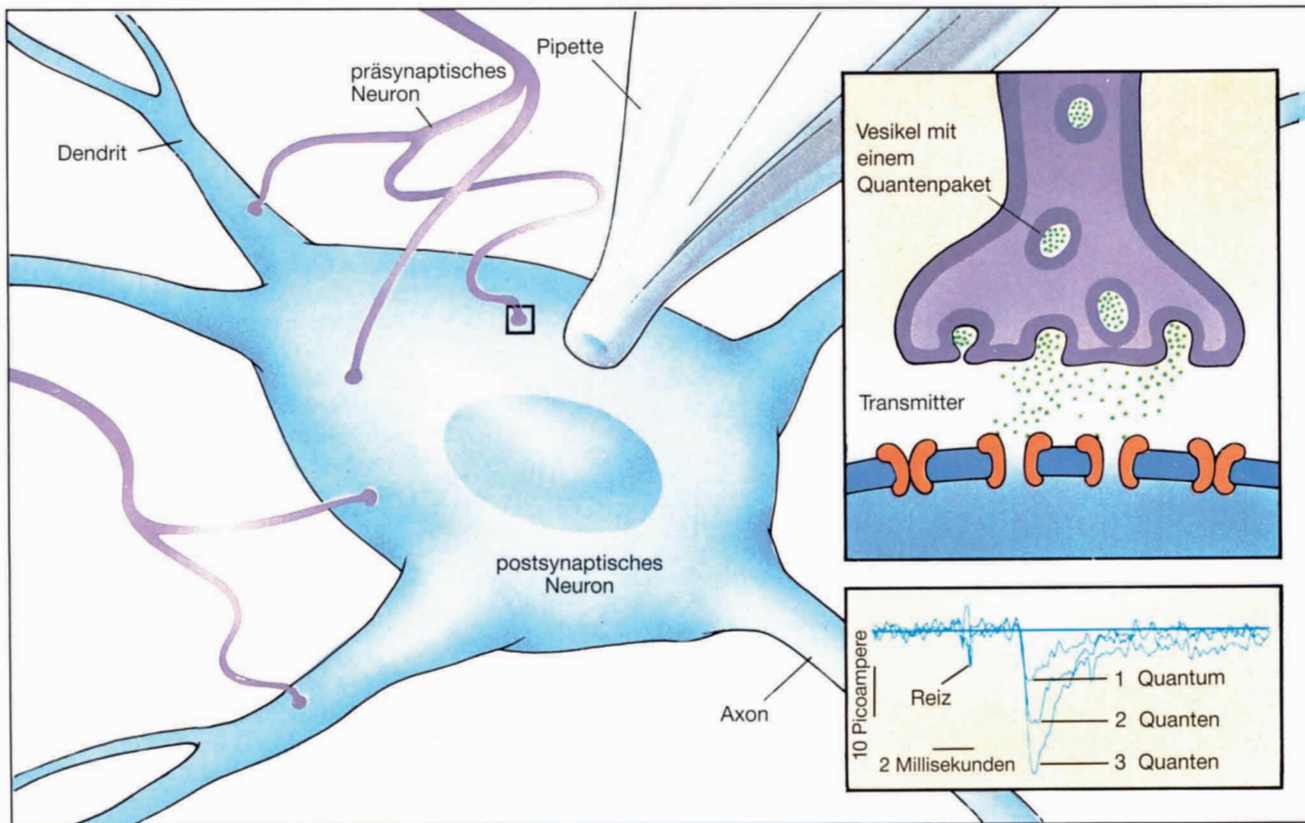


Bild 6: Die Ganzzell-Ableitung, bei der man statt der herkömmlichen Mikroelektrode eine Patch-Pipette verwendet, hat auch das Studium von den sehr kleinen Säugerzellen und insbesondere von Neuronen revolutioniert. Man kann damit beispielsweise dünne Hirnschnitte untersuchen, deren Zellen noch Kontakt zu ihren Nachbarn haben. Das Patch-Clamp-Verfahren ist so empfindlich,

daß sich damit selbst die quantalen erregenden oder hemmenden Ströme in einer Nervenzelle messen lassen, die ein einzelnes Transmitterpaket oder -quantum auslöst, das von einer präsynaptischen Vesikel ausgeschüttet wurde (rechts unten). Die dargestellten Stromkurven hat Peter Stern am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg aufgezeichnet.

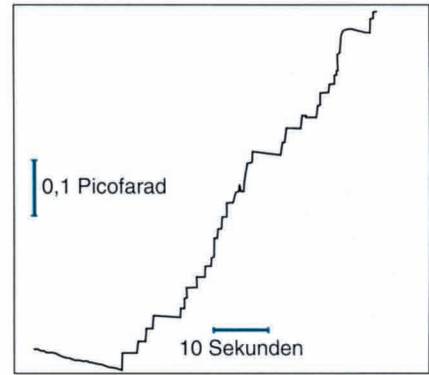
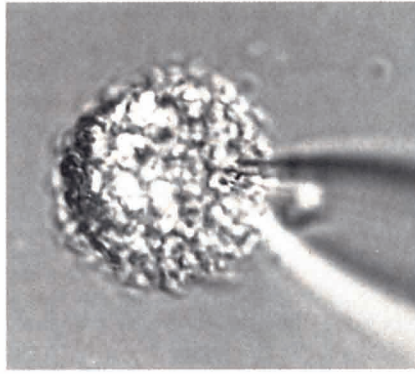
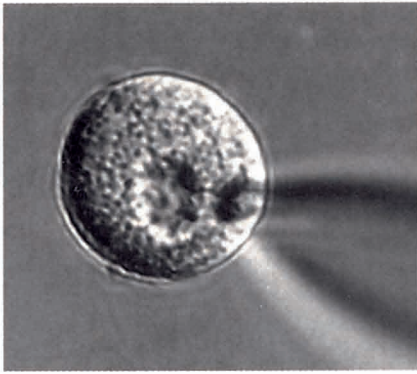


Bild 7: Die Mastzellen des Immunsystems setzen bei Reizung Histamin und andere an Entzündungsreaktionen beteiligte Substanzen frei. Auf Photographien von Julio M. Fernandez ist hier eine solche Zelle vor (links) und nach (Mitte) einem Stimulus gezeigt, der mittels einer Patch-Pipette gegeben wurde. Bei der

Sekretion verschmelzen die histaminhaltigen Vesikel mit der Zellmembran, wodurch sich diese vergrößert. Die resultierende Zunahme der Membrankapazität läßt sich mit der Patch-Clamp-Technik registrieren. In einer entsprechenden Aufzeichnung von Wolf Almers (rechts) erscheint jede Vesikel-Fusion als Stufe.

dern. Um die einzelnen Komponenten des Netzwerks und ihre jeweiligen Wechselwirkungen zu finden, genügte es nicht, die elektrische Aktivität der Zelle auf eine Reizung hin zu messen; man mußte zugleich einige Regelgrößen in der Zelle unter Kontrolle halten. Die Ganzzell-Ableitung bot diese Kontrollmöglichkeit, indem sie dem Experimentator gestattete, die Zusammensetzung des Zellinhalts nach Wunsch zu manipulieren - als Folge der Tatsache, daß durch die relativ große Öffnung in der Zellaußenhaut Moleküle ziemlich schnell hindurchdiffundieren können. Das schuf anfangs Probleme, weil subtile Steuerungsmechanismen sozusagen einfach verschwanden: Viele der Regulatormoleküle in der Zelle lösten sich im relativ zur Zelle fast unendlichen Volumen der Pipette sehr bald in nichts auf. Nur unkomplizierte Kanäle blieben dabei intakt.

Im Laufe etlicher Jahre fand man schrittweise heraus, welche Substanzen in welcher Konzentration in der Pipette vorliegen müssen, damit die verschiedenen Kanaltypen auch bei Langzeitmessungen noch normal funktionieren. So wurde nach und nach das komplexe Wechselspiel zwischen Rezeptoren, sekundären Botenstoffen und Ionenkanälen sichtbar, was es ermöglichte, einige der verschlungenen Pfade der Signalübermittlung aufzuklären.

Schlüsselmolekül Calcium

Wenn Ionenkanäle Nachrichten an Zellen übermitteln, ändert sich oft der intrazelluläre Calciumspiegel (vergleiche „Der Membrankreislauf von Calcium als intrazelluläres Signal“ von Howard Rasmussen, Spektrum der Wissenschaft, Dezember 1989, Seite 128). Das

gilt für die Reizleitung in Nervenzellen, für Muskelkontraktionen und auch für sekretorische Aktivität - also etwa, wenn Zellen Hormone abgeben oder an der Synapse Transmitter ausschütten. Uns interessierte, wie das Calciumsignal weitergegeben wird, um schließlich Reaktionen in der Zelle auszulösen; dabei konzentrierten wir uns auf die Rolle von Calcium bei der Sekretion.

Am liebsten würde man bei solchen Studien an derselben Zelle gleichzeitig die Ionenströme, das Calciumsignal und die Sekretion messen. Wir kamen diesem Ideal immerhin nahe, indem wir die Ganzzell-Ableitung mit einer Methode zur Calciummessung kombinierten, die Roger Y. Tsien während eines Aufenthalts an der Universität von Kalifornien in Berkeley entwickelt hatte: Man bringt den Farbstoff Fura-2 in die Zelle ein, der Calcium-Ionen an sich bindet und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. So läßt sich auf die Konzentration des freien Calciums zurückschließen.

Sekretorische Zellen scheiden ihre Substanzen durch Exocytose aus: Kleine Membranvesikel, die das Sekret enthalten, wandern an die Oberfläche, verschmelzen dort mit der Zellmembran und schütten dabei ihren Inhalt aus. Dadurch wird die Zellmembran etwas größer, weil sich die Vesikelmembran in die Außenmembran inkorporiert. Das wiederum schlägt sich in der elektrischen Kapazität nieder, die proportional zur Membranfläche ist. Dies läßt sich so genau messen und zeitlich auflösen, daß man selbst den Einbau einer einzigen Vesikel aufzeichnen kann (Bild 7 rechts). Bei vielen Zelltypen kann man auf diese Weise die Sekretionsaktivität bestimmen und zum intrazellulären Calciumspiegel sowie zu elektrophysiologischen Vorgängen an der Zellmembran in Beziehung setzen.

Wir untersuchten (wegen ihrer Färbbarkeit so genannte) chromaffine Zellen der Nebennieren, die bei Streß die Hormone Adrenalin und Noradrenalin ausscheiden (siehe „Die chromaffinen Zellen der Nebenniere“ von Stephen W. Carmichael und Hans Winkler, Spektrum der Wissenschaft, Oktober 1985, Seite 70). In früheren Untersuchungen hatten wir gefunden, daß chromaffine Zellen spannungsabhängige Calciumkanäle haben - sehr ähnlich denen von Nervenzellen. Stimuliert man diese Zellen elektrisch oder mit Acetylcholin, öffnen sich diese Kanäle, und die intrazelluläre Calciumkonzentration nimmt zu, was sich leicht mit der Fura-2-Fluoreszenz messen läßt. Außerdem steigt die Kapazität der Plasmamembran, was auf Exocytose hindeutet.

Enthält die Pipette eine calciumbindende Substanz (einen Chelat-Bildner), wird der Anstieg der Calciumkonzentration wie auch der Membrankapazität unterdrückt. Andererseits steigt bei Anwesenheit von Calcium in der Pipette nicht nur der intrazelluläre Calciumspiegel, sondern auch die Kapazität. Nach alledem dürfte die Sekretion von chromaffinen Zellen nach den gleichen Prinzipien erfolgen, wie Katz und Miledi sie für die Ausschüttung von Acetylcholin am neuromuskulären Spalt gefunden haben. Auch dort sowie in vielen anderen elektrisch erregbaren Zelltypen spielt das Calcium eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung des Transmitters.

Überraschend war dann, was wir über den Zusammenhang zwischen Calcium und sekretorischer Aktivität bei nicht elektrisch erregbaren sekretorischen Zellen herausfanden. Wir hatten Mastzellen gewählt, die im Bindegewebe vorkommen und bei der Immunabwehr eine Rolle spielen. Bei Reizung mit Hormonen oder Antigenen (Molekülen aus

fremden Organismen) sezernieren sie Histamin und andere Stoffe, die Entzündungs- und Immunreaktionen hervorrufen. Mastzellen boten sich für unsere Studien an, weil sie vollgepackt sind mit großen sekretorischen Bläschen und auf Reizung mit massiver Exocytose reagieren: Binnen 10 bis 20 Sekunden wächst ihre Oberfläche dann im Normalfall um das Zwei- bis Vierfache an (Bild 7 links und Mitte).

Während der Degranulation, also während die Zelle ihre Vesikel nach außen entleert, steigt die Kapazität der Außenmembran in Stufen an, wobei jede Stufe die Verschmelzung eines weiteren Vesikels mit der Zellmembran anzeigt (Bild 7 rechts). Allerdings ist die Höhe der Stufen nicht einheitlich, sondern streut um einen Mittelwert; darin kommt die unterschiedliche Größe der Vesikel zum Ausdruck.

Die Überraschung bei unseren Untersuchungen an Mastzellen war, daß sie – im Gegensatz zu den elektrisch erregbaren Zellen – durch Anheben des Calciumspiegels nicht zur Sekretion veranlaßt wurden. Eine Zeitlang schrieben wir dieses negative Resultat dem Sich-Auflösen irgendeines wesentlichen Stoffes in der Pipette zu. Später aber erkannten wir, daß Mastzellen einfach andere Stimuli brauchen: Bestimmte Hormone und Antigene bewirken, extrazellulär verabreicht, eine massive Sekretion ohne die Zwischenschaltung des Botenstoffs Calcium.

Trotzdem erzeugten diese Stimuli ausnahmslos ein deutliches intrazelluläres Calciumsignal: Die Konzentration an freiem Calcium im Cytoplasma stieg kurzfristig um mehr als das Zehnfache, bevor die Sekretion einsetzte. Verursacht wurde diese vorübergehende Calciumwooge vor allem durch Freisetzung von Calcium-Ionen, die in Zellorganellen gespeichert sind. Auch von außen strömte das Element in meßbaren Mengen durch spannungsunabhängige Kanäle ein, doch war dies für die sekretorische Reaktion der Zelle kaum von Bedeutung. Sogar wenn man den Calciumspiegel in der Zelle durch einen Chelatbildner in der Pipette künstlich niedrig hielt, entleerten sich bei Reizung sämtliche Vesikel.

Calcium hat dennoch Einfluß auf die sekretorische Antwort von Mastzellen. In sehr hohen Konzentrationen bewirkt es sehr wohl eine Sekretion, allerdings mit gewisser Verzögerung. Zudem machen hormonelle oder andere Stimuli die Zellen für Calcium empfindlicher, indem sie diese Wirkungsschwelle reduzieren: Eine bereits angelaufene Degranulation beschleunigt sich, wenn man währenddessen den Calciumspiegel erhöht. Cal-

cium ist also vermutlich durchaus ein Regulator für die Sekretion in Mastzellen, aber eben nur einer von mehreren, der außerdem vor allem im Zusammenspiel mit anderen Einflüssen zur Geltung kommt.

Viele neuere Befunde sprechen dafür, daß die Sekretion durch ein Netzwerk miteinander verknüpfter Signalwege kontrolliert wird – ganz ähnlich dem, welches das Verhalten von Ionenkanälen moduliert. Die Bestandteile des Netzwerks scheinen in beiden Systemen die gleichen zu sein: Calcium als Hauptakteur (besonders in Neuronen und einigen anderen Zelltypen) sowie alle anderen sekundären Botenstoffe, Kinasen und wahrscheinlich G-Proteine. Ihr Zusammenspiel beginnt sich erst allmählich abzuzeichnen, während die Umrisse des Netzwerks, das die Ionenkanäle reguliert, inzwischen mehr oder weniger klar herausgearbeitet sind – größtenteils mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dank der extrem hohen Empfindlichkeit dieser Technik die Funktion von Zellmembran-Kanälen bis in die molekularen Details hinein aufgedeckt werden konnte. Dabei hat das Verfahren auch die winzigen Säugetierzellen der Untersuchung zugänglich gemacht und es ermöglicht, durch Manipulation ihres zellulären Milieus die Wege und Mechanismen ihrer Kommunikation aufzuspüren. Zu dieser Leistungsfähigkeit kommt die verblüffende Einfachheit der Patch-Clamp-Technik. Wir hoffen und erwarten, daß sie in dem Maße, wie sich mehr Forscher ihrer bedienen, weiter dazu beiträgt, die Geheimnisse der Zelle zu enträtseln.

Erwin Neher und **Bert Sakmann** erhielten 1991 für ihre Arbeiten zur Funktion von Ionenkanälen mit der von ihnen entwickelten Patch-Clamp-Technik den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Neher ist Direktor der Abteilung für Membranbiophysik am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Nachdem er 1965 an der Technischen Universität München das Vordiplom in Physik erworben hatte, ging er als Fulbright-Stipendiat an die Universität von Wisconsin in Madison, wo er 1967 den Masters Degree erhielt. Anschließend kehrte er an die Technische Universität in München zurück und promovierte dort 1970. Er war Gastwissenschaftler an der Yale-Universität in New Haven (Connecticut) und am California Institute of Technology in Pasadena und ist korrespondierendes Mitglied

der Bayerischen Akademie der Wissenschaften und auswärtiges Mitglied der Nationalen Akademie der Wissenschaften der Vereinigten Staaten. Sakmann ist Direktor der Abteilung für Zellphysiologie am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg. Er hat 1969 an der Universität München das medizinische Staatsexamen abgelegt und von 1970 bis 1973 mit einem Stipendium des britischen Forschungsrates am University College in London bei dem Nobelpreisträger Bernard Katz Biophysik studiert. Bevor er 1989 nach Heidelberg ging, war er am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen tätig, wo er 1974 promovierte.

Literaturhinweise

Gehirn und Nervensystem. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg 1987.

Molekularbiologie der Zelle. Herausgegeben von Bruce Alberts und anderen. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1990.

Biochemie. Von Lubert Stryer. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg 1990.

Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres. Von E. Neher und B. Sakmann in: Nature, Band 260, Heft 5554, Seiten 799 bis 802, 29. April 1976.

Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. Von O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth in: Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, Band 391, Heft 2, Seiten 85 bis 100, August 1981.

The Patch-Clamp Technique in the Study of Secretion. Von Reinhold Penner und Erwin Neher in: Trends in Neurosciences, Band 12, Heft 4, Seiten 159 bis 163, April 1989.

A Thin Slice Preparation for Patch Clamp Recordings from Neurons of the Mammalian Central Nervous System. Von F. A. Edwards, A. Konnerth, B. Sakmann, T. Takahashi in: Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, Band 414, Heft 5, Seiten 600 bis 612, September (I) 1989.

The Structure of Ion Channels in Membranes of Excitable Cells. Von Nigel Unwin in: Neuron, Band 3, Heft 6, Seiten 665 bis 676, Dezember 1989.

Structure-Function Studies of Voltage-Gated Ion Channels. Von W. Stühmer in: Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, Band 20, Seiten 65 bis 78, 1991.