

Ionenkanäle für die inter- und intrazelluläre Kommunikation (Nobel-Vortrag)**

Von Erwin Neher*

Um 1970 waren die fundamentalen Signalmechanismen für die Kommunikation zwischen Zellen des Nervensystems bekannt. Hodgkin und Huxley^[1] hatten bereits 1952 die Grundlagen für das Verständnis des Nervenaktionspotentials aufgeklärt. Das Konzept der chemischen Übertragung an Synapsen hatte seine experimentelle Bestätigung durch detaillierte Untersuchungen über exzitatorische und inhibitorische postsynaptische Potentiale gefunden (siehe B. Katz^[2] für eine knappe Beschreibung der elektrischen Signale in Nerv und Muskel). Die Frage nach den molekularen Mechanismen, die diesen Signalen zugrundeliegen, war jedoch noch offen. Hodgkin und Huxley^[1] benutzten das Konzept von spannungsaktivierten „Schleusen“ für eine formale Beschreibung der Leitfähigkeitsänderungen, und gegen 1970 wurden die Begriffe Na-Kanal und K-Kanal häufig benutzt (siehe Übersicht von Hille^[3]), obwohl es keinen direkten Nachweis für die Existenz von Kanälen in biologischen Präparaten gab. Dies war anders im Falle von künstlichen Membranen. Müller und Rudin^[4] führten „schwarze“ Membranen als experimentelles Modellsystem ein, welches in vielerlei Hinsicht den bimolekularen Lipidmembranen lebender Zellen ähnelt. Diese Membranen sind recht gute Isolatoren. Werden sie jedoch mit bestimmten Antibiotica oder Proteinen versetzt, so werden sie elektrisch leitend. R. C. Bean et al.^[5] und Hladky und Haydon^[6] zeigten, daß einige dieser Stoffe diskrete, stufenförmige Änderungen der Leitfähigkeit verursachen, wenn man Spuren von ihnen hinzugibt. Alle Evidenzen wiesen darauf hin, daß die beobachteten Leitfähigkeitsänderungen auf den Einbau einzelner, porenanähnlicher Strukturen in die Membran zurückzuführen sind.

Damals waren ähnliche Messungen an biologischen Präparaten nicht möglich, da die verfügbaren Methoden zur Stromregistrierung in lebenden Zellen einen Rauschpegel hatten, der um den Faktor hundert höher war als die in Doppelipidmembranen beobachteten Einzelkanalströme (siehe Abb. 1). Indirekte Methoden hatten jedoch starke Hinweise darauf gegeben, daß Kanäle mit ähnlichen Leitfähigkeiten wie in künstlichen Membranen auch in Nerven- und Muskelzellen enthalten sein sollten. Anfängliche Versuche, die Zahl der Na-Kanäle durch Bindungsstudien mit Tetrodotoxin zu bestimmen, ergaben, daß der Beitrag eines einzelnen Kanals zur Na-Leitfähigkeit bis zu 500 pS sein könnte. Später erbrachte die Technik der Rauschanalyse^[7, 8] genauere Zahlen. Anderson und Stevens^[9] schätzten den Beitrag zur Leitfähigkeit einzelner Acetylcholin-aktivierter Kanäle (ACh-Kanäle) an der neuromuskulären Synapse des Frosches auf 32 pS. Dieser Wert stimmt nahezu mit dem von Hladky und Haydon^[6] gemessenen Wert an Gramicidin-Einzelkanälen überein. Es war daher naheliegend, über bessere Methoden zur Strommessung an biologischen Präpara-

ten nachzudenken: Es gab gute Gründe zu hoffen, daß eine verbesserte Meßtechnik einen ganzen „Mikrokosmos“ von elektrischen Signalen in einer Vielzahl elektrisch und chemisch erregbarer Zelltypen enthüllen würde. In dieser Vorlesung werde ich einen kurzen Abriß über unsere gemeinsamen Anstrengungen geben, dieses Problem zu lösen. Des weiteren

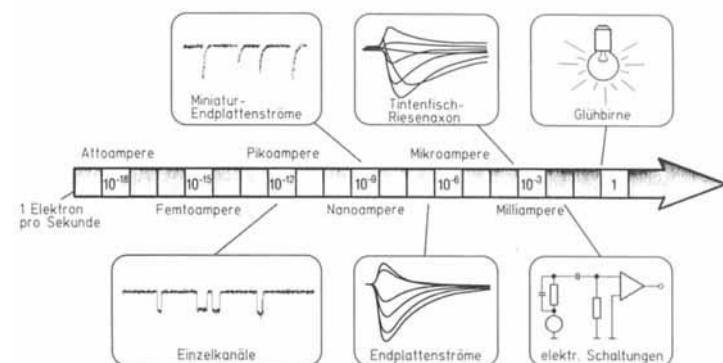


Abb. 1. Graphische Repräsentation der Größe „Strom“ auf logarithmischer Skala mit Beispielen von Stromsignalen oder stromführenden Elementen aus Elektrotechnik und Biologie. Der grau unterlegte Bereich ist derjenige, der durch Hintergrundrauschen überdeckt war, bevor die Patch-Clamp-Technik entwickelt wurde.

werde ich auf Entwicklungen eingehen, die der Lösung dieses meßtechnischen Problems folgten. Bert Sakmann wird in der zweiten Vorlesung^[10] einige der detaillierten Erkenntnisse, die die hochauflösende Strommessung erbracht hat, darlegen.

Überlegungen zum Einsatz von „Patch-Pipetten“

Die grundlegende Limitierung für jegliche Strommessung, abgesehen vom Instrumentrauschen, ist das „Johnson“ oder thermische Rauschen einer Signalquelle, welches für einen Widerstand gegeben ist durch

$$\sigma_n = \sqrt{4kT\Delta f/R}$$

wobei σ_n den Effektivwert des Stromrauschens, k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, Δf die Bandbreite der Messung und R den Widerstand bedeutet. Hieraus wird deutlich, daß der Innenwiderstand einer Signalquelle (oder allgemeiner, die komplexe Impedanz) für eine rauscharme Strommessung sehr hoch sein sollte. Genauer gesagt: Zur Messung eines Stroms von 1 pA bei einer Bandbreite von 1 kHz mit der Genaugkeit von 10 % sollte der Innenwiderstand der Signalquelle etwa 2 GΩ oder höher sein. Heute wissen wir, daß die Eingangswiderstände kleiner Zellen so hoch sein können. Aber Anfang der siebziger Jahre erforderten die konventionellen Techniken mit Mikroelektroden große Zellen für Strommessungen, und diese hatten typischerweise Eingangswiderstände im Bereich 100 kΩ bis

[*] Prof. Dr. E. Neher
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Postfach 2841, W-3400 Göttingen

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1992. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

50 MΩ. Daher schien es unmöglich, die benötigte Auflösung mit Standardtechniken und Standardpräparaten zu erreichen. Was benötigt wurde, war eine kleinere Signalquelle.

Mit diesen Überlegungen richteten wir unsere Anstrengungen darauf, einen kleinen Membranfleckens zum Zwecke der elektrischen Messung zu isolieren. Ich hatte im Labor von H. D. Lux in München, wo ich meine Dissertation anfertigte, Erfahrungen mit Saugpipetten gewonnen, die wir zur lokalen Strommessung auf die Oberfläche von Zellen plazierten. Derartige Pipetten („Patch-Pipetten“) wurden vordem in unterschiedlichen Zusammenhängen eingesetzt, so zur Stimulation von Zellen oder für Strommessungen^[11–15]. Es war uns klar, daß sie hervorragende Werkzeuge für Einzelkanalmessungen sein würden, wenn es gelänge, eine genügend gute Abdichtung zwischen Pipette und Membran herzustellen. Die Impedanz des Membranfleckens selbst sollte höher als erforderlich sein, sogar für einen Membranfleckens von 10 µm Durchmesser. Eine unvollständige Abdichtung dagegen wird vom Meßverstärker parallel zum Membranfleckens registriert, und ihr Rauschen ist dem Signal des Membranfleckens überlagert.

Frühe Einzelkanalmessungen

Als Bert Sakmann und ich unsere Messungen begannen, indem wir Pipetten auf die Oberfläche denervierter Muskelfasern setzten, bemerkten wir bald, daß es nicht so einfach war, einen zufriedenstellenden Abdichtwiderstand zu erzielen. Obwohl Bert Sakmann durch seine Arbeit in B. Katz' Labor reiche Erfahrung in der enzymatischen Behandlung von Zelloberflächen gesammelt hatte, und obwohl die Arbeiten von Katz und Miledi^[17] und unsere Messungen unter Spannungsklemme gezeigt hatten, daß denervierte Muskelfasern eine geeignete, diffus verteilte Ansammlung von ACh-Kanälen enthalten sollten, waren unsere anfänglichen Bemühungen erfolglos. Unsere Abdichtwiderstände betrugen gerade 10–20 MΩ, d. h. sie waren zwei Größenordnungen niedriger als erwünscht. Dennoch erreichten wir durch Reduzierung der Pipettengröße und Optimierung ihrer Form langsam den Punkt, wo Signale vor dem Rausch-Hintergrund auftauchten – zunächst charakteristische Fluktuationen, später dann „Blips“, die den erwarteten Rechteckpulsen ähnlich sahen. 1976 publizierten wir Ableitungen^[16], die mit gutem Gewissen als Signale von Einzelkanälen interpretiert werden konnten (siehe Abb. 2). Die Tatsache, daß ähnliche Registrierungen sowohl in unserem Göttinger Labor als auch im Labor von Charles F. Stevens in Yale (wo ich einen

Teil von 1975 und 1976 verbrachte) gemacht werden konnten, gab uns die Zuversicht, daß sie nicht das Werk irgend eines lokalen Dämons waren, sondern vielmehr Signale mit biologischer Bedeutung. Die rechteckförmige Natur der Signale war der Beweis für die Hypothese, daß sich Kanäle in biologischen Membranen stochastisch in einem „Alles-oder-Nichts“-Prozess öffnen und schließen. Zum ersten Mal konnte man Konformationsänderungen biologischer Makromoleküle *in situ* und in Echtzeit beobachten. Dennoch gab es zuviel Hintergrundrauschen, was kleine und kürzerlebige Beiträge anderer Kanaltypen überdeckte. Darüber hinaus wiesen die Amplituden der Einzelkanalereignisse eine weite Streuung auf, da die Mehrzahl der Kanäle unter dem Rand der Pipette lagen und somit ihre Strombeiträge nur teilweise registriert wurden.

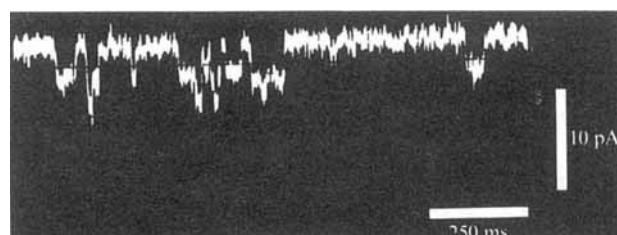


Abb. 2. Frühe Einzelkanalströme, abgeleitet am denervierten Muskel (*cutaneus pectoris*) des Frosches (*Rana pipiens*). Die Pipette enthielt 0.2 µM Suberoyldicholin, ein Analogon des Acetylcholins, das sehr langlebige Kanalöffnungen auslöst. Das Membranpotential betrug –120 mV, die Temperatur 8 °C (aus [16]).

Wir unternahmen viele systematische Versuche, das Abdichtproblem zu überwinden (Manipulieren und Säubern von Zelloberflächen, Beschichten der Pipettenoberfläche, Umkehrung der Ladung von Glasoberflächen, etc.) – mit wenig Erfolg. Dennoch konnten in den Jahren 1975 bis 1980 wichtige Eigenschaften von Einzelkanälen aufgeklärt werden^[17–21].

Etwa 1980 hatten wir unsere Bemühungen um eine Verbesserung des Kontaktes schon fast aufgegeben, als wir durch Zufall beobachteten, daß der Abdichtwiderstand plötzlich um zwei Größenordnungen anstieg, als leichter Unterdruck auf die Pipette gegeben wurde. Der resultierende Abdichtwiderstand war im Bereich von Gigaohm, das sogenannte „Gigaseal“. Es stellte sich heraus, daß ein Gigaseal reproduzierbar erzielt werden konnte, wenn Unterdruck angelegt und gleichzeitig einige einfache Maßnahmen getroffen wurden, um saubere Glasoberflächen zu gewährleisten, z.B. das



Erwin Neher, geboren am 20. März 1944 in Landsberg/Lech, studierte Physik an der Technischen Universität München (TUM) und an der University of Wisconsin. 1970 promovierte er bei H. D. Lux am Max-Planck-Institut (MPI) für Psychiatrie und an der TUM. Nach drei Jahren als Wissenschaftlicher Assistent am MPI für Psychiatrie ging er 1973 ans MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen. 1980 habilitierte er sich am Fachbereich Physik der Universität Göttingen, und seit April 1983 ist er Direktor am MPI für biophysikalische Chemie. Zu seinen vielen Auszeichnungen gehören der Nernst-Haber-Bodenstein-Preis der Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie 1977, der Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Preis der Deutschen Forschungsgemeinschaft 1986 und der Nobel-Preis für Medizin und Physiologie 1991. Er ist unter anderem Mitglied der National Academy of Sciences der USA und der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen.

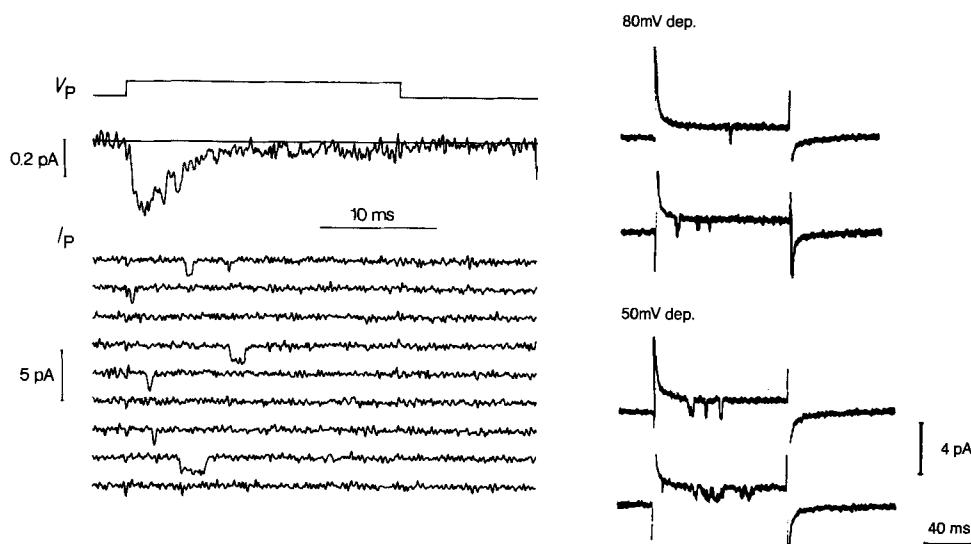


Abb. 3. Frühe Ableitungen von spannungsaktivierten Einzelkanälen. Die linke Seite zeigt Na^+ -Kanäle (abgeändert aus [22]). Die oberste Spur beschreibt das Spannungsprotokoll. Die zweite Spur zeigt die über 300 depolarisierende Spannungspulse gemittelte Antwort; die folgenden Spuren sind Beispiele für individuelle Antworten. Man sieht in einigen Spuren – jedoch nicht allen – einzelne Öffnungen (Auslenkung nach unten) von Na^+ -Kanälen. Der Membranfleck wurde gegenüber dem Ruhepotential um 30 mV hyperpolarisiert und mit depolarisierenden Pulsen von 40 mV stimuliert. Die rechte Seite zeigt einzelne Ca^+ -Kanalströme (abgeändert aus [23]). Wie angegeben wurden depolarisierende Pulse (dep.) ausgehend vom Ruhepotential appliziert. Die Pipette enthielt isotone Ba-Lösung. Einzelkanalöffnungen sind den verbleibenden Kapazitäts- und Leckartefakten überlagert. In der linken Spalte sind diese Artefakte digital subtrahiert worden.

Benutzen einer frischen Pipette für jedes Experiment und der Einsatz filtrierter Lösungen. Die verbesserte Abdichtung ermöglichte ein wesentlich niedrigeres Hintergrundrauschen^[26]. Glücklicherweise war gerade zu diesem Zeitpunkt Fred Sigworth zu uns gestoßen. Mit seiner Ingenieurserfahrung verbesserte er die elektronischen Meßverstärker so, daß sie mit den gewachsenen Anforderungen durch die Fortschritte in der Ableittechnik Schritt hielten (Abb. 3). So konnten rasch mehrere Typen von Ionenkanälen mit guter Amplituden- und Zeitauflösung charakterisiert werden.

„Whole-cell“-Ableitungen sind konventionellen Ableitungen mit eingestochenen Mikroelektroden recht ähnlich, weisen jedoch einige wichtige Unterschiede auf:

1. Das Leck zwischen dem Zellinneren und dem Bad ist extrem klein, so daß diese Form der Penetration selbst von so kleinen Zellen wie roten Blutkörperchen toleriert wird^[27].
2. Der elektrische Zugangswiderstand ist niedrig (1–10 MΩ) im Vergleich zu dem von Einstich-Mikroelektroden (typischerweise 20–100 MΩ für kleine Zellen). Daher können Spannungsklemmbedingungen leicht und ohne Rückkopplungsschaltkreise oder zusätzliche Elektroden erzielt

Unerwartete experimentelle Möglichkeiten

Die gelungene Abdichtung verbesserte die elektrische Messung und erwies sich darüber hinaus als nützliches Werkzeug zur Manipulation von Membranflecken und kleinen Zellen. Obwohl die physikalische Natur des „Gigaseal“ noch ungeklärt ist, bemerkten wir umgehend, daß es nicht nur eine elektrische Abgrenzung, sondern auch eine stabile mechanische Verbindung zwischen der Meßpipette und der Membran gewährleistet. Owen Hamill und Bert Sakmann^[24] fanden etwa gleichzeitig mit Horn und Patlak^[25], daß Membranflecken durch einfaches Zurückziehen der Pipette aus Zellen herausgelöst werden konnten. Dies ergibt „excised patches“, die für Lösungsaustausch auf beiden Seiten zugänglich sind. Alternativ kann der Membranfleck durch einen kurzen Saugstoß oder einen Spannungspuls zerstört werden, ohne daß der Abdichtwiderstand zwischen Glas und Membran verloren geht. Es bildet sich eine elektrische Verbindung zwischen der Meßpipette und der Zelle, wobei die Pipetten-Zell-Kombination gut gegen die umgebende Badlösung isoliert ist. Diese Konfiguration wurde „whole-cell“ genannt. Abbildung 4 zeigt schematisch die Prozeduren und die sich ergebenden „Patch-Clamp“-Konfigurationen.

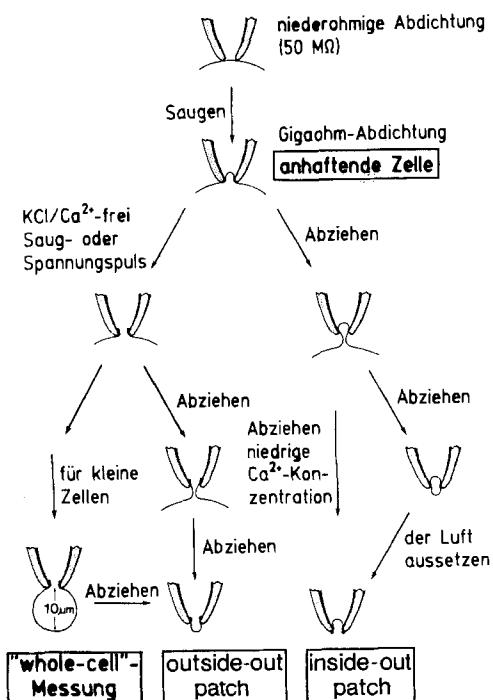


Abb. 4. Schematische Darstellung der Prozeduren, die zu den verschiedenen „Patch-Clamp“-Konfigurationen führen (aus [26]).

werden, vorausgesetzt man verwendet kleine Zellen (Membranwiderstände von $100\text{ M}\Omega$ bis $10\text{ G}\Omega$).

3. Es findet ein rascher Diffusionsaustausch zwischen Patch-Pipette und Zelle statt^[28, 29]. Dadurch kann man die Zusammensetzung des Milieus im Inneren der Zelle beeinflussen. Eine Zelle kann leicht mit Ionen, Chelatbildnern, sekundären Botenstoffen, Fluoreszenzfarbstoffen, etc. beladen werden, indem man diese Substanzen einfach in die Meßpipette gibt. Andererseits bewirkt dieser Austausch aber auch, daß das natürliche interne Milieu gestört wird und daß Signalkaskaden unterbrochen werden können (siehe unten).

Mit diesen Eigenschaften entwickelte sich die „whole-cell“-Ableitung zur Methode der Wahl für die meisten Messungen an Zellkulturen und akut dissozierten Geweben. Viele Zelltypen, besonders kleine Säugerzellen, wurden erst durch „whole-cell“-Ableitungen einer biophysikalischen Analyse zugänglich, da sie Einstiche mit konventionellen Mikroelektroden nicht tolerieren. Individuelle Ionenströme konnten durch die Vorgabe der Lösungszusammensetzung auf beiden Seiten der Membran separiert werden^[30] (siehe Abb. 5 als Beispiel für „whole-cell“-Calciumströme). Diese

1991 enthielt zehn Studien an Sägerzellen unter Spannungsklemme, keine an Evertebraten, und alle benutzten als Technik entweder „whole-cell“-Messungen oder Einzelkanalableitungen.

Sekundäre Botenstoffe: Störungen eines Gleichgewichtes

Allen Meßtechniken gemeinsam ist ein Konflikt in bezug auf das angestrebte Ziel. In manchen Fällen ist es erwünscht, einen Prozeß zu beobachten und ihn dabei so wenig wie möglich zu stören; in anderen Fällen würde man gerne quantitative Daten unter weitestgehender experimenteller Kontrolle erheben. Diese beiden Ziele schließen sich natürlich gegenseitig aus. Die „cell-attached“-Messung kommt dem ersten Ideal recht nahe, denn sie läßt die Zelle weitgehend intakt und erlaubt die Beobachtung des Öffnens und Schließens von Einzelkanälen oder das extrazelluläre Messen von Aktionspotentialen^[31]. Isolierte Membranflecken bilden das andere Extrem: Membranflecken werden aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst, um eine optimale Kontrolle der Lösungszusammensetzung auf beiden Seiten der Membran zu erhalten. Die „whole-cell“-Ableitmethode nimmt in diesem Zusammenhang eine Mittelstellung ein. Sie gestattet eine exzellente Kontrolle des Membranpotentials, wenn Zellen mit einem Durchmesser kleiner als $20\text{ }\mu\text{m}$ benutzt werden; jedoch ist die Zusammensetzung des intrazellulären Mediums weder ungestört noch unter sehr guter Kontrolle. Wir fanden, daß sich kleine, mobile Ionen typischerweise innerhalb weniger Sekunden zwischen Pipette und Zelle durch Diffusion austauschen (für Zellen mit einem Durchmesser von $15\text{ }\mu\text{m}$ und Pipetten mit $2\text{--}5\text{ M}\Omega$ Widerstand). Moleküle von mittlerer Größe, wie etwa sekundäre Botenstoffe, „waschen aus“ oder „laden“ die Zelle innerhalb von 10 Sekunden bis zu einer Minute; kleine regulatorische Proteine benötigen mehrere Minuten und länger bis zum Gleichgewichtszustand^[29].

Im nachhinein erscheint es als Glücksschlag, daß wir unsere Messungen mit ACh-Kanälen und Na-Kanälen begannen, die sich als relativ robust in bezug auf diffusible regulatorische Komponenten herausgestellt haben. So blieben wir ursprünglich von Komplikationen der „Kanalmodulation“ verschont. Als wir uns jedoch Kanälen zuwandten, von denen wir heute wissen, daß sie der Modulation durch sekundäre Botenstoffe, G-Proteine und Phosphorylierung unterliegen (z.B. Ca-Kanäle), bemerkten wir schnell, daß die Kanalaktivität als Folge der Störung durch die Messung rasch abnahm, und zwar sowohl in der „whole-cell“-Konfiguration als auch – sogar in stärkerem Maße – in zellfreien Membranflecken^[30]. Solch ein „Auswaschen“ war schon in früheren Untersuchungen an dialysierten Riesenneuronen beobachtet worden^[32]. Der Prototyp eines Kanals, der durch einen intrazellulären sekundären Botenstoff moduliert wird, der Ca-aktivierte K-Kanal, wurde 1981 durch Alain Marty^[33] charakterisiert. Diese frühen Studien zeigten bereits die ambivalente Natur der neuen Werkzeuge: Auf der einen Seite zählte der Vorteil der Kontrolle über das intrazelluläre Calcium zur Klärung des Mechanismus der Ca-Modulation; auf der anderen Seite war der Verlust zellulärer Funktionen durch das Auswaschen von damals noch unbekannten Regulatoren ein Nachteil. Später hat die virtuose Benutzung die-

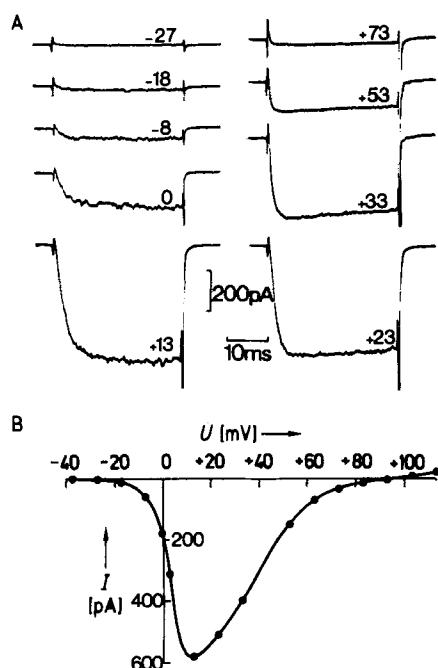


Abb. 5. „Whole-cell“-Membranströme in Chromaffinzellen in einer Badlösung, die isotones BaCl_2 und $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ TTX (Tetrodotoxin) enthielt. Das Membranpotential wurde ausgehend von einem Haltepotential von -67 mV stufenweise auf die in Teil A angezeigten Werte gebracht. Die Pipettenlösung enthielt hauptsächlich CsCl und TEA (Tetraethylammonium-Ionen). Mit dieser Lösungszusammensetzung werden die Ströme im wesentlichen durch Ca-Ionen getragen. Teil B zeigt die Strom-Spannungs-Beziehung für dieses Experiment (aus [30]). U = Membranpotential, I = Plateaustrom.

Entwicklung verschob die Schwerpunkte elektrophysiologischer Studien weg von großzelligen Präparaten, die üblicherweise von Evertebraten stammten, hin zu Sägerzellen und menschlichen Zellen. In der ersten Hälfte von 1981, kurz bevor wir erstmals eine Charakterisierung von „whole-cell“-Strömen in einer kleinen Sägerzelle (chromaffine Zellen des Nebennierenmarks) publizierten, waren im „Journal of Physiology“ nur fünf von vierzehn Studien – unter Benutzung der Spannungsklemme – an Sägerzellen durchgeführt worden. Allein die erste Ausgabe derselben Zeitschrift im Jahre

ser neuen Werkzeuge in vielen Laboratorien ein ganzes Netzwerk von Interaktionen zwischen Kanälen, sekundären Botenstoffen, G-Proteinen und anderen regulatorischen Proteinen aufgedeckt (siehe Übersicht von Hille^[34]). Um dieses Netzwerk zu enthüllen, konnte man sich nicht darauf beschränken, von diesen Zellen elektrische Signale abzuleiten, sondern man mußte die Konzentrationen von sekundären Botenstoffen festhalten oder systematisch verändern^[33, 35–37]. Später wurde es dann möglich, stufenweise Änderungen der Regulatoren durch „caged compounds“ auszulösen^[38] oder Zellen mit fluoreszierenden Indikatorfarbstoffen^[39] und regulatorischen Proteinen^[40] zu beladen.

All dies wurde möglich durch das Ausnützen des Diffusionsaustausches zwischen Patch-Pipette und Zelle oder durch Freilegung der cytoplasmatischen Seite eines herausgelösten Membranfleckens. Später wurden Methoden entwickelt, um die unerwünschten Effekte des „Auswaschens“ zu vermeiden, indem der Membranfleckken selektiv für kleine Ionen permeabilisiert wurde^[41, 42]. Diese Technik dürfte gegenwärtig die am wenigsten invasive Methode zum Studium der Funktionsweise kleiner Zellen sein.

Ein elektrophysiologischer Ansatz zum Studium der Sekretion

Eine hervorragende Eigenschaft der elektrischen Messung mit einer „Gigaseal“-Pipette ist ihre hohe Empfindlichkeit. Dies bringt Vorteile nicht nur bei der Strommessung, sondern auch bei der Registrierung der Membrankapazität, die ein Maß für die Membranoberfläche ist. Es wurde schon früher beobachtet, daß die Membrankapazität sich unter Bedingungen erhöht, unter denen massive Exocytose von sekretorischen Vesikeln stattfindet. Vermutlich ist dies auf die Inkorporation vesikulärer Membranen in die Plasmamembran zurückzuführen^[43, 44]. Das niedrige Hintergrundrauschen der „Gigaseal“-Messung ermöglichte es, Flächenänderungen aufzulösen, die durch die exocytotische Fusion von einzelnen Vesikeln auftreten. Dies wurde von Neher und Marty^[45] für die Exocytose in Chromaffinzellen des Nebennierenmarks und von Fernandez, Neher und Gomperts^[46] für die Histaminfreisetzung aus Mastzellen gezeigt. Im letzteren Fall sind die Vesikel etwas größer und führen zu gut aufgelösten, stufenförmigen Anstiegen der Kapazität (siehe Abb. 6). Diese Registrierungen zeigen, daß die Kapazitäts-

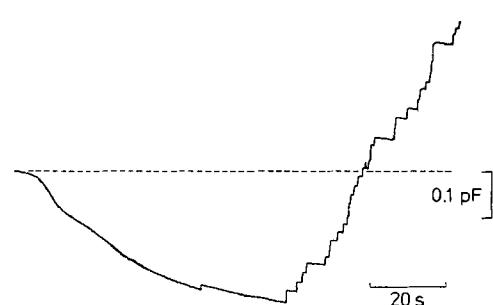


Abb. 6. Hochauflösende Kapazitätsmessung zu Beginn einer Mastzelldegranulation. „Whole-cell“-Ableitung von einer Mastzelle aus dem Peritoneum der Ratte mit einer Pipette, die $20 \mu\text{M}$ GTP- γ -S enthielt. Anfänglich erniedrigt sich die Kapazität, vermutlich durch das Abschnüren von sehr kleinen pinocytotischen Vesikeln. Nach einiger Verzögerung beginnt dann die Degranulation, so daß stufenförmige Anstiege der Kapazität zu sehen sind, wobei jede Stufe der Fusion eines einzelnen Vesikels entspricht (abgeändert aus [47]).

messung eine *hochauflösende* Technik ist. Die Abbildung zeigt aber auch, daß die Kapazität kein sehr *spezifisches* Maß für Sekretion ist. Dies wird deutlich durch die Tatsache, daß den schrittartigen, exocytotischen Ereignissen ein langsamer, kontinuierlicher Abfall der Kapazität vorausgeht. Wir fanden^[47], daß die Rate dieses Abfalls von der Konzentration des intrazellulären freien Calciums $[\text{Ca}]$ abhängt und daß er Eigenschaften aufweist, die man für den Prozess der Pinocytose erwartet.

Wir benutzten Kapazitätsmessungen zusammen mit Stromregistrierungen und Mikrofluorimetrie (mit Fura-2, einem Fluoreszenz-Indikator), um simultan in einer Einzelzelle Änderungen von $[\text{Ca}]$ und Sekretion mit hoher Zeitauflösung zu studieren. Überraschenderweise fanden wir, daß Regulatoren der Sekretion in verschiedenen Zellen unterschiedliche Effektivität hatten (Abb. 7). Für Chromaffinzel-

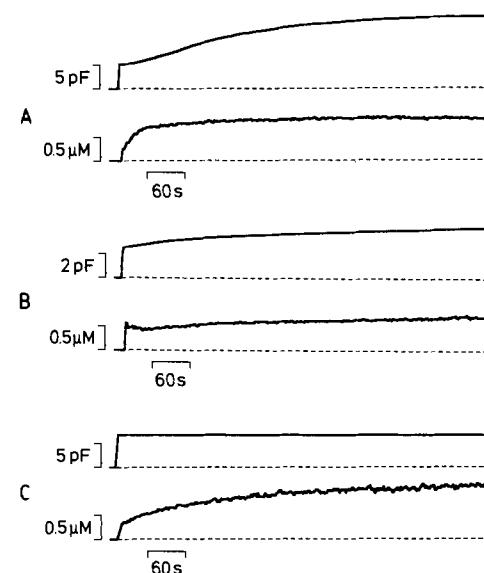


Abb. 7. Unterschiedliche Effektivität in der Auslösung von Kapazitätsanstiegen durch intrazelluläres freies Calcium. Teil A zeigt die Messung an einer Chromaffinzelzelle des Rindes. Die Spuren entsprechen dem Zeitverlauf der Kapazität (obere Spur) und der Konzentration des freien Calciums (untere Spur; gemessen durch Fura-2-Fluoreszenz) im Anschluß an eine „whole-cell“-Penetration. Die Calciumkonzentration steigt rasch an, da die Pipette mit einer Mischung aus Ca-EGTA (EGTA ist ein Chelatbildner) gefüllt war, die das freie Calcium auf etwa $1 \mu\text{M}$ einstellt. Auf der Kapazitätskurve entspricht die Stufe am Anfang ($\approx 6 \text{ pF}$) dem Ausgangswert der Zellkapazität, die zum Zeitpunkt des „Einbrechens“ sichtbar wird. Die Kapazität steigt dann etwa auf das Zweifach als Folge der Exocytose. Teil B zeigt eine ähnliche Messung an einer Betazelle der Bauchspeicheldrüse, wobei lediglich eine kleine Kapazitätserhöhung erfolgt, und Teil C dokumentiert die völlige Abwesenheit einer sekretorischen Antwort in einer Mastzelle aus dem Peritoneum der Ratte (aus [48]).

len, die in vielen Aspekten Neuronen ähneln, konnte die klassische Rolle des Calciums als wesentlicher Regulator der Exocytose voll bestätigt werden^[49]. In Mastzellen jedoch, die elektrisch nicht erregbar sind, zeigten Änderungen der Calciumkonzentration (im physiologischen Bereich) wenig Wirkung. Calciumunabhängige Sekretion wurde schon für einige nichterregbare Zelltypen beschrieben^[50–52]. Aber für uns, die wir gewohnt waren, mit elektrisch erregbaren Zellen zu arbeiten, war es ein Schock, nicht imstande zu sein, durch eine auf $1 \mu\text{M}$ freies Calcium gepufferte intrazelluläre Lösung Sekretion auszulösen. Unsere erste Hypothese war, daß die „whole-cell“-Konfiguration zum Verlust eines calciumabhängigen Regulators durch „Auswaschen“ geführt hatte,

ganz analog zu früheren Arbeiten über die Muskelkontraktion an „enthäuteten“ Fasern. Später lernten wir dann, daß Zellen in der „whole-cell“-Konfiguration durchaus sezernieren konnten, und zwar als Antwort auf die Gabe von GTP- γ -S, einem nicht-hydrolysierbaren Analogon von GTP^[46]. Mit dieser Antwort war es nun möglich zu zeigen, daß Calcium, obwohl es selbst keine Sekretion auslösen konnte, dennoch sehr wirksam war, eine bereits ablaufende sekretorische Antwort zu beschleunigen. Es gab keinen Hinweis auf den Verlust eines Ca-Regulators; im Gegenteil, es schien, daß die Stimulation durch GTP- γ -S eher zu einer Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Calcium führte^[53].

GTP- γ -S aktiviert unspezifischerweise intrazelluläre Signalwege, insbesondere auch den sogenannten „dualen Signalweg“^[54, 55]. Unter Benutzung des gesamten Repertoires der Patch-Clamp-Methode konnte Penner^[56] nachweisen, daß mehrere externe Agonisten, die bekanntermaßen den dualen Signalweg aktivierten, ein charakteristisches Muster der Sekretion zeigten. Dies ist von einer IP₃-vermittelten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern begleitet (IP₃ = Inositol-tris(phosphat)). Durch die Kombination von Fura-2-Messungen mit Patch-Clamp-Ableitungen kann man die zeitliche Beziehung zwischen dem prominenten, transienten Ca-Signal und der Sekretion untersuchen. Trotz des oben beschriebenen modulatorischen Effekts von Calcium gibt es keine strikte Korrelation zwischen beiden Größen. Die sekretorische Antwort beginnt sehr häufig erst nach dem Spitzenwert des Ca-Signals. Auch kann der Calciumtransient durch Zugabe von EGTA in die Patch-Pipette unterdrückt werden, ohne daß dies drastische Effekte auf die Sekretion hätte (Abb. 8). Phänomenologisch kann dies erklärt werden durch die Tatsache, daß der Calciumtransient

sehr früh auftritt, zu einem Zeitpunkt, bei dem die oben beschriebene Sensitisierung für Calcium durch den chemischen Stimulus noch nicht stattgefunden hat. Eine länger anhaltende Phase erhöhter Calciumkonzentration, die häufig dem Calciumtransienten folgt, beschleunigt die Sekretion viel effizienter, da sie auf den Prozeß zeitlich günstiger abgestimmt ist. Was den molekularen Mechanismus betrifft, ist es wahrscheinlich, daß die Sensitisierung auf die Aktivierung von Protein-Kinase C zurückzuführen ist^[56, 58]. Daneben wurde gezeigt, daß es einen zusätzlichen G-Protein-vermittelten Signalweg gibt, der hormonelle Stimuli in Sekretion umsetzt^[56, 59]. Dieser Signalweg ist empfindlich gegenüber Pertussis-Toxin und wird durch intrazelluläre Erhöhung von cAMP gehemmt^[56].

Unsere Studien an Mastzellen (siehe Übersicht von Penner und Neher^[60]) haben uns gelehrt, daß die Sekretionssteuerung nicht unbedingt durch Calcium dominiert wird, sondern daß sie ein interaktives Netzwerk von sekundären Botenstoffen umfaßt. In Neuronen, so scheint es, bestimmen im wesentlichen Änderungen der Calciumkonzentration^[61] oder der Calciumkonzentration und der Spannung^[62] die Kinetik schneller sekretorischer Ereignisse. Es gibt aber auch zunehmend Hinweise darauf, daß andere sekundäre Botenstoffe für plastische Veränderungen der synaptischen Signale verantwortlich sind, möglicherweise durch die Regulation der Anzahl der für die Exocytose zur Verfügung stehenden Vesikel^[63]. Unglücklicherweise sind Nervenendigungen den hier beschriebenen Methoden der biophysikalischen Analyse normalerweise nicht zugänglich. Dennoch haben jüngste Studien an neurosekretorischen Zellen neue Details über die Kinetik der Ca-vermittelten Sekretion enthüllt^[49, 64–66]. Es ist zu erwarten, daß es möglich sein wird, zwischen dem exocytotischen Ereignis per se und einigen der anderen Schritte im Lebenszyklus eines sekretorischen Vesikels zu diskriminieren. Zusammen mit den Möglichkeiten der Beeinflussung durch sekundäre Botenstoffe könnten solche Studien bald zu einem besseren Verständnis der Exocytose und derjenigen molekularen Prozesse führen, die die Vesikel zum Ort ihrer Wirkung dirigieren.

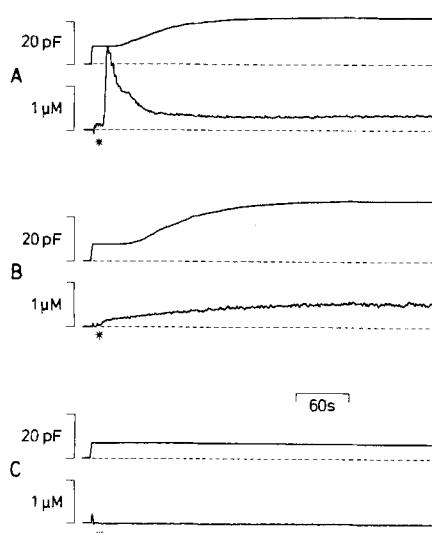


Abb. 8. Sekretorische Antworten von Mastzellen auf einen Agonisten (Substanz 48/80) unter verschiedenen Pufferbedingungen für Calcium. Die individuellen Experimente umfassen kombinierte Kapazitäts- und Calciummessungen ähnlich denen in Abb. 7. Teil A zeigt den „ungepufferten“ Fall. Es wurde kein Calciumpuffer in die Pipette gegeben (außer 100 μ M Fura-2). Als Antwort auf die Stimulation (markiert durch den Stern) entwickelt sich ein Calciumtransient. Typischerweise verläuft die Sekretion hauptsächlich während der fallenden Phase des Calciumtransienten oder im Anschluß daran. In Teil B enthielt die Pipette eine EGTA/Ca-Mischung (10 mM), die den Calciumtransienten unterdrückte und die Calciumkonzentration auf etwa 200–500 nM pufferete. Dennoch verlief die Sekretion zeitlich ähnlich wie im Fall A. In Teil C wurde 10 mM EGTA zugesetzt, um das Calcium auf niedrige Werte zu bringen. Dies unterdrückte sowohl das Calciumsignal als auch die sekretorische Antwort (aus [57]).

Großen Dank bin ich meinem Lehrer der Elektrophysiologie, H. D. Lux, schuldig, der die Gedanken des jungen Physikstudenten auf Ionenkanäle lenkte und mich lehrte, mikroskopische Werkzeuge zu benutzen. Hervorragende Arbeitsbedingungen in Göttingen wurden von H. Kuhn, O. D. Creutzfeldt und T. Jovin geschaffen, indem sie ein Labor für Nachwuchswissenschaftler zur Verfügung stellten, in welchem Bert Sakmann, F. Barrantes und ich unabhängig unsere Ziele verfolgen konnten. In den letzten Jahren wurde meine Arbeit durch den Leibniz-Preis der Deutschen Forschungsgemeinschaft großzügig unterstützt.

Eingegangen am 16. Januar 1992 [A 866]
Übersetzt von Prof. Dr. Reinhold Penner, Göttingen

- [1] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500–544.
- [2] Sir Bernard Katz, *Nerve, Muscle, and Synapse*, McGraw-Hill, New York, 1966.
- [3] B. Hille, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1970**, *21*, 1–32.
- [4] P. Müller, D. O. Rudin, *J. Theor. Biol.* **1963**, *4*, 243–280.
- [5] R. C. Bean, W. C. Shepherd, H. Chan, J. T. Eichler, *J. Gen. Physiol.* **1969**, *53*, 741–757.
- [6] S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Nature (London)* **1970**, *225*, 451–453.
- [7] B. Katz, R. Miledi, *J. Physiol.* **1972**, *224*, 665–700.
- [8] E. Neher, C. F. Stevens, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1977**, *6*, 345–381.

- [9] C. R. Anderson, C. F. Stevens, *J. Physiol.* **1973**, *235*, 655–691.
[10] B. Sakmann, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 844–856; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, Nr. 6.
[11] F. H. Pratt, J. P. Eisenberger, *Am. J. Physiol.* **1919**, *49*, 1–54.
[12] A. Strickholm, *J. Gen. Physiol.* **1991**, *44*, 1073–1087.
[13] K. Frank, L. Tauc in *The Cellular Function of Membrane Transport* (Hrsg.: J. Hoffman), Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA, **1963**.
[14] E. Neher, H. D. Lux, *Pflügers Arch.* **1969**, *311*, 272–277.
[15] H. M. Fishman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 876–879.
[16] E. Neher, B. Sakmann, *Nature (London)* **1976**, *260*, 799–802.
[17] E. Neher, J. H. Steinbach, *J. Physiol.* **1978**, *277*, 153–176.
[18] B. Sakmann, *Fed. Proc.* **1978**, *37*, 2654–2659.
[19] B. Sakmann, G. Boheim, *Nature (London)* **1978**, *282*, 336–339.
[20] F. Conti, E. Neher, *Nature (London)* **1980**, *285*, 140–143.
[21] B. Sakmann, J. Patlak, E. Neher, *Nature (London)* **1980**, *286*, 71–73.
[22] F. J. Sigworth, E. Neher, *Nature (London)* **1980**, *287*, 447–449.
[23] E. M. Fenwick, A. Marty, E. Neher, *J. Physiol.* **1981**, *319*, 100P–101P.
[24] O. P. Hamill, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1981**, *312*, 41P–42P.
[25] R. Horn, J. Patlak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6930–6934.
[26] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, *Pflügers Arch.* **1981**, *391*, 85–100.
[27] O. P. Hamill in *Single Channel Recording* (Hrsg.: B. Sakmann, E. Neher), Plenum Press, New York, **1983**, S. 451–471.
[28] A. Marty, E. Neher in *Single Channel Recording* (Hrsg.: B. Sakmann, E. Neher), Plenum Press, New York, **1983**, S. 107–122.
[29] M. Pusch, E. Neher, *Pflügers Arch.* **1988**, *411*, 204–211.
[30] E. M. Fenwick, A. Marty, E. Neher, *J. Physiol.* **1982**, *331*, 599–635.
[31] E. M. Fenwick, A. Marty, E. Neher, *J. Physiol.* **1982**, *331*, 577–597.
[32] P. G. Kostyuk, *Neuroscience* **1980**, *5*, 945–959.
[33] A. Marty, *Nature (London)* **1991**, *291*, 497–500.
[34] B. Hille, *Q. J. Exp. Physiol.* **1989**, *74*, 785–804.
[35] M. Kameyama, J. Hescheler, F. Hofmann, W. Trautwein, *Pflügers Arch.* **1986**, *407*, 123–128.
[36] R. Penner, G. Matthews, E. Neher, *Nature (London)* **1988**, *334*, 499–504.
[37] E. E. Fesenko, S. S. Kolesnikov, A. L. Lyubarsky, *Nature (London)* **1985**, *313*, 310–313.
[38] M. Morad, N. W. Davies, J. H. Kaplan, H. D. Lux, *Science (Washington, D.C.)* **1988**, *241*, 842–844.
[39] W. Almers, E. Neher, *FEBS Lett.* **1985**, *192*, 13–18.
[40] J. Hescheler, M. Kameyama, W. Trautwein, *Pflügers Arch.* **1986**, *407*, 182–189.
[41] M. Lindau, J. M. Fernandez, *Nature (London)* **1986**, *319*, 150–153.
[42] R. Horn, A. Marty, *J. Gen. Physiol.* **1988**, *92*, 154–159.
[43] L. A. Jaffe, S. Hagiwara, R. T. Kado, *Dev. Biol.* **1978**, *67*, 243–248.
[44] T. J. Gillespie, *Proc. R. Soc. London B* **1979**, *206*, 293–306.
[45] E. Neher, A. Marty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 6712–6716.
[46] J. M. Fernandez, E. Neher, B. D. Gomperts, *Nature (London)* **1984**, *312*, 453–455.
[47] W. Almers, E. Neher, *J. Physiol.* **1987**, *386*, 205–217.
[48] R. Penner, E. Neher, *J. Exp. Biol.* **1988**, *139*, 329–345.
[49] G. J. Augustine, E. Neher, *J. Physiol.* **1992**, *450*, 247–271.
[50] R. J. Haslam, M. L. Davidson, *FEBS Lett.* **1984**, *174*, 90–95.
[51] R. I. Sha'afi, J. R. White, T. P. F. Molski, J. Shefcyk, M. Volpi, P. H. Naccache, M. B. Feinstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *114*, 638–645.
[52] F. Di Virgilio, D. P. Lew, T. Pozzan, *Nature (London)* **1984**, *310*, 691–693.
[53] E. Neher, *J. Physiol.* **1988**, *395*, 193–214.
[54] S. Cockcroft, B. D. Gomperts, *Nature (London)* **1985**, *314*, 534–536.
[55] M. J. Berridge, R. F. Irvine, *Nature (London)* **1989**, *341*, 197–205.
[56] R. Penner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 9856–9860.
[57] E. Neher, R. Penner in *Molecular Mechanisms in Secretion* (Hrsg.: N. A. Thorn, M. Treiman, O. H. Petersen), Munksgaard, Copenhagen, **1988**, S. 262–270.
[58] A. S. Heiman, F. T. Crews, *J. Immunol.* **1985**, *134*, 548–554.
[59] B. D. Gomperts, M. M. Barrowman, S. Cockcroft, *Fed. Proc.* **1986**, *45*, 2156–2161.
[60] R. Penner, E. Neher, *Trends Neural Sci.* **1989**, *12*, 159–163.
[61] G. J. Augustine, M. P. Charlton, S. J. Smith, *Annu. Rev. Neurosci.* **1987**, *10*, 633–693.
[62] H. Parnas, J. Dudel, I. Parnas, *Pflügers Arch.* **1986**, *406*, 121–130.
[63] R. Llinás, J. A. Gruner, M. Sugimori, T. L. McGuiness, P. Greengard, *J. Physiol.* **1991**, *436*, 257–282.
[64] P. Thomas, A. Suprenant, W. Almers, *Neuron* **1990**, *5*, 723–733.
[65] N. F. Lim, M. C. Nowycky, R. J. Bookman, *Nature (London)* **1990**, *344*, 449–451.
[66] M. Lindau, E. L. Stuenkel, J. J. Nordmann, *Biophys. J.* **1992**, im Druck.

Nur Kopieren ist teurer...

... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für zehn Mark und ein paar Zerquetschte jeden Monat druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als acht Pfennige pro Seite!

Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Schork an (Tel. 0 62 01 / 6 06 - 1 99) oder schicken ihr ein Fax (0 62 01 / 6 06 - 1 84). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 6940 Weinheim