

Elementare Ionenströme und synaptische Übertragung (Nobel-Vortrag)**

Von Bert Sakmann*

Einleitung

Die Plasmamembran trennt das Innere einer Zelle von der extrazellulären Umgebung und damit auch von anderen Zellen. Sie wirkt als Diffusionsbarriere und als elektrischer Isolator und ermöglicht so die Differenzierung von Zellen mit spezialisierten Funktionen. Das koordinierte Verhalten multizellulärer Organismen erfordert jedoch den Austausch von Signalen zwischen Zellen. Weil Signale von einer Zelle zur nächsten weitergegeben werden müssen, ist ein Mechanismus notwendig, der es gestattet, daß Signale die trennenden Zellmembranen passieren können. Der Informationsaustausch zwischen Zellen beruht auf der Abgabe von Signalstoffen in den Extrazellulärraum, die dann spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen besetzen und die Bildung eines transmembranären Signals bewirken. Das Nervensystem verbindet Zellen in sehr spezifischer Weise, wobei die Signalübertragung zwischen einzelnen Zellen an Kontaktstellen erfolgt, die als Synapsen bezeichnet werden. Diese sind anatomisch und funktionell spezialisiert für die schnelle Signalweitergabe.

Die synaptische Signalübertragung dient sowohl der raschen Kommunikation zwischen Zellen des Nervensystems als auch dem Signalaustausch zwischen Nervenzellen und denjenigen Zellen in peripheren Organen, die für die Aufnahme von äußeren Reizen und für die sekretorische und motorische Aktivität verantwortlich sind^[1, 2]. Synaptische Übertragung beinhaltet einen chemischen Schritt, was bedeutet, daß eine Überträgersubstanz – als Transmitter bezeichnet – lokal von der „sendenden“, präsynaptischen Zelle freigesetzt wird und dann vorübergehend auf Rezeptoren in der Zellmembran der „empfangenden“, postsynaptischen Zelle wirkt. Der Rezeptor ist Teil eines Ionenkanals und vermittelt bei Besetzung durch Transmittermoleküle einen kurzen Ionenfluß durch die postsynaptische Membran.

Das Signal, das die zelluläre Antwort der postsynaptischen Zelle auslöst, ist der Ionenfluß durch die postsynaptische Membran. Größe, Dauer und Richtung dieses Ionenflusses sowie die Art der beteiligten Ionen bestimmen die Reaktion der Zelle. Einerseits können spannungsabhängige Membranströme aktiviert werden, die Aktionspotentiale auslösen, welche ihrerseits weitergeleitet werden; zum anderen kann aber auch die elektrische Aktivität der Zelle herabgesetzt werden. Die zelluläre Antwort kann auch durch eine Änderung der intrazellulären Ionenkonzentration bestimmt sein, insbesondere durch die Konzentration von Calcium-Ionen, die als sekundäre Botenstoffe für zelluläre Antworten, wie Kontraktion oder Sekretion, wirken.

Die neuromuskulären Kontaktstellen werden oft als prototypische Synapsen angesehen. An der neuromuskulären Synapse setzt die Nervenendigung eines Motoneurons den Überträgerstoff Acetylcholin (ACh) frei und erzeugt Endplattenpotentiale (EPPs), die ihrerseits spannungsabhängige Leitfähigkeiten aktivieren. Die Aktionspotentiale leiten die Erregung in andere Teile des Muskels weiter^[1]. Der Stromfluß durch die Endplatte (dies ist der für ACh empfindliche Bereich der Muskelmembran), ausgelöst durch die Freisetzung von ACh-„Paketen“ (Quanten), kommt durch Überlagerung vieler kleiner „Elementarereignisse“ zustande^[3]; es gibt viele Hinweise darauf, daß postsynaptische Potentiale in anderen Synapsen, z. B. in Synapsen zwischen Nervenzellen, ebenfalls durch Überlagerung von Elementarereignissen entstehen.

Im folgenden werden nun die Eigenschaften von Elementarströmen, d. h. Strömen durch einzelne Ionenkanäle, die den postsynaptischen Potentialen zugrundeliegen, sowie die sie bestimmenden molekularen Faktoren näher beschrieben. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den Eigenschaften von Elementarströmen, die die neuromuskuläre Übertragung steuern. Die neuromuskuläre Synapse ist sowohl funktionell als auch in bezug auf die molekularen Bestandteile die am besten charakterisierte Synapse; die meisten Techniken zur Messung von Einzelkanalströmen wurden an Muskelfaserpräparaten entwickelt. Es stellte sich heraus, daß – abgesehen von Synapsen-spezifischen Details – ein vergleichbares Verhalten von Elementarströmen auch bei anderen transmittierten postsynaptischen Potentialen beobachtet werden kann. Besonders gilt dies für durch Glycin, γ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat und Serotonin aktivierte Elementarströme. Diese Transmitter vermitteln die „schnelle“ synaptische Übertragung im Zentralnervensystem (ZNS) und lösen postsynaptische Potentiale aus, die Millisekunden bis Hunderte von Millisekunden dauern.

Elementarereignisse

Endplattenrauschen: Die Vorstellung von „Elementarereignissen“ wurde von B. Katz und R. Miledi eingeführt. Während der Registrierung von Membrandepolarisationen, die durch iontophoretische Zugabe von ACh auf neuromuskuläre Endplatten von Skelettmuskeln des Frosches ausgelöst wurden, beobachteten sie „Membranrauschen“^[3]. Sie schlugen vor, daß die Zunahme des Rauschens bei der Depolarisation auf der Überlagerung von Elementarereignissen beruht, die durch statistisch unabhängige Aktivierung von einzelnen Acetylcholinrezeptoren (AChRs) zustandekommen. Jede Aktivierung löst eine sehr kleine (im Mikrovolt-Bereich) Depolarisation aus.

Die Größe der Leitfähigkeitsänderung, die durch ein Elementarereignis bewirkt wird, wurde aus solchen Rauschmessungen, unter Annahme von pulsformigen Leitfähigkeitsänderungen, auf etwa 30 bis 50 Pikosiemens (pS) geschätzt. Die

[*] Prof. Dr. B. Sakmann
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Abteilung Zellphysiologie
Jahnstraße 29, W-6900 Heidelberg

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

Dauer betrug nur wenige Millisekunden^[3, 4]. Dies bedeutet, daß die Amplitude eines Elementarstromes, bei einer Ruhemembranspannung von -70 bis -90 Millivolt, in der Größenordnung von etwa $3-5$ Pikoampere (pA) liegt. Diese Ströme sind etwa zwei bis drei Größenordnungen kleiner, als die Ströme, die damals mit konventionellen Meßtechniken direkt aufgelöst werden konnten^[5].

Stromrauschen in extrasynaptischen Muskelmembranen: Die Empfindlichkeit für ACh ist in normalen Muskelfasern auf den sehr kleinen Bereich der Endplatte beschränkt. Nach chronischer Denervation des Skelettmuskels, ausgelöst durch Durchtrennung des motorischen Nervens, wird der gesamte Muskel für ACh empfindlich^[6]. Es ist heute bekannt, daß dies durch den Einbau von neusynthetisierten ACh-Rezeptoren in die extrasynaptische Membran der Muskelfaser erfolgt. Durch Rauschanalyse der ACh-aktivierten Ströme schätzten wir die mittlere Leitfähigkeit der zugrundeliegenden Elementarereignisse in denervierten Muskelfasern des Frosches auf etwa 20 pS ^[7]. Die Größe der Elementarströme betrug also etwa 60% der im normalen Muskel gemessenen Werte. Die Elementarereignisse dauerten jedoch im Mittel drei- bis fünfmal länger als die Elementarereignisse an der Endplatte.

Elementare Endplattenströme sind rechteckförmig

Lösung des Problems Hintergrundrauschen: Denervierte, überempfindliche Muskelfasern des Frosches waren daher die Präparation der Wahl, um Methoden zur direkten Registrierung von Elementarereignissen zu entwickeln, und zur Untersuchung ihrer grundlegenden Eigenschaften durch direkte Messung. Der Schlüssel zur Verringerung des Hintergrundrauschens im relevanten Frequenzbereich (bis 1 kHz) lag in der Begrenzung der Messung auf einen kleinen Membranbereich von etwa $10 \mu\text{m}^2$ und in der elektrischen Isolierung dieses Membranareals („Patch“) vom Rest der Zellmembran. Hierzu wird die Spitze einer Glaspipette mit kleinem Öffnungsdurchmesser ($1-3 \mu\text{m}$) dicht auf die Membran aufgesetzt („Gigaseal“, Neher 1991)^[8]. Setzt man eine Pipette auf eine normale Muskelfaser auf, so erhält man Abdichtwiderstände von weniger als $1 \text{ M}\Omega$ und schädigt häufig die Faser. Das Problem der Abdichtung wurde dadurch gelöst, daß die Muskelfaser vorsichtig mit Enzymen behandelt wurde, die sie von der Deckschicht aus Bindegewebe und Basalmembran befreien und ihr glattes Sarkolem-

ma freilegen^[8], sowie durch Glättung der Pipettenspitze mit einer kleinen Glühwendel^[9]. Wenn die polierte „Patch-Pipette“ auf die freigelegte Zellmembran einzelner Muskelfasern gesetzt wird, mechanisch gesichert durch einen Glashaken, kann man Abdichtwiderstände von 50 bis $150 \text{ M}\Omega$ erreichen. Das Membranpotential der Muskelfaser wurde lokal in der Nähe des Membranbereichs, von dem die Elementarströme abgeleitet wurden, durch einen konventionellen Spannungsklemmverstärker mit zwei intrazellulären Mikroelektroden festgesetzt („geklemt“) (Abb. 1A).

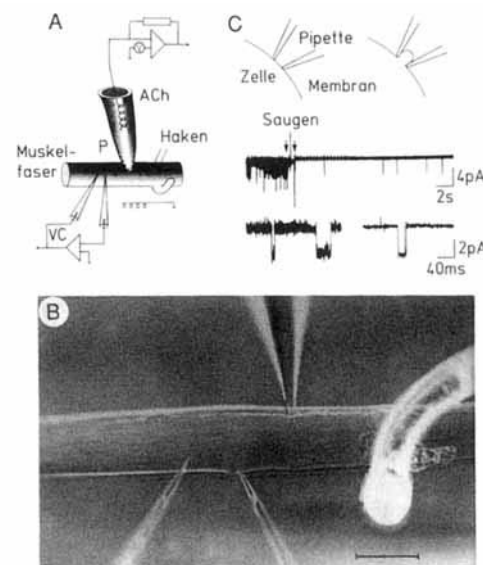


Abb. 1. Ableitungen von einem Membranbereich („Patch“) der Endplatte. A) Schemazeichnung einer Muskelfaser mit einer aufgesetzten Patch-Pipette (P). Die Pipette ist mit extrazellulärer Lösung gefüllt; das Pipettenpotential wird mit einem Rückkopplungs-Schaltkreis auf Nullspannung in Bezug auf die extrazelluläre Lösung geklemmt. Das Membranpotential der Muskelfaser wird durch zwei intrazelluläre Mikroelektroden mit einem Spannungsklemm-Meßverstärker auf einen beliebigen Testwert geklemmt. Die Patch-Pipette enthält außerdem Acetylcholin in geringer Konzentration. B) Ablösung der Nervenendigung von der Muskelfaser. Mikrophotographie einer einzelnen Muskelfaser des Frosches mit freigelegter Endplatte (nach Entfernung der Nervenendigung). Die Endplatte ist als heller „Strich“ erkennbar. Die Spitze der Patch-Pipette berührt die Endplatte. Zwei intrazelluläre Mikroelektroden dienen dazu, mit Hilfe eines Rückkopplungsverstärkers das Membranpotential der Muskelfaser lokal zu kontrollieren. Ein Glashaken auf der rechten Seite sichert die Muskelfaser mechanisch. Der Kalibrierbalken entspricht $50 \mu\text{m}$. C) Vergleich von Einzelkanalregistrierungen mit Abdichtwiderständen im $\text{M}\Omega$ - und $\text{G}\Omega$ -Bereich. Die Schemazeichnung (oben) zeigt die Bildung eines hochohmigen Abdichtwiderstandes durch das Anlegen eines leichten Unterdruckes (Saugen) an das Pipetteninnere. Die Registrierungen (unten) zeigen Ableitungen vom selben Membranbereich bei unterschiedlicher zeitlicher Auflösung, jeweils vor (links) und nach (rechts) Anlegen des Unterdruckes an das Pipetteninnere; der Widerstand der Kontaktstelle Pipette/Membran stieg von $150 \text{ M}\Omega$ auf $60 \text{ G}\Omega$ an [12].



Bert Sakmann, geboren am 12. Juni 1942 in Stuttgart, studierte Medizin an den Universitäten Tübingen, Freiburg, Berlin, Paris und München. Von 1968 bis 1970 arbeitete er als Medizinalassistent an der Universität München und am Max-Planck-Institut (MPI) für Psychiatrie in München bei O. D. Creutzfeldt. Nach einem Aufenthalt am University College London bei B. Katz promovierte er 1974 an der Medizinischen Fakultät Göttingen und arbeitete anschließend am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen weiter bei O. D. Creutzfeldt. 1982 habilitierte er sich, 1985 wurde er Direktor am MPI in Göttingen und 1989 Direktor der Abteilung Zellphysiologie des MPI für medizinische Forschung in Heidelberg. Seit 1990 ist er außerdem Mitglied der Fakultät für Theoretische Medizin der Universität Heidelberg. 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.

Einzelkanalströme: Messungen bei genügend hohen Abdichtwiderständen ($> 50 \text{ M}\Omega$) in Gegenwart von Suberoyldicholin, einem Agonisten, der ACh-Rezeptoren zu längerandauernden Öffnungen veranlaßt, ermöglichten es uns, von denervierten Froschmuskelfasern sehr kleine Stromantworten abzuleiten. Sie hatten eine rechteckige Form und viele Eigenschaften von Elementarereignissen, wie sie nach der Rauschanalyse von ACh-aktivierten Strömen erwartet wurden^[10]. Rechteckförmige Stromantworten konnten auch von denervierten Rattenmuskeln abgeleitet werden. Sie ähnelten denen, die an denervierten Froschmuskeln erhalten werden, und in beiden Präparaten entsprachen die direkt gemessenen Amplituden der Elementarereignisse recht gut der aus Rauschanalysen von makroskopischen Membranströmen abgeschätzten Größe^[11].

Zugang zur neuromuskulären Synapse: Um die Eigenschaften von Elementarströmen in Beziehung zu postsynaptischen Strömen von normalen Muskelfasern zu setzen, war es notwendig, die Eigenschaften von Einzelkanalströmen mit denen von Miniatur-Endplattenströmen (MEPCs) zu vergleichen. Dies sind die postsynaptischen Ströme, die nach Ausschüttung von ACh aus einem präsynaptischen Vesikel der Nervenendigung durch die Endplatte fließen. Die Spitze der Patch-Pipette kann nur dann auf die Endplatte aufgesetzt werden, wenn die neuromuskuläre Verbindung sichtbar und die Nervenendigung, die die Endplatte in normalen Fasern bedeckt, von der Endplatte entfernt wurde. Am einfachsten gelingt das durch lokale Applikation von Collagenase, gefolgt von vorsichtigem Überströmen der Muskelfaser mit Ringerlösung aus einer Pipette mit kleinem Öffnungsdurchmesser ($100 \mu\text{m}$). Diese Prozedur ergibt Muskelfaserpräparate mit frei zugänglichen Endplatten (Abb. 1 B).

Elementare Endplattenströme: Die an der Endplattenmembran gemessenen Elementarereignisse (elementare Endplattenströme) waren etwa 50 % größer in ihrer Amplitude, aber wesentlich kürzer in ihrer Dauer als die in der extrasynaptischen Membran gemessenen; dies wurde schon aus der Fluktuationsanalyse von ACh-aktivierten Strömen in normalen und denervierten Fasern erwartet^[7]. Die Messungen zeigten, daß der elementare Endplattenstrom ein rechteckförmiges Ereignis ist, dem der Transport durch die Zellmembran von kleinen Kationen wie Na^+ oder K^+ mit sehr hohen Transportraten (10^7 bis 10^8 s^{-1}) zugrundeliegt. Dies legt nahe, daß diese Ströme die Öffnung und Schließung von einzelnen hydrophilen Membranporen („Kanälen“) widerspiegeln^[10].

Einige der grundlegenden Eigenschaften von Endplattenkanälen zeigten sich erst bei der zusätzlich erhöhten Auflösung, die sich aus der Erniedrigung des Hintergrundrauschens durch die Bildung des hohen Abdichtwiderstandes im Bereich mehrerer $\text{G}\Omega$ zwischen Pipettenspitze und Membran ergab^[12]. Durch die Benutzung frisch hergestellter Pipetten und das Anlegen leichten Unterdruckes an das Innere der Pipette, der das Membranareal unterhalb der Pipettenöffnung in diese hinzog, ergab sich ein molekularer Kontakt zwischen dem Glas und der Plasmamembran. Der Abdichtwiderstand erhöhte sich von $50\text{--}150 \text{ M}\Omega$ auf $1\text{--}100 \text{ G}\Omega$. Folglich erniedrigte sich das Hintergrundrauschen, und die „Randströme“^[9] verschwanden fast gänzlich (Abb. 1 C). Das erniedrigte Hintergrundrauschen erlaubte es uns, elementare Endplattenströme mit einer Bandbreite bis zu

10 kHz zu registrieren und feine Details, die erst bei dieser hohen Auflösung sichtbar wurden, quantitativ zu untersuchen.

Leitfähigkeit des offenen Endplattenkanals: Messungen von elementaren Endplattenströmen (Abb. 2 A) ergaben, daß der Endplattenkanal in nur zwei Leitfähigkeitszuständen existiert: entweder ist der Kanal geschlossen, wenn kein Agonist eine Bindungsstelle besetzt, oder er ist vollkommen geöffnet, wenn die ACh-Bindungsstelle(n) besetzt sind. Die Amplitudenverteilung einer großen Anzahl von elementaren Endplattenströmen kann durch eine Gauß-Kurve angepaßt werden (Abb. 2 B), wobei die Varianz in der Amplitudenverteilung im wesentlichen durch das verbleibende Hintergrundrauschen der Messung bedingt ist. Dies bestätigte die ursprüngliche Annahme, daß Endplattenkanäle zwei Leitfähigkeitszustände bevorzugen: geschlossen und vollkommen geöffnet (schematisches Diagramm, Abb. 2 A).

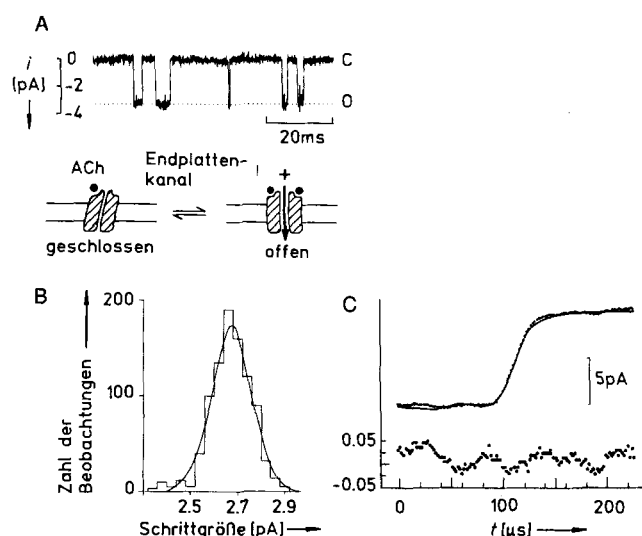


Abb. 2. Elementare Endplattenströme. A) Ableitung von Elementarströmen, die durch Acetylcholin (ACh) aktiviert wurden (Rattenmuskel). Die Membranspannung wurde auf -70 mV geklemmt. Die Schemazeichnung unter der Stromspur illustriert das Öffnen und Schließen eines Endplattenkanals nach Bindung und Abdissoziation des Transmitters an der Bindungsstelle des Endplattenkanals. Der Kanal ist im Ruhezustand geschlossen; er ist geöffnet, wenn zwei Bindungsstellen durch ACh-Moleküle besetzt sind. B) Amplitudenverteilung der Elementarströme im Froschmuskel bei Aktivierung mit 200 nM ACh. Das Histogramm kann durch eine Gauß-Kurve mit einer mittleren Amplitude von $2.69 \pm 0.10 \text{ pA}$ beschrieben werden. Offene Endplattenkanäle haben einen einheitlichen Leitwert. C) Endplattenkanäle öffnen schnell. Die oberen Registrierungen zeigen überlagerte Endplattenströme (Punkte) und die Stromantwort auf einen Testpuls (durchgezogene Linie, nach Amplitudenskalierung) zur Messung der Frequenzantwort der Meßapparatur. Die Differenz zwischen den beiden Registrierungen ist durch die Kreise angegeben (unten).

Zeitverlauf der Kanalzustandsübergänge Geschlossen-Offen: Der Zeitverlauf des Einzelkanalstroms spiegelt strukturelle Übergänge eines einzelnen Makromoleküls in Echtzeit wider. Eine offensichtliche Frage ist daher, ob der Zeitverlauf des Übergangs zwischen den Offen- und Geschlossenzuständen des Kanals meßbar ist (Abb. 2 C). Wir überlagerten den Zeitverlauf der Anstiegs- und Abfallsflanke des Einzelkanalstroms mit der Stufenantwort des Meßsystems. Da kein Unterschied meßbar war, mußte die Anstiegssteilheit der Einzelkanalströme durch das Frequenzverhalten des Meßsystems begrenzt gewesen sein. Die Zeitkonstante des Über-

gangs vom Geschlossen- zum Offenzustand des Kanals ist somit kleiner als 10 μ s.

Wiederholte Beobachtungen des gleichen Kanals: In dem mit der Glaspipette isolierten Membranbereich befinden sich in der Regel mehrere Kanäle. Um elementare Endplattenströme aufzulösen, muß die Konzentration von ACh oder verwandten Agonisten wie Suberoyldicholin gering sein (üblicherweise niedriger als 0.5 μ M), so daß die Öffnungswahrscheinlichkeit von einzelnen Kanälen klein wird und individuelle Öffnungen klar voneinander getrennt werden können (Abb. 2A). Dies bedeutete jedoch, daß man nicht sicher sein konnte, ob aufeinanderfolgende elementare Endplattenströme tatsächlich die Öffnung desselben Einzelkanals wiedergeben. Bei höheren Agonistenkonzentrationen (für ACh > 5 μ M) fanden wir, daß Elementarströme in langen „bursts“ von mehreren hundert Millisekunden Dauer erscheinen. Diese „bursts“ entstehen, weil der Kanal zusätzlich zum „ruhenden“ Geschlossenzustand einen weiteren, kinetisch unterscheidbaren Geschlossenzustand annehmen kann, der als „desensitisierte“ Geschlossenzustand bezeichnet wird. Dieser Zustand ist nahezu irreversibel; Kanäle isomerisieren nur selten zurück in den Offenzustand oder den ruhenden Geschlossenzustand. Wenn dies geschieht, schaltet derselbe Kanal wiederholt hin und zurück zwischen den Zuständen „ruhend geschlossen“ und „offen“, bevor er wieder den „desensitisierten“ Geschlossenzustand annimmt^[13]. Aus diesem Grund lassen sich mehrere Öffnungs- und Schließvorgänge ein und desselben Kanals beobachten. Die Tatsache, daß sich die Amplitude der Elementarströme während einer solchen Epoche nicht änderte und daß die mittlere Dauer der Endplattenströme im wesentlichen unabhängig von der ACh-Konzentration war, stützte das Zwei-Zustands-Reaktionsschema zur Erklärung der in Abbildung 2A gezeigten Stromregistrierungen.

Elementare Schritte in der neuromuskulären Übertragung

Miniatur-Endplattenströme und elementare Endplattenströme: Hinsichtlich der Funktion des Endplattenkanals bei der synaptischen Übertragung stellt sich die Frage nach der Beziehung zwischen Größe und Dauer von elementaren Endplattenströmen einerseits und den makroskopischen Endplattenströmen andererseits. Mit anderen Worten: Wie hängt der Zeitverlauf von Endplattenströmen mit dem Schaltverhalten des Endplattenkanals zusammen? Ein einfacher Weg, die Abfallzeit eines Miniatur-Endplattenstroms (MEPC) zu rekonstruieren, besteht darin, hunderte oder tausende elementarer Endplattenströme zu überlagern. Dieser Prozedur liegt die Hypothese zugrunde, daß, nach der Freisetzung von ACh aus einem präsynaptischen Vesikel, die Konzentration von ACh im synaptischen Spalt sehr schnell ansteigt, ACh-Rezeptoren sättigt, dann aber rasch (in weniger als 1 ms) auf vernachlässigbare Werte abfällt^[14]. Ist die vorübergehende Erhöhung der ACh-Konzentration im Spalt sehr kurz im Verhältnis zur mittleren Dauer der elementaren Endplattenströme, dann spiegelt die Abfallzeit der MEPCs die Verteilung der Zeitdauer von elementaren Endplattenströmen nach dem Entzug von ACh wider. Zur Veranschaulichung dieser Vorstellung sind in Abbildung 3A mehrere

elementare Endplattenströme überlagert. Der Gesamtstrom, erzeugt durch die Überlagerung von tausend elementaren Endplattenströmen, hat einen Spitzenwert von 4.7 nA und fällt mit einer Zeitkonstante von 2.7 ms ab (Abb. 3B). Ähnliche Werte für MEPCs werden an der Muskelendplatte der Ratte registriert. Dies bedeutet, daß ein einzelner MEPC, der der Leitfähigkeitsänderung von etwa 50 nS entspricht, durch die fast simultane Öffnung von etwa tausend Endplattenkanälen (jeder mit 50 pS Leitfähigkeit) ausgelöst wird und daß die Abfallzeit der MEPCs in erster Näherung durch die mittlere Dauer der elementaren Endplattenströme bestimmt ist.

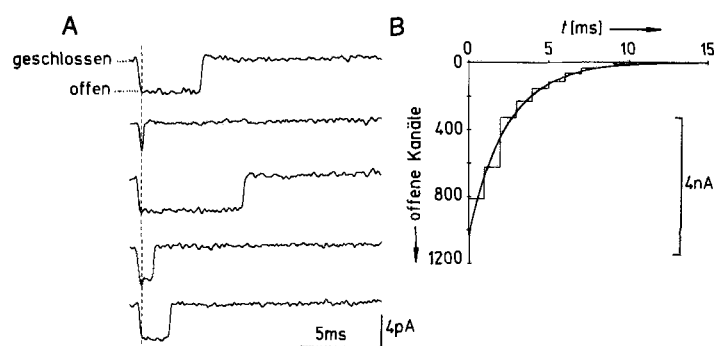


Abb. 3. Die Dauer der elementaren Endplattenströme bestimmt die Dauer der Miniatur-Endplattenströme. A) Registrierungen von elementaren Endplattenströmen, die durch 200 nM ACh aktiviert wurden, in einer Muskelfaser der Ratte. Die Anstiegsflanken der Einzelkanalströme wurden so angeordnet, daß sie zeitlich zusammenfallen, um die variable Dauer der Endplattenströme zu zeigen. B) Aufsummierung von 1000 elementaren Endplattenströmen. Elementare Endplattenströme wurden digitalisiert, durch „time course fitting“ idealisiert [15] und dann digital überlagert (entsprechend der Prozedur in Abb. 3A). Die durchgezogene, dem Histogramm überlagerte Linie ist eine Exponentialfunktion mit einer Abfallzeitkonstante von 2.7 ms.

Elementare Ströme und multiple Einzelkanalöffnungen: Der Zeitverlauf von elementaren Endplattenströmen ist komplizierter als die Form, die man von einem Kanal erwartet hätte, der zwischen einem Offen- und einem Geschlossenzustand (wie in Abb. 2A angenommen) wechselt. Die meisten elementaren Endplattenströme zeigen, wenn man sie in hoher Zeitauflösung beobachtet, sehr kurze Unterbrechungen (Abb. 4A, B), d.h. die Stromspur kehrt kurzzeitig zur Grundlinie zurück^[15, 16]. Dieses Verhalten wird bei fast allen bisher untersuchten transmitter- oder spannungsaktivierten Ionenkanälen beobachtet. Im Falle eines Endplattenkanals spiegelt dies die Tatsache wider, daß der Kanal mehrmals öffnet und schließt, bevor der Agonist vom Rezeptor abdissoziiert. Das in Abbildung 2A gezeigte Schema soll lediglich das zugrundeliegende Prinzip der strukturellen Umlagerung des Kanals verdeutlichen, wobei jeweils nur ein Offen- und ein Geschlossenzustand angenommen werden. In Wirklichkeit umfaßt das Reaktionsschema, das mit den experimentellen Beobachtungen in Einklang ist, mehrere Geschlossen- und Offenzustände.

Ein plausibles Reaktionsschema für die Aktivierung des Endplattenkanals: In Zusammenarbeit mit D. Colquhoun untersuchten wir die Feinstruktur dieser schnellen Übergänge zwischen verschiedenen geschlossenen und offenen Zuständen des Endplattenkanals. Mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitstheorie^[17, 18] war es möglich, die minimale Anzahl von unterschiedlichen Kanalzuständen und die entsprechenden Ge-

schwindigkeitskonstanten, mit denen die Zustände ineinander übergehen, abzuschätzen^[15]. Wenigstens fünf kinetisch verschiedene Zustände (Abb. 4C) konnten durch die Messung von Zeitverteilungen der Offen- und Geschlossen-zustände bei niedrigen Konzentrationen mehrerer Agonisten unterschieden werden. Daraus ergab sich ein Schema für das Schaltverhalten des Endplattenkanals während der normalen neuromuskulären Übertragung, welches eine Modifikation des ursprünglich von Del Castillo und Katz^[19] vorgeschlagenen Schemas ist. Es umfaßt einen ruhenden Zustand ohne Liganden und vier agonistbindende Zustände, von denen zwei Offenzustände sind. Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 4D), welche die Übergänge zwischen den Zuständen des Endplattenkanals beschreiben, lassen darauf schließen, daß die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei hohen ACh-Konzentrationen, wie sie während der neuromuskulären Übertragung auftreten (höher als 100 μM), fast 100% beträgt. Hat der ACh-Rezeptor zwei

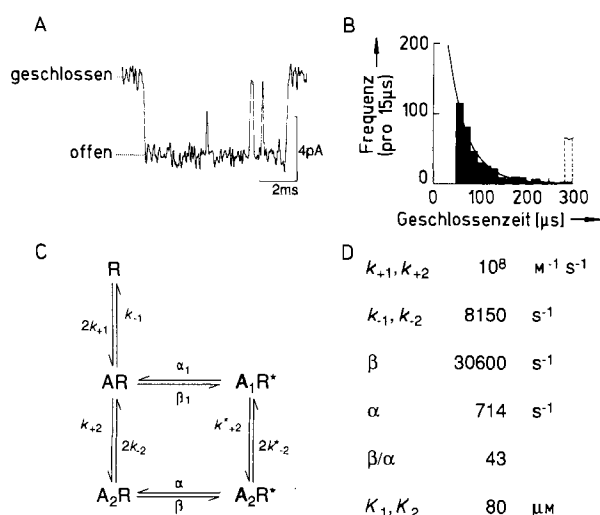


Abb. 4. Reaktionsschema für die Aktivierung des Endplattenkanals durch ACh. A) Registrierung von elementaren Endplattenströmen, die durch das ACh-Analogon Suberoyldicholin aktiviert wurden, zur Verdeutlichung der „bursts“ von elementaren Endplattenströmen. Man beachte unaufgelöste, kurze Schließvorgänge. B) Verteilung der Zeitdauern kurzer Schließvorgänge während elementaren Endplattenströmen. Die durchgezogene Linie entspricht einer Exponentialen mit einer Abfallzeitkonstante von 39 μs . C) Reaktionsschema für die Wechselwirkung von ACh (A) und Endplattenkanal (R) mit fünf kinetisch verschiedenen Zuständen. Leitende Zustände sind durch ein Sternchen gekennzeichnet. D) Die für das in Abb. 4C dargestellte Reaktionsschema abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten für die Wechselwirkung von ACh mit dem Endplattenkanal (aus [15]).

Agonistmoleküle gebunden, so verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Geschlossen- und Offenzuständen fast vollständig zum Offenzustand, so daß der Endplattenkanal sehr effektiv und rasch den Stromfluß durch die Endplattenmembran anschaltet.

Isoformen von Endplattenkanälen

Bei Messungen postsynaptischer Ströme in Muskelfasern junger Tiere beobachteten wir in Zusammenarbeit mit H. Brenner, daß sich der Zeitverlauf des Abfalls der MEPCs während der postnatalen Entwicklung deutlich ändert. Dies spiegelt einen Wechsel der funktionellen Eigenschaften der Endplattenkanäle in diesem Entwicklungsstadium wider. Bis

zum postnatalen Tag 8 (P8) ist die Abfallzeit der MEPCs kürzer als die von MEPCs, die am adulten Muskel zu beobachten ist. Während der Periode P7 bis P15 werden die Abfallzeiten der MEPCs am besten durch die Summe von zwei Exponentialfunktionen beschrieben; nach P21 verhalten sich dagegen die MEPCs genau so wie in adulten Fasern^[20, 21]. Die molekulare Basis für diesen Unterschied der synaptischen Ströme ist in Abbildung 5 gezeigt. In frühen

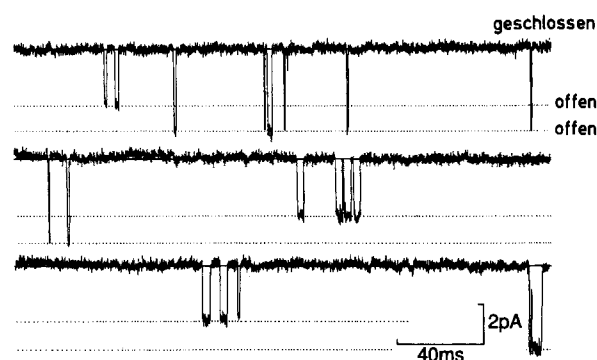


Abb. 5. Zwei Klassen von elementaren Endplattenströmen. Registrierung von Einzelkanalströmen, die durch 0.5 μM ACh aktiviert wurden, in einer Muskelfaser der Ratte am postnatalen Tag 8 (P8). Zwei Klassen von Elementarströmen mit unterschiedlichen Amplituden und mittleren Offenzeiten sind in diesem „Patch“ sichtbar. Die Elementarströme mit der größeren Amplitude entsprechen den Einzelkanalströmen, die auch in adulten Fasern (>P21) beobachtet werden, während die Elementarströme mit der kleineren Amplitude denen entsprechen, die vorwiegend in frühen postnatalen Stadien (<P8) oder in fetalen Muskeln zu finden sind.

postnatalen Stadien werden zwei Klassen von Elementarströmen registriert. Skelettmuskelfasern von Säugern exprimieren zwei Isoformen von Endplattenkanälen, die unterschiedliche elementare Endplattenströme erzeugen^[22], die sich sowohl in ihrer Amplitude als auch in ihrer mittleren Dauer unterscheiden. Die Expression dieser Kanalisformen wird entwicklungsabhängig reguliert. In frühen Stadien der Entwicklung, im noch nicht innervierten Muskel, überwiegt ein fetaler Kanaltyp mit niedrigerer Leitfähigkeit und längerer mittlerer Öffnungsdauer. Nach der Innervation wird diese fetale Isoform durch die adulte Isoform ersetzt, deren Elementarströme durch höhere Leitfähigkeit und kürzere Öffnungsdauer charakterisiert sind. Nach Denervation wird wieder der fetale Kanaltyp exprimiert; somit kann angenommen werden, daß der Skelettmuskel ein Mosaik von AChR-Kanalisformen enthält und daß die Zusammensetzung dieses Mosaiks von Kanalisformen unter neuronaler Kontrolle steht (siehe Übersicht von Sakmann et al.^[23]).

Molekulare Determinanten der Kanalfunktion

Die Identifizierung von molekularen Determinanten der AChR-Kanalfunktionen wurde durch Kombination der Patch-Clamp-Technik mit Techniken der Molekularbiologie erreicht. Biochemische Arbeiten am elektrischen Organ des Zitterrochens (Elektroplax von *Torpedo*) hatten ergeben, daß der AChR-Kanal aus mehreren Untereinheiten pseudosymmetrisch zusammengesetzt ist, wobei jede Untereinheit zur Bildung des Kanals beiträgt (siehe Übersicht von Karlin^[24]). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß rekombinante

AChR-Kanäle in funktioneller Form in der Plasmamembran von „Gastzellen“ rekonstituiert werden können, wenn man die RNAs, die für die einzelnen Untereinheiten codieren, in das Zytoplasma von *Xenopus-laevis*-Oocyten injiziert (siehe Übersicht von Miledi et al.^[25]). Nach der Identifizierung der Gene, die die Untereinheiten des AChR-Kanals aus dem elektrischen Organ des Zitterrochen und aus Skelettmuskel codieren, konnten in vitro synthetisierte RNAs dazu benutzt werden, um mutagenetisch modifizierte, rekombinante AChR-Kanäle zu rekonstituieren (siehe Übersicht von Numa^[26]). Messungen von Ganzzell(„whole-cell“-)Strömen in Oocyten, die rekombinante AChR-Kanäle exprimierten, waren wichtig für die Erkenntnis, daß nur bestimmte Kombinationen von Untereinheiten funktionelle AChR-Kanäle bilden. Um funktionelle Eigenschaften von AChR-Kanälen mit Strukturdaten in Beziehung zu setzen, waren jedoch Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen von rekombinanten AChR-Kanälen erforderlich.

Da die Plasmamembran von Oocyten von einer Vitellinhülle umgeben ist, hat die Patch-Pipette keinen Zugang zur Plasmamembran. Die Vitellinhülle kann entfernt und die glatte Plasmamembran ohne Schädigung exponiert werden, indem man die Oocyte kurzzeitig einer stark hypertonen Kaliumlösung aussetzt. Dabei schrumpfen die Oocyten, und die Vitellinschicht kann mechanisch entfernt werden, wodurch die glatte Plasmamembran freigelegt wird^[27]. Diese Prozedur ermöglichte es uns, Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen mit rekombinanten DNA-Techniken zu kombinieren und strukturelle Determinanten der AChR-Kanalfunktion aufzuklären. Zwei Probleme, die eng miteinander verbunden sind – die Aufklärung der molekularen Basis der Isoformen des Endplattenkanals und die Identifizierung der strukturellen Determinanten der inneren Kanalwand –, wurden in Zusammenarbeit mit einer Gruppe von Molekularbiologen aus den Labors von S. Numa und V. Witzemann gelöst.

Isoformen von rekombinanten AChR-Kanälen: Die molekulare Unterscheidung der beiden Isoformen des Endplattenkanals (Abb. 5) wurde durch Experimente ermöglicht, bei denen die cRNAs der fünf Untereinheiten des ACh-Rezeptor vom Muskel in Oocyten injiziert wurden; dies resultierte in der funktionellen Expression von zwei Isoformen des AChR-Kanals. Nach der Injektion von cRNAs, die für die α -, β -, γ - und δ - oder alternativ die α -, β -, δ - und ϵ -Untereinheiten codieren, wurden zwei funktionell unterschiedliche, rekombinante Isoformen gebildet (Abb. 6A, B). Die funktionellen Eigenschaften der rekombinanten Isoformen des AChR-Kanals ähnelten denen der beiden nativen Isoformen des AChR-Kanals, die in Muskelmembranen vorkommen^[28]. Sowohl die Amplitude als auch die mittlere Dauer der Einzelkanalströme in der Oocyte waren ähnlich wie die der Elementarströme in Skelettmuskeln des Rindes (Abb. 6C) oder der Ratte^[28–30]. Offensichtlich setzen sich die nativen Isoformen des AChR-Kanals aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammen; im Falle des AChR-Kanals handelt es sich um einen Austausch zwischen der γ - und der ϵ -Untereinheit (Abb. 6D, E).

Differentielle Regulation der Gene für die γ - und die ϵ -Untereinheit: Der molekulare Mechanismus, der der Veränderung der Eigenschaften des Endplattenkanals durch den Austausch einer Untereinheit zugrundeliegt, ist ein Umschalten

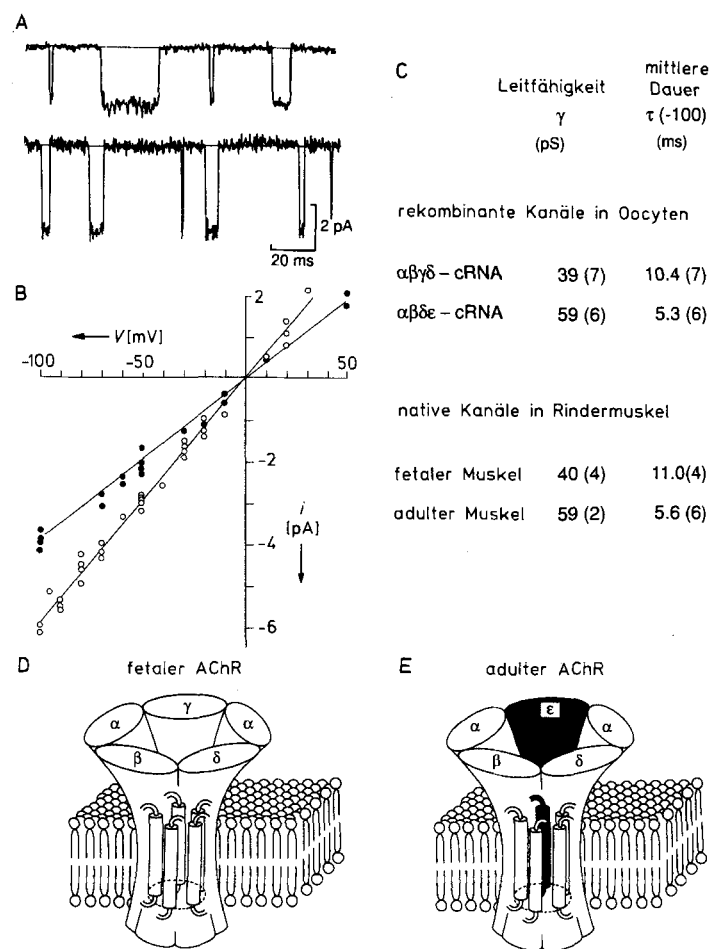


Abb. 6. Isoformen des Endplattenkanals. A, B) Einzelkanalströme und Leitfähigkeiten von rekombinanten AChR-Kanälen, exprimiert in *Xenopus*-Oocyten, denen vorher cRNAs injiziert wurden, die für die Kombination der Untereinheiten α , β , γ und δ (obere Registrierungen und gefüllte Symbole) oder α , β , δ und ϵ (untere Registrierung und offene Symbole) des Rindermuskel-AChR-Kanals codieren. C) Leitfähigkeit und mittlere Offenzeiten der beiden Isoformen der rekombinanten und nativen AChR-Kanäle des Rindermuskels (verändert aus [28]). D, E) Schemazeichnungen der Zusammensetzung der Endplattenkanal-Subtypen im fetalen und adulten Skelettmuskel aus verschiedenen Untereinheiten. Die Struktur des AChR-Kanals ist schematisch nach Unwin [31] gezeichnet.

in der Expression der Gene, die für die γ - und die ϵ -Untereinheit codieren, kurz nach der Geburt. Die Analyse der Gesamt-RNAs in Muskeln aus unterschiedlichen postnatalen Phasen zeigt, daß sich der Anteil der spezifischen RNAs für die γ - und ϵ -Untereinheit während der postnatalen Entwicklung reziprok verschiebt^[32, 33]. Diese differentielle Regulation ist durch Unterschiede in den regulatorischen Sequenzen der Gene für die γ - und ϵ -Untereinheit und in deren Abhängigkeit von neuronalen und myogenen Faktoren bedingt^[30, 34, 35]. In den meisten Zellen, einschließlich Neuronen, werden Kanalisoformen exprimiert, die häufig in Form eines Mosaiks colokalisiert sind. Die Regulation des Musters von Kanalisoformen durch differentielle Expression von Genen für Kanaluntereinheiten könnte ein Mechanismus sein, durch den langzeitige (plastische) Änderungen der chemischen und elektrischen Erregbarkeit von Nervenzellen zustandekommen (siehe Übersicht von Sakmann et al.^[23]).

Molekulare Determinanten des Ionentransports: Die Arbeiten von Hille^[36] hatten gezeigt, daß der Endplattenkanal eine kationenselektive Pore mit einem Innendurchmesser

von etwa 6 Å bildet. Erste Einsichten in die molekularen Determinanten des Ionentransports durch den AChR-Kanal ergaben sich, als in den Untereinheiten Sequenzdomänen identifiziert wurden, die an der Bildung der inneren Wandung des Kanals beteiligt sein könnten. Konventionelle Strommessungen an *Xenopus*-Oocyten, denen mutagenisierte cRNAs von AChR-Untereinheiten und solche vom Wildtyp coinjiziert wurden, ergaben nur unklare Ergebnisse bezüglich der Funktion von bestimmten Domänen in den Untereinheiten^[37]. Untereinheitenspezifische Unterschiede im Schaltverhalten und in der Leitfähigkeit von verschiedenen Kanalisformen konnten jedoch durch Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen an isolierten Membranarealen beobachtet werden. Bei diesen Messungen wurden Art und Konzentration der Ionen auf beiden Seiten der Membran variiert^[12]. Diese methodischen Vorteile wurden dazu ausgenutzt, wichtige funktionelle Domänen von AChR-Untereinheiten zu lokalisieren.

Hybride Kanäle und chimäre Untereinheiten: Das Schaltverhalten und die Leitfähigkeit von rekombinanten AChR-Kanälen, die aus homologen Untereinheiten von verschiedenen Spezies wie Zitterrochen (*Torpedo californica*) und Rind (*bos taurus*) zusammengesetzt sind, hängt von der besonderen Kombination der coinjizierten cRNAs der Untereinheiten ab^[38]. Die δ -Untereinheiten von AChR-Kanälen aus Rindermuskel und aus *Torpedo*-Elektroplax bedingen leicht unterschiedliche Leitfähigkeiten der hybriden Kanäle, wenn sie gemeinsam mit α -, β - und γ -Untereinheiten beider Spezies exprimiert werden^[39]. Diese Beobachtung wurde ausgenutzt, chimäre Untereinheiten aus δ -Untereinheiten von Rind und Zitterrochen zu konstruieren (Abb. 7A, B). Durch Leitfähigkeitsmessungen der rekombinanten Kanäle, die die

chimären δ -Untereinheiten enthielten (Abb. 7C), ließ sich eine Domäne identifizieren, ein als M2 bezeichnetes transmembranes Segment, das entscheidend zu den Leitfähigkeitsunterschieden beiträgt^[39]. Der auffallendste Unterschied in der Aminosäuresequenz bestand in der Anzahl der geladenen Aminosäuren in der extrazellulären Schleife, die das M2-Segment mit dem M3-Segment verbindet (Abb. 7D).

Charakterisierung von Mündung und Wandung des Kanals durch Leitfähigkeitsmessungen an Kanalmutanten: Um diejenigen Aminosäuren zu identifizieren, die für den Ionentransport und die Selektivität wichtig sind, untersuchten wir den Effekt von sequenzspezifischen Punktmutationen im M2-Transmembransegment und den benachbarten Regionen auf die Leitfähigkeit der mutierten Kanäle. In jeder Untereinheit konnten jeweils vier homologe Positionen identifiziert werden, an denen sich Aminosäuren befinden, die für den Kationentransport durch den offenen Kanal und dessen Unterscheidungsvermögen für einwertige Kationen von Bedeutung sind.

Anionische Ringe: Die M2-Transmembranregionen, identifiziert durch Kartierung mit chimären δ -Untereinheiten, zeigen in jeder der Untereinheiten an der Grenze des M2-Transmembransegments eine auffallende Häufung von geladenen Aminosäuren (Abb. 8A). Durch Einfügung von Punktmutationen an diesen Positionen, die die Ladung der Aminosäureseitenketten änderten, und Analyse der veränderten Kanaleigenschaften fanden wir, daß im wesentlichen die Nettoanzahl von negativen Ladungen die Leitfähigkeit des Kanals bestimmt, unabhängig davon, in welcher Untereinheit die Mutation vorgenommen wurde. Daraus schlossen wir, daß

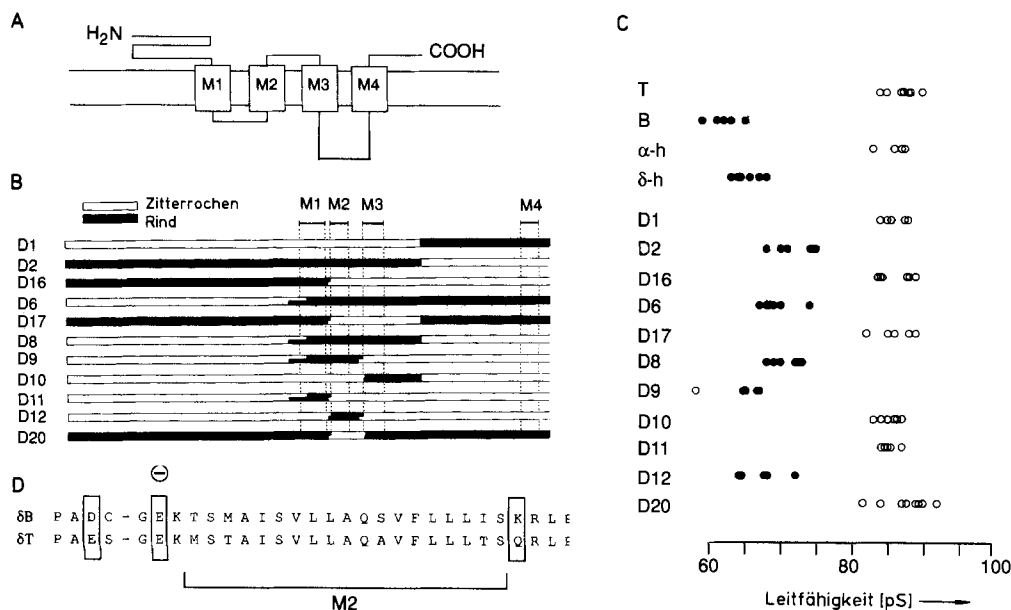


Abb. 7. Lokalisation des M2-Segments als Teil der Kanalwand durch Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen von rekombinanten AChR-Kanälen. A) Schemazeichnung der angenommenen Transmembranfaltung der AChR-Untereinheiten, abgeleitet aus der Hydropathie-Analyse der Aminosäuresequenz. Die N- und C-Termini liegen extrazellulär. B) Konstrukte aus chimären δ -Untereinheiten der AChR-Kanäle von *Torpedo-californica*-Elektroplax und Rinderskelettmuskel. C) Einzelkanal-Leitfähigkeit von rekombinanten AChR-Kanälen, die die in Abb. 7C beschriebenen chimären δ -Untereinheiten enthalten. α -h und δ -h repräsentieren hybride Kanäle, bei denen die α - oder die δ -Untereinheit zwischen Rind und Zitterrochen ausgetauscht wurde. T und B entsprechen den Wildtyp-Kanälen von *Torpedo* bzw. Rind (*bos taurus*). D) Vergleich der Aminosäuresequenzen der δ -Untereinheiten von AChR-Kanälen aus Rindermuskel und *Torpedo*-Elektroplax in ihrem M2-Transmembransegment (Ein-Buchstaben-Code). Man beachte, daß sich die geladenen Aminosäuren in der M2-M3-Schleife unterscheiden (verändert aus [39]).

die geladenen Aminosäuren am Rande des M2-Segments (Abb. 8A) der beteiligten Untereinheiten drei ringartige Strukturen jeweils an der extra- und intrazellulären Öffnung des Kanals bilden^[40, 41].

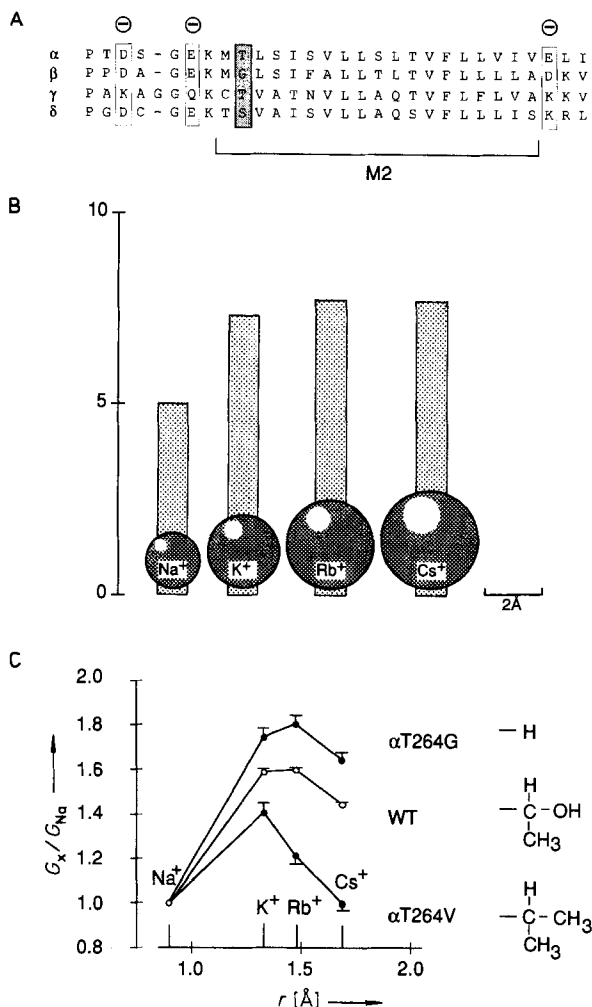


Abb. 8. Lokalisation des Selektivitätsfilters des AChR-Kanals mit Hilfe von Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen von AChR-Kanälen mit Mutationen im M2-Transmembransegment. A) Sequenzvergleich von α -, β -, γ - und δ -Untereinheiten des AChR-Kanals aus Rattenmuskel im M2-Transmembransegment und in angrenzenden Schleifen (Ein-Buchstaben-Code). Häufungen von geladenen Aminosäuren, die anionische Ringe an den Kanalmündungen bilden, wie an AChRs von *Torpedo* nachgewiesen wurde, sind durch Minuszeichen oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die den mittleren anionischen Ring bilden, sind zwischen denen, die den intrazellulären Ring (links), und denen, die den extrazellulären Ring (rechts) bilden, lokalisiert. Die Position der Aminosäuren an der engsten Stelle des Kanals ist durch das graue unterlegte Rechteck gekennzeichnet. B) Schematische Darstellung der verschiedenen Größen und Mobilitäten von Kationen (verändert aus [44]), die zur Untersuchung von Leitfähigkeit und Selektivität benutzt wurden. Die Ionenmobilität (Ordinate) ist in $10^{-4} (\text{cm s}^{-1})/(\text{V cm}^{-1})$ angegeben. C) Leitfähigkeitsverhältnisse G_x/G_{Na} für verschieden große Kationen in Wildtyp-Kanälen (WT) und Kanälen von Mutanten, die in der cytoplasmatischen Region des M2-Segments der α -Untereinheit modifiziert sind (gekennzeichnet durch das graue Rechteck in Abb. 8A), wobei ein Threonin entweder durch Valin (αT264V) oder Glycin (αT264G) ersetzt wurde (verändert aus [43]).

Ionenselektivität: Um die in der Kanalwand lokalisierten Aminosäuren zu identifizieren und um insbesondere jene Aminosäuren zu finden, die die engste Stelle des Kanals bilden, untersuchten wir die funktionellen Eigenschaften von rekombinanten AChR-Kanälen, die im M2-Transmembransegment mutiert waren. Die engste Stelle des Kanals wird häufig als „Selektivitätsfilter“ bezeichnet. Hier bestimmt die

Wechselwirkung der transportierten Ionen und ihrer Wasserhülle mit der Innenwand des Kanals, welche Ionen passieren können und welche nicht (siehe Übersicht von Hille^[36]). Um diejenigen Aminosäuren zu identifizieren, die an dieser Wechselwirkung beteiligt sein könnten, wurden die Leitfähigkeiten von mutierten Kanälen für mehrere Kationen unterschiedlicher Größe und Mobilität gemessen (Abb. 8B). Die Messungen zeigten, daß eine wesentliche Determinante der Ionenselektivität bei Aminosäureresten im M2-Segment liegt. Die Leitfähigkeit des Kanals wird durch Einfügen von Aminosäuren mit verschiedenen Seitenkettenvolumina an dieser Stelle verändert. Seitenketten mit größerem Volumen, wie z.B. diejenige von Valin, erniedrigen die Leitfähigkeit, Seitenketten mit kleinerem Volumen erhöhen die Leitfähigkeit^[42]. Der Effekt dieser Punktmutationen hängt auch von der Größe und Mobilität des zur Leitfähigkeitsmessung eingesetzten Ions ab (Abb. 8C), wobei die Effekte für Cs^+ größer als die für Na^+ ausfallen^[43].

Ein einfaches Modell für das Selektivitätsfilter des AChR-Kanals: Durch Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen an hybriden AChR-Kanälen, die chimäre Untereinheiten enthalten, ließ sich demnach das M2-Transmembransegment als eine wichtige Struktur identifizieren, die zur Bildung der Kanalinnenwand beiträgt. Die genaue Analyse der Effekte von gezielten Punktmutationen hat die Kartierung verfeinert und die Identifizierung von vier Positionen in jeder Untereinheit ermöglicht, wo Aminosäureseitenketten vermutlich mit den permeierenden Kationen wechselwirken. Eine Arbeitshypothese könnte darin bestehen, daß Kationen an der extra- und intrazellulären Mündung wegen der elektrostatischen Anziehung durch negative Ladungen im Bereich der drei anionischen Ringe akkumulieren, während Anionen aufgrund der elektrostatischen Abstoßung ausgeschlossen werden. Die Selektivität zwischen einwertigen Kationen beruht hauptsächlich auf der Siebwirkung der Kanalpore, deren engste Stelle durch Hydroxygruppen enthaltende Aminosäureseitenketten gebildet wird.

Ionenkanäle vermitteln die schnelle synaptische Übertragung zwischen Neuronen

An Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) werden Transmitter freigesetzt, die sich von denen in peripheren Synapsen unterscheiden, wobei die geläufigsten Glycin, GABA, Glutamat und Serotonin sind. Darüber hinaus gibt es bei ZNS-Synapsen zwei Klassen: exzitatorische oder inhibitorische. Die Arbeiten von Eccles^[45] zeigten, daß die synaptische Kommunikation im ZNS, wie in der Peripherie, durch Ionenströme, die durch die postsynaptische Membran fließen, vermittelt wird. Sie lösen exzitatorische oder inhibitorische postsynaptische Potentiale (EPSPs bzw. IPSPs) aus. Je nachdem, welche Ionen die postsynaptischen Ströme tragen, werden die entsprechenden Transmitter als exzitatorisch oder inhibitorisch klassifiziert. Glutamat, Serotonin und ACh aktivieren Kationenströme, die unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch Na^+ und K^+ und in geringerem Maß durch Ca^{2+} getragen werden. GABA und Glycin aktivieren Anionenströme, wobei unter physiologischen Bedingungen Cl^- durch die Zellmembran transportiert wird. Um die Elementarströme zu charakterisieren, die

den postsynaptischen Potentialen im ZNS zugrundeliegen, benutzten wir ursprünglich aus dem fetalen Hirn isolierte Neurone. Sie werden unter Zellkulturbedingungen gehalten und exprimieren Rezeptorkanäle, die durch die oben genannten ZNS-Transmitter aktiviert werden.

Durch Glycin und GABA aktivierte Elementarströme: Ein wichtiges Merkmal der Signalintegration im ZNS ist das Auftreten von postsynaptischer Inhibition zwischen Neuronen. Ausschüttung der Transmitter Glycin oder GABA bewirken durch Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Chlorid eine Verminderung der elektrischen Aktivität des postsynaptischen Neurons. Um herauszufinden, ob Ionenkanäle an dieser erhöhten Cl^- -Leitfähigkeit beteiligt sind, registrierten wir die durch Glycin oder GABA aktivierten Elementarströme in Neuronen, die wir aus fetalem Rückenmark und Hirn isolierten. Sie wurden bei der Isolierung von ihren extrazellulären Hüllen befreit und gestatten somit gute Ableitbedingungen für Patch-Pipetten, die auf die Zellmembran aufgesetzt werden (Abb. 9 A).

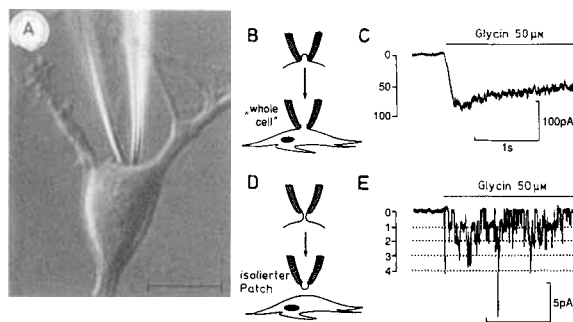


Abb. 9. Durch Glycin aktivierte, verlässliche Ganzzellströme und rechteckförmige Elementarströme in isolierten Neuronen in Zellkultur. A) Mikrophotographie des Zellkörpers eines Neurons und einer die Zellmembran berührenden Patch-Pipette. Der Kalibrierbalken entspricht 10 μm . B) Schemazeichnung der Meßanordnung zur Registrierung von Ganzzellströmen („whole cell“) von einer Nervenzelle. C) Registrierung des Ganzzellstroms nach Applikation des inhibitorischen Transmitters Glycin. Man beachte die verlässliche Stromspur nach der Glycinzugabe. Die Ordinate zeigt die Anzahl der offenen Kanäle. D) Schemazeichnung der Meßanordnung zur Registrierung von Elementarströmen von einem „outside-out“-Patch, der aus einem neuronalen Zellkörper isoliert wurde. E) Registrierung von Elementarströmen nach Applikation von Glycin auf den „outside-out“-Patch. Die Ordinate zeigt die Anzahl der offenen Kanäle (verändert aus [46]).

Zur Charakterisierung der ionischen Bedingungen und der Pharmakologie der durch inhibitorische Transmitter aktivierten Ströme wurde die Ganzzell-Konfiguration benutzt (Abb. 9 B). Sie erlaubt die Registrierung der Ströme, die durch die gesamte Zellmembran fließen. Abbildung 9 C zeigt die Aktivierung eines Membranstroms von mehreren hundert pA in einem Rückenmarksnuron nach Applikation von Glycin. Die Spur des glycinaktivierten Stroms wird zwar „verrauscht“, jedoch sind Elementarereignisse nicht auflösbar. Bei einem isolierten „outside-out“-Patch (Abb. 9 D) löst die Applikation von Glycin in der gleichen Konzentration einen sehr viel kleineren Strom von wenigen pA aus. Die Überlagerung von rechteckförmigen Elementarströmen ist nun leicht sichtbar (Abb. 9 E), so daß angenommen werden kann, daß die glycinaktivierten Ganzzellströme durch die Überlagerung von Elementarströmen mit einheitlicher Amplitude und variabler Dauer zustandekommen. Die glycinaktivierten Elementarströme haben die gleiche Größenord-

nung wie die elementaren Endplattenströme. Hieraus folgt, daß ZNS-Transmitter ihre Wirkung ebenfalls durch Öffnen von Ionenkanälen entfalten.

Coaktivierung von GlyR- und GABAR-Kanälen: Die meisten der aus fetalem ZNS isolierten Neurone weisen sowohl Glycin- als auch GABA-aktivierte Ganzzellströme auf, die durch Cl^- getragen werden. Die entsprechenden Ionenkanäle (GlyR- bzw. GABAR-Kanäle) befinden sich häufig kolokalisiert im selben Membranbereich (Abb. 10 A, B).

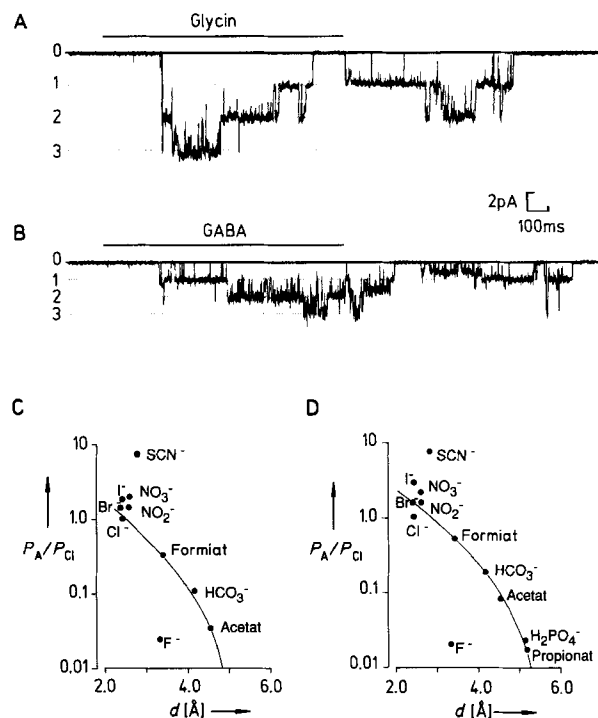


Abb. 10. Coaktivierung von GlyR- und GABAR-Kanälen. A) Durch Glycin aktivierte Einzelkanalströme in einem „outside-out“-Patch aus einem Rückenmarksnuron der Maus. Die Skala zur Linken zeigt an, daß im untersuchten Membranareal mehrere GlyR-Kanäle enthalten sind, weil sich mehrere GlyR-Kanalströme überlagern. B) Durch γ -Aminobuttersäure (GABA) aktivierte Einzelkanalströme im selben Membranbereich wie in Abb. 10 A. Die Überlagerung von Elementarströmen deutet auf die Anwesenheit mehrerer GABAR-Kanäle in diesem Membranbereich hin. C, D) Der Durchmesser der engsten Stelle in GlyR- bzw. GABAR-Kanälen, identifiziert durch Umkehrpotentialmessungen unter biionischen Bedingungen mit Chlorid und anorganischen oder organischen Anionen unterschiedlicher Größe. Die extrapolierten Ausschlußdurchmesser (Stokes-Durchmesser) d von GlyR- und GABAR-Kanälen sind sehr ähnlich: zwischen 4.8 und 5.4 Å (aus [48]).

Die GlyR- und GABAR-Kanäle sind unterschiedliche molekulare Einheiten^[47], die jedoch viele funktionelle Eigenschaften teilen. Durch Messung von Umkehrpotentialen unter biionischen Bedingungen mit Chlorid und anorganischen oder organischen Anionen konnte der Ausschlußdurchmesser der engsten Stelle dieser Kanäle auf 4.8 bzw. 5.4 Å abgeschätzt werden^[48] (Abb. 10 C, D). Dies ist mit dem Durchmesser des Endplattenkanals vergleichbar (siehe Übersicht von Hille^[36]). Diese Ergebnisse – zusammen mit der Aminosäuresequenz der zugrundeliegenden GlyR- und GABAR-Untereinheiten – deuten darauf, daß transmitteraktivierte Kanäle nach gemeinsamen Prinzipien funktionieren und möglicherweise entwicklungsgeschichtlich von gemeinsamen „Vorfahren“ abstammen (siehe Übersicht von Betz^[47]).

Leitfähigkeitsunterzustände von ZNS-Transmitter-aktivierten Kanälen: Die durch Glycin oder GABA aktivierten Elementarströme sind zwar rechteckförmige Ereignisse, doch öffnen beide Transmitter – anders als ursprünglich von uns erwartet – Kanäle mit mehreren Leitfähigkeitszuständen. Einige dieser Unterzustände sind beiden Kanälen gemeinsam; die am häufigsten auftretenden „Hauptleitfähigkeitszustände“ sind aber ungleich^[48, 49]. Glutamat, der wichtigste exzitatorische Transmitter im ZNS, aktiviert ebenfalls Elementarströme im pA-Bereich, die in mehrere Amplitudenklassen fallen; somit dürften auch Glutamat-Rezeptorkanäle (GluR) verschiedene Leitfähigkeitszustände annehmen^[50–52]. Bislang sind der Mechanismus und die mögliche funktionelle Bedeutung von Leitfähigkeitsunterzuständen noch unklar. Die Analyse von rekombinanten Kanälen deutet an, daß die durch GABA, Glycin und Glutamat, die wichtigsten Transmitter des ZNS, aktivierten Kanäle eine große funktionelle Verschiedenheit zeigen. Dies beruht vermutlich auf der Expression von zahlreichen Untereinheiten, die sowohl homo- als auch heterooligomere Isoformen von Kanälen mit Untereinheit-spezifischen Eigenschaften bilden können^[53]. Eine mögliche Hypothese wäre, daß Kanalisoformen in der postsynaptischen Membran colokalisiert sind; eine Möglichkeit, die Effektivität der synaptischen Übertragung zu verändern, wäre dann, den Zusammenbau der Isoformen im postsynaptischen Rezeptormosaik zu modifizieren.

Postsynaptische Ströme in Hirnschnitten

Es erscheint wichtig zum Verständnis von Hirnfunktionen, diejenigen Rezeptorkanal-Isoformen zu charakterisieren, die die postsynaptischen Potentiale in Neuronen von klar definierten Signalwegen im intakten ZNS vermitteln. In der Zellkultur ist die zelluläre Identität der isolierten Nervenzellen nur schlecht definiert, und zudem fehlen ihnen ihre natürlichen Nachbarn, mit denen sie normalerweise spezifische Synapsen bilden. Daher wurde von uns die durch P. Andersen eingeführte Hirnschnitt-Technik modifiziert, um „Ganzzell“- und Einzelkanalmessungen an Nervenzellen in situ durchzuführen, mit dem Ziel, die postsynaptischen, quantalen Leitfähigkeitsänderungen, welche EPSPs und IPSPs erzeugen, sowie die zugrundeliegenden Elementarströme zu charakterisieren.

Das Aufsetzen von Patch-Pipetten auf Nervenzellen im Hirnschnitt: Das Vorgehen, das es uns erlaubte, mit Patch-Pipetten Ganzzell- und Einzelkanalmessungen an Nervenzellen in Hirnschnitten durchzuführen, besteht in einer Modifikation der Prozedur, die für die Freilegung von Endplatten an einzelnen Muskelfasern entwickelt wurde. Zunächst benutzten wir die lokale Applikation von Collagenase, später fanden wir jedoch, daß ein auf die Oberfläche des Hirnschnitts gerichteter, sanfter Strom von extrazellulärer Lösung (Abb. 11 A) ausreichte, um den Zellkörper von visuell identifizierten Nervenzellen (Abb. 11 B, C) in Schnitten von fast jeder Region des Gehirns oder des Rückenmarks freizulegen, so daß mit Patch-Pipetten davon abgeleitet werden konnte^[54].

Quantale Übertragung an ZNS-Synapsen: Die „Ganzzellableitung“ von IPSCs von Körnerzellen des Gyrus dentatus

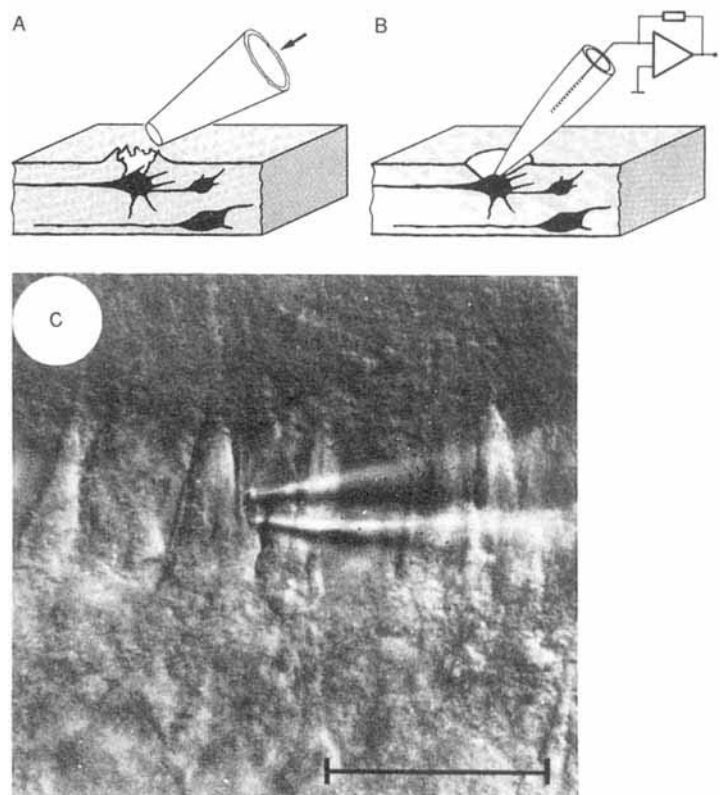


Abb. 11. Freilegung von ZNS-Neuronen in Hirnschnitten zur Strommessung mit Patch-Pipetten. A) Schemazeichnung der Prozedur zur Freilegung des Zellkörpers von einzelnen Neuronen in Hirnschnitten. Das den Zellkörper bedeckende Gewebe wird mit einem Strom extrazellulärer Lösung aus einer kleinen Pipette abgelöst. B) Die Spitze der Patch-Pipette wird auf den freigelegten Zellkörper aufgesetzt. C) Mikrophotographie des freigelegten Zellkörpers einer Pyramidenzelle des Hippocampus in einem Rattenhirnschnitt. Die Spitze der Pipette, mit der die extrazelluläre Lösung appliziert wurde, ist auf der rechten Seite sichtbar. Der Kalibrierbalken entspricht 20 μm (verändert aus [54]).

sowie die Registrierung von Elementarströmen in „outside-out“-Patches zeigten, daß die Leitfähigkeitsänderung während eines quantalen inhibitorischen postsynaptischen Stromes (IPSCs) relativ klein ist (im Bereich von 100–200 pS). Daraus konnte geschlossen werden, daß nur wenige postsynaptische GABAR-Kanäle (20 bis 40 Kanäle) durch die Freisetzung eines Transmitterpaketes aktiviert werden. Nach Modellrechnungen der Größen- und Zeitverläufe von IPSCs scheint es, daß die kleine Anzahl von aktivierbaren GABAR-Kanälen in einer synaptischen Endigung die Hauptursache für diese geringe „quantale“ Leitfähigkeitsänderung ist^[55–57].

Ableitungen von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSCs) von Neuronen, bei denen synaptische Endigungen am oder nahe dem Zellkörper lokalisiert sind, haben ebenfalls die quantale Natur der EPSCs gezeigt, die durch die Wirkung von Glutamat auf postsynaptische Glutamat-Rezeptorkanäle (GluR) des AMPA-Subtyps zustandekommen^[58, 59]. Hierzu gehören z.B. Sternzellen der Schicht IV des visuellen Cortex (Abb. 12 A) oder Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus, wo Moosfasern am Schaft des apicalen Dendriten Synapsen bilden. EPSCs sind ebenfalls durch eine kleine quantale Leitfähigkeitszunahme im Bereich von 100–200 pS (Abb. 12 B, C) charakterisiert, was vermutlich auf eine kleine Anzahl von aktivierten Kanälen zurückzuführen ist.

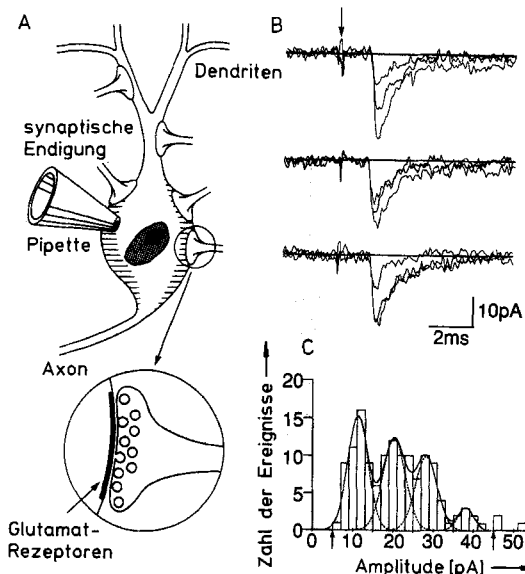


Abb. 12. Exzitatorische postsynaptische Ströme in ZNS-Neuronen, ausgelöst durch die Wirkung von Glutamat auf Glutamat-Rezeptoren. A) Schemazeichnung der Meßanordnung („whole-cell“) zur Registrierung von exzitatorischen, postsynaptischen Strömen (EPSCs) von einem Neuron im Gehirnschnitt. Glutamat wird aus Vesikeln freigesetzt und wirkt auf der postsynaptischen Seite auf Glutamat-Rezeptoren (GluR). B) Beispiele für EPSCs, die durch Glutamatwirkung auf GluR-Kanäle des AMPA-Typs ausgelöst wurden. Der Zeitpunkt der elektrischen Stimulation eines benachbarten Neurons ist durch den Pfeil angegeben. Drei Antworten sind in jeder Abbildung übereinander gelagert, um die Fluktuationen der Spitzenamplitude von EPSCs auf einen konstanten Reiz zu verdeutlichen. Die drei obersten Registrierungen entsprechen jeweils ein, zwei und drei quantalen Ereignissen. C) Amplitudenverteilung von reizabhängigen EPSCs. Die Maxima in dieser Verteilung deuten auf die Quantennatur der EPSCs mit einer Leitfähigkeitsänderung im Bereich von 100 pS pro quantalem Ereignis hin (aus [59]).

Das Schaltverhalten von GluR-Kanälen in ZNS-Synapsen: In zentralnervösen Synapsen ist die zeitliche Änderung der Transmitterkonzentration nach der axonalen Freisetzung ebenso unbekannt wie die Dichte oder die Schalteigenschaften der Rezeptorkanäle. Falls der Transmitter nach Freisetzung wieder rasch aus dem synaptischen Spalt verschwindet, dann spiegelt die Abfallzeit der EPSCs oder IPSCs die Verteilung der Elementarstromauern nach dem Entzug des Transmitters wider. Alternativ könnte der Abfallzeit auch die Desensitisierung der postsynaptischen Rezeptoren, in Anwesenheit einer anhaltend hohen Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt, zugrundeliegen. Um das Schaltverhalten von postsynaptischen Rezeptorkanälen im ZNS zu untersuchen, benutzten wir eine Methode, die es gestattet, Agonisten schnell und kurz an „outside-out“-Patches zu applizieren^[60], die aus anatomisch klar definierten Regionen des Gehirns isoliert wurden (Abb. 13 A, B).

Die Experimente zeigten, daß das Schließen der GluR-Kanäle durch Desensitisierung zwar schnell ist, aber doch wesentlich langsamer als der Übergang der Kanäle in den Ruhezustand nach Entfernung des Agonisten (Abb. 13 C)^[61]. Insbesondere ist die Zeitkonstante der Desensitisierung erheblich langsamer als z.B. der Abfall der EPSCs in Synapsen von Sternzellen^[59]. Daraus kann gefolgert werden, daß – zumindest in diesen Zellen – die Abfallzeit der schnellen EPSCs hauptsächlich den Übergang der GluR-Kanäle aus dem Offenzustand in den ruhenden Geschlossen-zustand nach der schnellen Entfernung des Transmitters aus dem synaptischen Spalt widerspiegelt. Dies bedeutet aber, daß Glutamat nur für eine sehr kurze Zeit im synaptischen

Spalt verbleibt (weniger als 1 ms) und daß EPSCs durch einen GluR-Kanaltyp mit einer sehr kurzen mittleren Öffnungsdauer vermittelt werden. Trotzdem kann immer noch eine schnelle Desensitisierung der GluR-Kanäle stattfinden, sogar während eines kurz dauernden EPSC^[62].

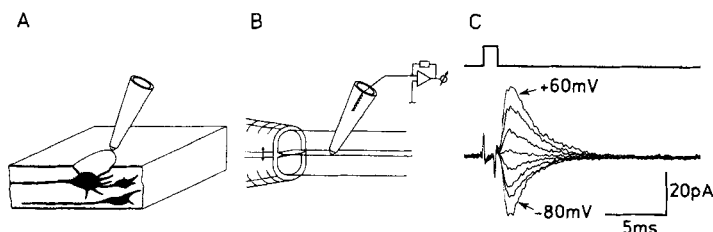


Abb. 13. Charakterisierung von nativen GluR-Kanälen in ZNS-Neuronen im Gehirnschnitt. A) Schemazeichnung der Isolierung eines „outside-out“-Patches aus dem Zellkörper eines Neurons im Gehirnschnitt. B) Schemazeichnung der Anordnung für die schnelle und kurzzeitige Applikation von Agonisten auf einen „outside-out“-Patch. Die Spitze der Pipette, versiegelt mit dem Membranflecken, wird in die Nähe einer zweiläufigen Pipette gebracht, aus der zwei Lösungen strömen: eine Kontroll-Lösung, die andere mit zusätzlich 1 mM L-Glutamat. Die Pipette wird kurz um etwa 10–20 µm mit einem Piezo-Element bewegt, um den Membranflecken einem Glutamatpuls auszusetzen. C) Stromregistrierungen bei verschiedenen Membranpotentialen (verändert in Stufen von 20 mV) nach Applikation von Glutamat auf isolierte Membranbereiche, die aus Hippocampuszellen der Ratte isoliert wurden. Die Dauer der Glutamat-Applikation beträgt 1 ms, wie in der obersten Spur angezeigt. Die Stromamplitude steigt rasch auf den Spitzenwert (in weniger als 1 ms). Die Abfallzeitkonstante des Stromes nach Entfernung des Glutamats beträgt 2–3 ms.

Molekulare Determinanten der GluR-Kanalfunktion: Es stellt sich die Frage, ob das Auftreten von funktionellen GluR-Kanalsubtypen für die schnellen synaptischen Ströme auf dem Zusammenbau der nativen Kanäle aus verschiedenen Kombinationen von Untereinheiten beruht. In Zusammenarbeit mit P. Seeburg verglichen wir die funktionellen Eigenschaften von nativen und rekombinanten GluR-Kanälen. Rekombinante GluR-Kanäle wurden aus verschiedenen Untereinheiten der AMPA-Rezeptorfamilie^[63, 64] zusammengesetzt, und zwar entsprechend dem Gen-Expressionsmuster der Untereinheiten in verschiedenen Bereichen des Gehirns^[65].

Der Vergleich der funktionellen Eigenschaften von rekombinanten homomeren und heteromeren GluR-Kanälen deutete auf die Anwesenheit einer besonderen Untereinheit (GluR-B) in nativen GluR-Kanälen hin^[66], die Eigenschaften wie die Gleichrichtung der Kanalleitfähigkeit und die Permeabilität für zweiwertige Ionen entscheidend bestimmt. Der funktionelle Unterschied beruht auf einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz im vermutlich transmembranen M2-Segment^[67–69]. Die fast ubiquitäre Expression des Gens für die GluR-B-Untereinheit im ZNS bestimmt deshalb vermutlich die Leitfähigkeitseigenschaften und die niedrige Ca^{2+} -Permeabilität von nativen GluR-Kanälen, die schnellen EPSCs zugrundeliegen. Von der differentiellen Expression des GluR-B-Gens hängen vermutlich die Unterschiede in der Ca^{2+} -Permeabilität von nativen GluR-Kanälen in verschiedenen Zelltypen ab, z.B. im Kleinhirn^[70]. Zusätzlich zu der differentiellen Expression des Gens für die GluR-B-Untereinheit scheint es noch einen anderen Mechanismus zu geben, der die Eigenschaften der nativen GluR-Kanäle reguliert. Die GluR-B-Untereinheit kommt in zwei Isoformen vor, die sich in einer einzigen Aminosäure im M2-Transmembransegment unterscheiden (Abb. 14 A–C).

Die beiden Isoformen der Untereinheit vermitteln heteromeren Kanälen unterschiedliche Leitfähigkeitseigenschaften. Der Unterschied in der Aminosäuresequenz ist höchstwahrscheinlich durch das Editieren der spezifischen mRNA für die GluR-B-Untereinheit bedingt^[71].

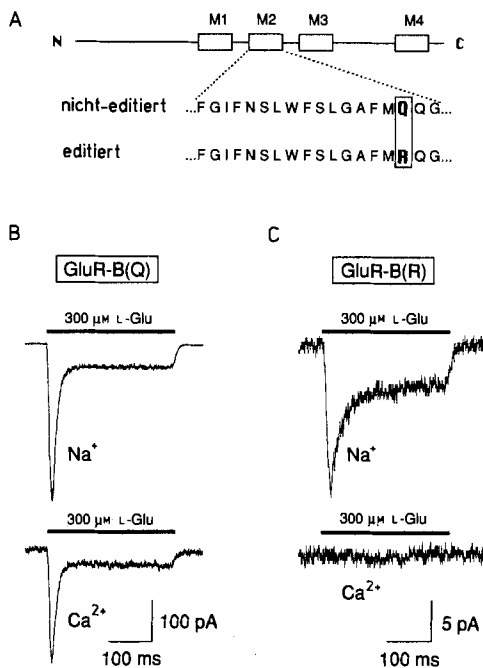


Abb. 14. Rekombinante GluR-Kanalsubtypen in Wirtszellen. A) Unterschiede in der Aminosäuresequenz des M2-Transmembransegments der GluR-B-Untereinheit. Der Rahmen zeigt die Aminosäuren an der Q/R-Position in den beiden Isoformen der Untereinheit [GluR-B(Q) und GluR-B(R)] (Q = Glutamin, R = Arginin). Die Anwesenheit von Arginin an dieser Stelle resultiert aus der Editierung der mRNA. B) Funktionelle Eigenschaften von rekombinanten GluR-Kanälen, die aus nicht-editierten GluR-B(Q)-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Der durch Glutamat aktivierte Einwärtsstrom wird sowohl durch Na^+ als auch durch Ca^{2+} getragen. C) Funktionelle Eigenschaften von rekombinanten GluR-Kanälen, die aus editierten GluR-B(R)-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Bei Anwesenheit hoher extrazellulärer Na^+ -Konzentrationen wird ein Einwärtsstrom aktiviert, bei hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration dagegen nicht, der Kanal ist für Ca^{2+} nicht permeabel (verändert aus [68]).

Ausblick

Patch-Clamp-Techniken sind heute gut etabliert und werden routinemäßig in Verbindung mit anderen Methoden angewendet, z.B. DNA-Rekombinationstechniken oder fluorimetrischen Techniken, um die molekularen Details der Vorgänge, die die synaptische Signalübertragung zwischen Zellen ermöglichen, zu untersuchen. Die Messung von elementaren Strömen vereinfachte die biophysikalische Interpretation der elektrischen Signale, die der schnellen zellulären Kommunikation über Synapsen zugrundeliegen. Sie konnten, zumindest teilweise, auf molekularer Ebene verstanden werden. Zugleich haben Einzelkanal-Leitfähigkeitsmessungen Hinweise auf zahlreiche Isoformen von Rezeptorkanälen geliefert; das gleiche gilt sowohl für spannungsaktivierte Kanäle als auch für solche, die durch sekundäre Botenstoffe aktiviert werden. Dies gilt vor allem für ZNS-Neurone, und die Bedeutung dieses Befundes für die Signalverarbeitung im ZNS muß geklärt werden. Es scheint außerdem, daß es für das Verständnis der integrativen Funk-

tion – d.h. die Bildung von Mustern der elektrischen Aktivität als Ergebnis von vielen synaptischen „inputs“ in Form von IPSPs und EPSPs – zunächst unerlässlich ist, daß die liganden- und spannungsaktivierten Ionenkanäle in den ausladenden dendritischen Bäumen von ZNS-Neuronen genauestens charakterisiert werden. Ebenso wichtig wird die Charakterisierung von Ionenkanälen sein, die für die elektrische Aktivität von Nervenendigungen verantwortlich sind. Messungen mit Patch-Pipetten haben die notwendige Genauigkeit, um elektrische Signale sowohl in Nervenendigungen als auch in Dendriten zu studieren. Dies ist vermutlich eine Grundvoraussetzung, wenn man verstehen möchte, wie Änderungen der synaptischen Übertragung zu Änderungen der funktionellen Verschaltung von neuronalen Signalwegen beitragen, und zwar sowohl unter normalen Bedingungen als auch bei pathologischen Zuständen.

Großen Dank schulde ich meinen Lehrern der Physiologie, Otto Creutzfeldt und Bernard Katz, sowie der Max-Planck-Gesellschaft für die Bereitstellung idealer Forschungsbedingungen. Während der letzten fünf Jahre wurde ich durch das Leibniz-Programm der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch einen Preis der Fondation Louis Jeantet, Genf, unterstützt.

Eingegangen am 16. Januar 1992 [A 868]
Übersetzt von Prof. Dr. Reinhold Penner, Göttingen

- [1] B. Katz, *Nerve, Muscle and Synapse*. McGraw-Hill, New York, 1966.
- [2] B. Katz, *The release of neural transmitter substances*, The Sherrington Lectures X. Liverpool University Press, 1969.
- [3] B. Katz, R. Miledi, *J. Physiol.* **1972**, 224, 665.
- [4] C. R. Anderson, C. F. Stevens, *J. Physiol.* **1973**, 235, 655.
- [5] E. Neher, in *Les Prix Nobel en 1991*, The Nobel Foundation, Stockholm, 1992; *Angew. Chem.* **1992**, 104, 837–843; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, Nr. 7.
- [6] J. Axelson, S. Thesleff, *J. Physiol.* **1959**, 147, 178.
- [7] E. Neher, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1976**, 253, 705.
- [8] W. Betz, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1973**, 230, 673.
- [9] E. Neher, B. Sakmann, J. H. Steinbach, *Pflügers Arch.* **1978**, 375, 219.
- [10] E. Neher, B. Sakmann, *Nature (London)* **1976**, 260, 799.
- [11] B. Sakmann, *Fed. Proc.* **1978**, 37, 2654.
- [12] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. Sigworth, *Pflügers Arch.* **1981**, 391, 85.
- [13] B. Sakmann, J. Patlak, E. Neher, *Nature (London)* **1980**, 286, 71.
- [14] K. L. Magleby, C. F. Stevens, *J. Physiol.* **1972**, 223, 173.
- [15] D. Colquhoun, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1985**, 369, 501.
- [16] D. Colquhoun, B. Sakmann, *Nature (London)* **1981**, 294, 464.
- [17] D. Colquhoun, A. G. Hawkes, *Proc. R. Soc. London B* **1977**, 199, 231.
- [18] D. Colquhoun, A. G. Hawkes, *Phil. Trans. R. Soc. B* **1982**, 300, 1.
- [19] J. Del Castillo, B. Katz, *Proc. R. Soc. London B* **1957**, 146, 369.
- [20] B. Sakmann, H. R. Brenner, *Nature (London)* **1978**, 276, 401.
- [21] A. Michler, B. Sakmann, *Dev. Biol.* **1980**, 80, 125.
- [22] O. P. Hamill, B. Sakmann, *Nature (London)* **1981**, 294, 462.
- [23] B. Sakmann, V. Witzemann, H. Brenner in *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures, Vol 6*. Raven Press, New York, 1992, S. 53–103.
- [24] A. Karlin, *Harvey Lect. Ser.* **1991**, 85, 121.
- [25] R. Miledi, I. Parker, K. Sumikawa in *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures, Vol. 3*. Raven Press, New York, 1989, S. 57–90.
- [26] S. Numa, *Harvey Lect. Ser.* **1989**, 83, 121.
- [27] C. Methfessel, V. Witzemann, T. Takahashi, M. Mishina, S. Numa, B. Sakmann, *Pflügers Arch.* **1986**, 407, 577.
- [28] M. Mishina, T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, S. Numa, C. Methfessel, B. Sakmann, *Nature (London)* **1986**, 321, 406.
- [29] V. Witzemann, B. Barg, Y. Nishikawa, B. Sakmann, S. Numa, *FEBS Lett.* **1987**, 223, 104.
- [30] V. Witzemann, E. Stein, B. Barg, T. Konno, M. Koenen, W. Kues, M. Criado, M. Hofmann, B. Sakmann, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 194, 437.
- [31] N. Unwin, *Neuron*, **1989**, 3, 665.
- [32] V. Witzemann, B. Barg, M. Criado, E. Stein, B. Sakmann, *FEBS Lett.* **1989**, 242, 419.
- [33] V. Witzemann, H. R. Brenner, B. Sakmann, *J. Cell Biol.* **1991**, 114, 125.
- [34] M. Numberger, I. Dürr, W. Kues, M. Koenen, V. Witzemann, *EMBO J.* **1991**, 10, 2957.
- [35] V. Witzemann, B. Sakmann, *FEBS Lett.* **1991**, 282, 259.

- [36] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, 1984.
- [37] M. Mishina, T. Tobimatsu, K. Imoto, K. Tanaka, Y. Fujita, K. Fukada, M. Kurasaki, H. Takahashi, Y. Morimoto, T. Hirose, S. Inayama, T. Takahashi, M. Kuno, S. Numa, *Nature (London)* **1985**, 313, 364.
- [38] B. Sakmann, C. Methfessel, M. Mishina, T. Takahashi, T. Takai, M. Kurasaki, K. Fukuda, S. Numa, *Nature (London)* **1985**, 318, 539.
- [39] K. Imoto, C. Methfessel, B. Sakmann, M. Mishina, Y. Mori, T. Konno, K. Fukuda, M. Kurasaki, H. Bujo, Y. Fujita, S. Numa, *Nature (London)* **1986**, 324, 670.
- [40] K. Imoto, C. Busch, B. Sakmann, M. Mishina, T. Konno, J. Nakai, H. Bujo, Y. Mori, K. Fukuda, S. Numa, *Nature (London)* **1988**, 335, 645.
- [41] T. Konno, C. Busch, E. von Kitzing, K. Imoto, F. Wang, J. Nakai, M. Mishina, S. Numa, B. Sakmann, *Proc. R. Soc. London B* **244**, **1991**, 69.
- [42] A. Villarroel, S. Herlitze, M. Koenen, B. Sakmann, *Proc. R. Soc. London B* **1991**, 243, 69.
- [43] A. Villarroel, B. Sakmann, *Biophys. J.* **1992**, 62, 196.
- [44] P. W. Atkins, M. J. Clugston, *Principles of Physical Chemistry*, Pitman Publishing, London, 1983.
- [45] J. C. Eccles, in *Les Prix Nobel en 1963*, The Nobel Foundation, Stockholm, 1963, S. 26–283; *Angew. Chem.* **1964**, 76, 674–681.
- [46] B. Sakmann, O. P. Hamill, J. Bormann, *J. Neural Transm. Suppl.* **1983**, 18, 83.
- [47] H. Betz, *Biochemistry* **1990**, 29, 3591.
- [48] J. Bormann, O. P. Hamill, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1987**, 385, 243.
- [49] O. P. Hamill, J. Bormann, B. Sakmann, *Nature (London)* **1983**, 305, 805.
- [50] P. Ascher, L. Nowak, *J. Physiol.* **1988**, 399, 227.
- [51] S. G. Cull-Candy, M. M. Usowicz, *Nature (London)* **1987**, 325, 525.
- [52] C. E. Jahr, C. F. Stevens, *Nature (London)* **1987**, 325, 522.
- [53] T. A. Verdoorn, A. Draguhn, S. Ymer, P. H. Seeburg, B. Sakmann, *Neuron* **1990**, 4, 919.
- [54] F. A. Edwards, A. Konnerth, B. Sakmann, T. Takahashi, *Pflügers Arch.* **1989**, 414, 600.
- [55] B. Sakmann, F. Edwards, A. Konnerth, T. Takahashi, *Q. J. Exp. Physiol.* **1989**, 74, 1107.
- [56] F. A. Edwards, A. Konnerth, B. Sakmann, mit Anhang von C. Busch, *J. Physiol.* **1990**, 430, 213.
- [57] C. Busch, B. Sakmann in *The Brain. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1990**, 55, 69–80.
- [58] P. Jonas, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1992**, im Druck.
- [59] P. Stern, F. A. Edwards, B. Sakmann, *J. Physiol.* **1992**, 449, 247; P. Jonas, B. Sakmann, *ibid.* **1992**, 446, 515 P.
- [60] C. Franke, H. Hatt, J. Dudel, *Neurosci. Lett.* **1987**, 77, 199.
- [61] D. Colquhoun, P. Jonas, B. Sakmann, *J. Physiol.* (1992) im Druck.
- [62] L. O. Trussell, G. D. Fischbach, *Neuron* **1989**, 3, 209.
- [63] M. Hollmann, A. O'Shear-Greenfield, W. Rogers, S. Heinemann, *Nature (London)* **1989**, 342, 643.
- [64] K. Keinänen, W. Wisden, B. Sommer, P. Werner, A. Herb, T. A. Verdoorn, B. Sakmann, P. H. Seeburg, *Science (Washington, D.C.)* **1990**, 249, 556.
- [65] B. Sommer, K. Keinänen, T. A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Köhler, T. Takagi, B. Sakmann, P. H. Seeburg, *Science (Washington, D.C.)* **1990**, 249, 1580.
- [66] M. Hollmann, M. Hartley, S. Heinemann, *Science (Washington, D.C.)* **1991**, 252, 851.
- [67] T. A. Verdoorn, N. Burnashev, H. Monyer, P. H. Seeburg, B. Sakmann, *Science (Washington, D.C.)* **1991**, 252, 1715.
- [68] R. I. Hume, R. Dingleline, S. Heinemann, *Science (Washington, D.C.)* **1991**, 253, 1028.
- [69] N. Burnashev, H. Monyer, P. H. Seeburg, B. Sakmann, *Neuron* **1992**, 8, 189.
- [70] A. Khodorova, N. Burnashev, *J. Physiol.* **1991**, 446, 516 P.
- [71] B. Sommer, M. Köhler, R. Sprengel, P. H. Seeburg, *Cell* **1991**, 67, 11.

Weiche Materie (Nobel-Vortrag)**

Von Pierre-Gilles de Gennes*

Was verstehen wir unter weicher Materie? Die Amerikaner ziehen den Begriff „komplexe Flüssigkeiten“ vor, und dieser bezeichnet in der Tat zwei der wichtigsten Eigenschaften weicher Materie: Komplexität und Flexibilität.

1) **Komplexität:** In einem gewissen, vereinfachten Sinn kann man sagen, daß die Entwicklung der modernen Biologie von Studien einfacher Modellsysteme (Bakterien) ihren Ausgang nahm und heute beim Studium komplexer multi-zellulärer Organismen (Pflanzen, wirbelloser Tiere, Wirbeltiere...) angelangt ist. In ähnlicher Weise baut auf der explosionsartigen Entwicklung der Atomphysik in der ersten Hälfte unseres Jahrhunderts das Studium der weichen Materie auf, d. h. der Polymere, Tenside, Flüssigkristalle und Kolloide.

2) **Flexibilität:** Ich möchte dies gern anhand eines uralten „Polymerisationsexperimentes“ von Indianern des Amazonas-Beckens erklären. Sie sammelten den Saft des Gummibaumes und ließen ihn an ihren Füßen kurz „trocknen“ – und schon hatten sie Schuhe. Aus mikroskopischer Sicht enthält die Ausgangssubstanz eine Reihe unabhängiger, flexibler Polymerketten. Der Luftsauerstoff baut einige wenige

Brücken zwischen die Ketten ein, und das Ergebnis ist eine spektakuläre Veränderung: der Wechsel von einer flüssigen zu einer vernetzten Struktur, die auf Zug belastbar ist. Sie ist uns als **Gummi** (auf Französisch: Caoutchouc, eine direkte Übertragung des indianischen Wortes) bestens bekannt. Was an diesem Experiment so verblüfft, ist die Tatsache, daß ein sehr geringfügiger chemischer Eingriff eine so drastische Veränderung der mechanischen Eigenschaften zur Folge hat: Dies ist typisch für weiche Materie.

Andere Polymere wiederum neigen dazu, steife Strukturen aufzubauen. Ein wichtiges Beispiel sind die **Enzyme**. Sie bestehen aus einer langen Kette von Aminosäuren, die sich zu einer mehr oder weniger kompakten Kugel zusammenfaltet. Einige dieser Aminosäuren spielen eine besondere Rolle, sie bilden das aktive Zentrum, das einer spezifischen Erkennung oder Katalyse dient. Jacques Monod stellte schon vor langer Zeit eine interessante Frage. Er sagte: An jedem Punkt der Kette haben wir eine Auswahl von ca. zwanzig Aminosäuren, und wir möchten eine Rezeptorbindungsstelle aufbauen, in der die „aktiven Elemente“ in einer bestimmten räumlichen Form angeordnet sind. Wir können diese aktiven Elemente nicht einfach hintereinander anordnen, denn Orientierung und Position wären dann nicht korrekt. Deshalb brauchen wir zwischen zwei aktiven Elementen einen „Abstandshalter“ (Spacer), d. h. eine Kette von Aminosäuren mit genügend Variationsmöglichkeiten, um eine relativ gute Positionierung der aktiven Elemente an ihren Enden zu ermöglichen. Monods Frage war: Wie lang muß ein Spacer mindestens sein? Es stellte sich heraus, daß diese Länge

[*] Prof. P.-G. de Gennes
Collège de France
11, Place Marcelin-Berthelot, F-75231 Paris Cedex 05 (Frankreich) oder
Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris (ESPCI)
10, Rue Vauquelin, F-75231 Paris Cedex 05 (Frankreich)

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