

Fabian C. Roth
Markus Numberger
Andreas Draguhn

Patch-Clamp- Technik

2. Auflage



Springer Spektrum

Patch-Clamp-Technik

Fabian C. Roth · Markus Numberger ·
Andreas Draguhn

Patch-Clamp-Technik

Mit einem Geleitwort von Bert Sakmann

2. Auflage

 **Springer** Spektrum

Fabian C. Roth
Department of Molecular Medicine
Institute of Basic Medical Sciences
University of Oslo
Oslo, Norway

Markus Numberger
GF, Health Content
Kandel, Rheinland-Pfalz, Deutschland

Andreas Draguhn
Institut für Physiologie und
Pathophysiologie, Medizinische Fakultät
Universität Heidelberg
Heidelberg, Baden-Württemberg
Deutschland

Foreword by
Bert Sakmann
Max-Planck-Institut für biologische
Intelligenz
Martinsried, Deutschland

ISBN 978-3-662-66052-2 ISBN 978-3-662-66053-9 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-66053-9>

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl.: © Spektrum Akademischer Verlag 1996

2. Aufl.: © Der/die Herausgeber bzw. der/die Autor(en), exklusiv lizenziert an Springer-Verlag GmbH, DE, ein Teil von Springer Nature 2023

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag, noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Ursprünglich erschienen bei Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996

Planung/Lektorat: Sarah Koch

Springer Spektrum ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer-Verlag GmbH, DE und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Heidelberger Platz 3, 14197 Berlin, Germany

Geleitwort

„Patch pipettes will be more useful than initially thought.“ Diese Voraussage von Fred Sigworth hat sich in der Tat bewahrheitet. Ursprünglich dienten Patch-Pipetten zur Messung von „elementaren“ Strömen durch einzelne Ionenkanäle in der Membran von Muskelfasern des Frosches. Heute benutzen Elektrophysiologen Patch-Pipetten zur Untersuchung von Membranströmen, -potentialen und -kapazitäten in so unterschiedlichen Präparaten wie Erythrozyten, Pflanzenzellen und Neuronen. Erweiterte Anwendungen der Patch-Clamp-Technik erlauben inzwischen, diese Prozesse mit mehreren Pipetten in natürlichen Geweben und sogar in Tieren während des Verhaltens zu messen. In Kombination mit modernen bildgebenden Verfahren rückt damit ein detailliertes Verständnis der Signalflüsse in komplexen Netzwerken wie der Hirnrinde in Reichweite. Das vorliegende Buch gibt einen kompetenten Überblick über die weitgespannten Möglichkeiten, elektrische Signale in lebendem Gewebe mit hoher Auflösung zu registrieren und die „Gespräche“ von Zellen untereinander sozusagen zu „belauschen“.

Bert Sakmann

Vorwort

1991 wurden Erwin Neher und Bert Sakmann mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet – als Anerkennung für ihre Arbeiten zur „Funktion einzelner zellulärer Ionenkanäle“. 15 Jahre vorher hatten sie eine Methode entwickelt, mit der sich der Strom durch einzelne Ionenkanäle in der Membran lebender Zellen messen lässt. Eine Entdeckung, die nach Auffassung des deutsch-britischen Neurophysiologen und Nobelpreisträgers Bernard Katz „sowohl hinsichtlich der ästhetischen Befriedigung als auch der wissenschaftlichen Bedeutung für die Biologie dem Nachweis atomarer Teilchen vor 50 Jahren gleichkommt“.

Die Patch-Clamp-Technik ist heute eine der wichtigsten neurophysiologischen Arbeitsmethoden. Ihre Anwendung hat in der biomedizinischen Grundlagenforschung bedeutende Erkenntnisse über die Funktion und die Eigenschaften von Ionenkanälen erbracht, und auch aus der angewandten pharmakologischen Forschung ist sie inzwischen nicht mehr wegzudenken. Aus diesen Gründen spielt die Methode in der theoretischen und praktischen Ausbildung von Studierenden der Biologie, Biochemie, Medizin und Pharmazie und im Rahmen von Bachelor-, Master- und Doktorarbeiten heute eine wichtige Rolle.

Das vorliegende Buch richtet sich an fortgeschrittene Studierende der genannten Fächer sowie an Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, welche die Technik besser verstehen und/oder sich aneignen wollen. Es gibt konkrete Antworten auf die wichtigsten dabei auftretenden Fragen, zum Beispiel: Was versteht man genau unter „Patchen“? Welche Anwendungsmöglichkeiten bietet die Patch-Clamp-Technik? Wie baut man einen entsprechenden Messstand auf? Wie geht man bei Patch-Clamp-Experimenten praktisch vor?

Seit der ersten Auflage dieses Buches, die vor mehr als 25 Jahren erschienen ist, hat sich einiges verändert, und natürlich hat sich auch die Patch-Clamp-Technik weiterentwickelt. Daher sind fast alle Abbildungen neu, und auch die meisten Kapitel mussten weitgehend umgeschrieben werden. Einiges, wie die speziellen Anwendungen in Kap. 6 oder das Kap. 7 über die Dokumentation und Verarbeitung von Daten, sind hinzugekommen. Auch in dieser Auflage haben wir versucht, den Einstieg in die Fachliteratur zu erleichtern, indem wir besonders relevante klassische und wichtige aktuelle Veröffentlichungen jeweils am Ende der Kapitel zitieren.

Insgesamt wollten wir unseren ursprünglichen Ansatz beibehalten und eine praktische Anleitung und ein Lehrmittel schaffen, das diese Arbeit für Lehrende wie Lernende wirklich erleichtert. Wir hoffen, dass uns dies, auch dank der Unterstützung durch zahlreiche Kolleginnen und Kollegen, gelungen ist. Für eventuelle Fehler sind selbstverständlich wir verantwortlich – Kritik und Verbesserungsvorschläge nehmen wir gerne entgegen.

Oslo
Kandel
Heidelberg
im Dez. 2022

Fabian C. Roth
Markus Numberger
Andreas Draguhn

Danksagung

Da wir möglichst viele und konkrete praktische Tipps in den Text aufnehmen wollten, haben wir Teile des Manuskripts an Freunde und Kollegen verschickt. Für die sorgfältige Durchsicht und die zahlreichen Ratschläge, Ergänzungen und zur Verfügung gestellten Abbildungen möchten wir allen Helfern an dieser Stelle herzlich danken. Namentlich seien hier (in alphabetischer Reihenfolge) hervor-gehoben:

1. Auflage: Dr. Thomas Berger (Freiburg), Dr. Gabi von Blankenfeld (Stockholm), Astrid Düerkop (Berlin), Dr. Claudia Eder (Berlin), Dr. Siegrun Gabriel[†] (Berlin), Prof. Dr. Helmut Haas (Düsseldorf), Patricia Hoffmann (Berlin), Dr. Frank Kirchhoff (Berlin), Kerstin Lehmann (Berlin), Carsten Ohlemeyer (Berlin), Prof. Dr. Peter Ruppertsberg (Tübingen), Dr. Rudolf Schubert (Rostock), Sebastian Schuchmann (Berlin), Dr. Monika Stengl (Regensburg), Dr. Peter Stern (Frankfurt), Prof. Dr. Walter Stühmer (Göttingen) und Dr. Heinz Terlau (Göttingen).

2. Auflage: Isabella Boccuni (Heidelberg), Dr. Claus Bruehl (Heidelberg), Dr. Alexei Egorov (Heidelberg), Bernd Polder (Tamm), PD Dr. Andre Rupp (Heidelberg) und Carina Knudsen (Oslo).

Außerdem möchten wir uns an dieser Stelle herzlich bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Springer-Verlags, Heidelberg, für die professionelle und geduldige Begleitung bedanken.

Unser spezieller Dank gilt Prof. Dr. Erwin Neher für die kritische Durchsicht des Manuskripts der 1. Auflage und seine wertvollen Hinweise und Verbesserungsvorschläge, Prof. Dr. Bert Sakmann, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, ein Geleitwort zu verfassen, und Prof. Uwe Heinemann[†] (Berlin), ohne dessen wohlwollende Unterstützung die 1. Auflage nicht möglich gewesen wäre.

Fabian C. Roth
Markus Numberger
Andreas Draguhn

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

Abkürzungsverzeichnis

A/D-Wandler	Analog-Digital-Wandler
AC	Wechselstrom (alternating current)
AChR	Acetylcholinrezeptor
ADC	Analog-Digital-Wandler (analog-to-digital-converter)
AIS	Axon Initialsegment
BAPTA	Calcium-spezifische Aminopolycarbonsäure (Ca^{2+} -Puffer)
C	Kapazität
CC	Current-Clamp
C_f	Feedback-Kapazität
C_m	Membrankapazität
CNG	cyclic nucleotide-gated
C_{pip}	Pipettenkapazität
DAC	Digital-Analog-Wandler (digital-to-analog-converter)
DC	direct current
DIC	differential interference contrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
dSEVC	discontinuous single-electrode voltage clamp
E	Gleichgewichtspotential
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (Ca^{2+} -Puffer)
E_{ion}	Gleichgewichtspotential für bestimmte Ionen
EKG	Elektrokardiogramm
ELN	electronic lab notebook
EMG	Elektromyogramm
ENG	Elektroneurografie
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
G	Leitfähigkeit
G_m	Membranleitfähigkeit
HCN	hyperpolarization activated and cyclic nucleotide gated
HEPES	2-Ethansulfonsäure (pH-Puffer)
I	Strom
I_{com}	Kommandostrom
I_{dc}	Strom aus Dynamic-Clamp Modell

I_{hold}	Haltestrom
I_{inj}	Injizierter Strom
I_{max}	Maximaler (gemessener) Strom
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
IR	Infrarot
IR-DIC	infrared differential interference contrast
I-V-Converter	Strom-Spannungs-Wandler
LFP	Lokales Feldpotential
LJP	Übergangspotential (liquid junction potential)
MEAs	Multielektrodenarrays
MEG	Magnetenzecephalogramm
NMDG	N-Methyl-D-Glutamin
OPA	Operationsverstärker (operational amplifier)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PSP	Postsynaptisches Potential
PTFE	Polytetrafluorethen
qPCR	quantitative PCR
R	Widerstand
R_f	Feedback-Widerstand
R_m	Membranwiderstand
R_{pip}	Pipettenwiderstand
R_s	Serienwiderstand
RT	Reverse Transkription
SEVC	single-electrode voltage clamp
TEVC	two-electrode voltage clamp
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (pH-Puffer)
TTX	Tetrodotoxin
U	Spannung
U_{aus}	Ausgangsspannung (am OPA)
U_{inj}	Spannungssignal für Strominjektion
U_m	Membranpotential
U_{pip}	Pipettenpotential
U_{soll}	Sollpotential
UV	Ultraviolett
VC	Voltage Clamp
WD	Arbeitsabstand (working distance)
WI	Wasserimmersion
ZNS	Zentralnervensystem

Die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik

1

Elektrische Vorgänge an biologischen Membranen sind universal verbreitet. Sie tragen zu elementaren Funktionen der Osmoregulation, des Stoffwechsels und der Exozytose bei, besonders aber auch zur elektrischen Signalübertragung in Neuronen, Sinnes- und Muskelzellen. Kurz: Ohne Kenntnis elektrophysiologischer Mechanismen sind zahlreiche Lebensvorgänge (und deren Störung bei Krankheiten) nicht zu verstehen.

Für die Funktion von Nerven- und Muskelzellen sind unter anderem Ionenströme notwendig, die durch Ionenkanäle fließen. Bei jeder unserer Bewegungen, jedem Sinneseindruck, jedem Gedanken und bei jedem Herzschlag öffnen und schließen sich solche Ionenkanäle. Sie spielen nicht nur bei elektrisch erregbaren Zellen eine wichtige Rolle, sondern sind in den Zellmembranen aller tierischen und pflanzlichen Organismen, in den Membranen einiger ihrer Organellen und auch bei Mikroorganismen vorhanden. Mit der Patch-Clamp-Technik, die wir in diesem Buch vorstellen wollen, können einzelne Ionenkanäle, aber auch Ströme durch die gesamte Zellmembran detailliert untersucht werden. Sie ist seit ihren Anfängen in den 1970er-Jahren inzwischen zu einer weitverbreiteten Standardmethode für die Messung elektrischer Vorgänge in Zellen geworden. In diesem Buch wollen wir ihre theoretischen Grundlagen, die praktische Durchführung und die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten kompakt und „nutzerfreundlich“ darstellen.

1.1 Bioelektrizität

Dass Nerven- und Muskelzellen mithilfe von elektrischen Signalen arbeiten, ist eine relativ alte Erkenntnis. So glaubte bereits der italienische Arzt und Naturforscher Luigi Galvani (1727–1798) in seinem 1791 veröffentlichten Buch *De viribus electricitatis in motu muscularis commentarius* an das Vorhandensein einer „tierischen Elektrizität“. Er konnte sie aber trotz zahlreicher Experimente nie

schlüssig beweisen. Er stellte sich vor, dass die Oberfläche des Muskels mit „der einen“, sein Inneres mit „der anderen“ Elektrizität geladen sei und der Nerv, der in das Innere eintritt, eine leitende Brücke dazwischen bildet. Erst 1838 gelang es dem Italiener Carlo Matteucci (1811–1868), den elektrischen Strom eines Muskels direkt zu messen. Er behauptete, dass die Oberfläche eines Muskels positive, sein Inneres negative Spannung besäße.

Durch die umfassenden Untersuchungen über tierische Elektrizität (zwischen 1848 und 1884) von Emil du Bois-Reymond (1818–1896), Direktor des Instituts für Physiologie der Charité in Berlin, wurde schließlich die wissenschaftliche Elektrophysiologie begründet. Du Bois-Reymond maß den Nerven- und Muskelstrom mit Zink-/Zinksulfatelektroden und zeigte, dass bei Reizung eines Nerven oder Muskels eine „negative Schwankung“ dieses Stroms auftritt, also „dass jede Stelle des Muskels, welche sich in Erregung befindet, sich negativ gegen eine ruhende Stelle verhält“ (nach Bernstein 1912). Außerdem widerlegte er die bis dahin geltende Überzeugung, dass Nerven nur in eine Richtung leiten könnten. Zwei Jahre später bestimmte der Berliner Physiker und Physiologe Hermann von Helmholtz (1821–1894) die Geschwindigkeit der Reizleitung im Froschnerv auf 26–30 m/s. Wie Zellen jedoch solche elektrischen Phänomene erzeugen, blieb noch lange Zeit völlig unbekannt.

1.2 Die Ionentheorie

Ende des 19. Jahrhunderts postulierte man bereits, dass Zellen ein leitfähiges Zytoplasma und eine Zellmembran aus Lipiden besitzen, die zwar kaum elektrisch leitfähig, aber für Wasser und viele niedermolekulare Stoffe durchlässig sei. Deswegen schlug der Wiener Physiologe Ernst von Brücke (1819–1892) vor, dass in dieser Membran Kanäle enthalten sein könnten, die wie Poren den Durchtritt von Wasser erlauben, größere gelöste Stoffe aber ausschließen. Später wies der englische Physiologe William Bayliss (1860–1924) darauf hin, dass solche wassergefüllten Kanäle auch Ionen leiten könnten, ohne dass diese ihre Hydratationshülle verlieren müssten. Der deutsche Physiologe Julius Bernstein (1839–1917) entwickelte schließlich eine Hypothese, nach der die ungleiche Ionenverteilung an einer selektiv permeablen Zellmembran für das Ruhepotential verantwortlich sei. Dessen Höhe berechnete er – unter der Annahme, dass Kalium dabei die Hauptrolle spielt – auf -68 mV. Weiter schreibt er: „Das Membranpotential nimmt bei Reizung ab“ und erklärt dies mit einer Zunahme der Ionenpermeabilität der Membran (Bernstein 1912). Seine fast visionäre „Membrantheorie der bioelektrischen Ströme“, die er 1912 in seinem Buch *Elektrobiologie* zusammenfasste, soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass bis in die 1930er-Jahre „die führenden Axonologen durch und durch skeptisch waren, sowohl was die Membrantheorie im Allgemeinen betraf, wie auch gegenüber der Theorie lokaler Ströme“ (Hodgkin 1976).

1.2.1 Die Spannungsklemme

Erst Ende der 1930er-Jahre entwickelten die US-amerikanischen Biophysiker Kenneth S. Cole (1900–1984) und Howard J. Curtis (1906–1972) die Technik der Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Technik) und wiesen damit nach, dass sich die Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle bei Erregung erhöht. Cole (1979) erinnerte sich später an dieses klassische Experiment: „Hodgkin besuchte uns, als wir gerade die Leitfähigkeitsänderung auf dem ‚Oszi‘ hatten. Er war so aufgeregt, wie ich ihn niemals zuvor gesehen hatte und hüpfte herum, während wir es erklärten.“

Ihre Experimente schienen Bernsteins Hypothese zu bestätigen; sie zeigten deutlich, dass für die elektrischen Signale der Nervenzellen – die Aktionspotentiale – Ionenströme verantwortlich waren; sie enthüllten aber nicht, welche Ionen beteiligt waren und wie diese Ströme zustande kamen. Theoretisch könnten die Ionen passiv durch Poren in der Membran fließen oder aber von Transportermolekülen (*carriers*; Pumpen) aktiv durch die Membran bewegt werden.

1.2.2 Hodgkin und Huxley

Die beiden Engländer Alan Hodgkin (1914–1998) und Andrew Huxley (1917–2012) gingen von einem Carrier-Modell aus, als sie Mitte der 1930er-Jahre begannen, die Entstehung des Aktionspotentials am Riesenaxon des Tintenfisches zu untersuchen. Nach einer kriegsbedingten Unterbrechung veröffentlichten sie zwischen 1949 und 1952 eine Reihe von Arbeiten, in denen sie zeigten, wie ein Aktionspotential tatsächlich entsteht. Mithilfe der von Cole und Curtis entwickelten Spannungsklemme entdeckten sie, dass die neuronale Erregung durch spezifische Ströme von Natrium- und Kaliumionen durch die Zellmembran hervorgerufen wird, und konnten diese Ionenströme in einem grundlegenden mathematischen Modell rechnerisch voneinander trennen.

Hodgkin und Huxley hatten ihre Versuche durchgeführt, um die Carrier-Hypothese zu testen, mussten aber, wie Hodgkin sich später erinnerte, „enttäuscht feststellen“, dass dieses Modell offensichtlich falsch war:

„Wir hatten mit dem Ziel angefangen, eine Carrier-Hypothese zu überprüfen, und glaubten, auch wenn diese nicht richtig war, trotzdem aus den riesigen Datenmengen, die wir gesammelt hatten, einen Mechanismus ableiten zu können. Diese Hoffnung schwand aber, je weiter die Analyse fortschritt. Wir realisierten bald, dass das Carrier-Modell bestimmte Ergebnisse nicht zu erklären vermochte, so zum Beispiel die fast lineare Strom-Spannungs-Beziehung, und dass wir den *Carrier* durch eine Art spannungsabhängiges Tor ersetzen mussten.“ (Hodgkin 1976)

Unter der Annahme solcher spannungsabhängiger und ionenselektiver „Tore“ entwickelten Hodgkin und Huxley schließlich eine Reihe von Gleichungen, mit denen sich Höhe und Zeitverlauf des Aktionspotentials erstaunlich genau erklären

ließen. Für diese Leistung erhielten die beiden Wissenschaftler 1963 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Hodgkin 1963; Huxley 1963). Hodgkin und Huxley konnten mit ihren revolutionären Arbeiten bereits die wichtigsten Eigenschaften der spannungsabhängigen Tore voraussagen; es vergingen jedoch noch mehr als 20 Jahre, bis man diese Tore (oder Kanäle, wie wir sie heute nennen) tatsächlich nachweisen konnte.

1.3 Die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik

Das war in etwa der Stand der Forschung, als Bert Sakmann und Erwin Neher am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München ihre Doktorarbeiten anfertigten. 1969 und 1970 erschienen dann, wie sich beide später erinnerten (Neher und Sakmann 1992), zwei „faszinierende Arbeiten“ von Ross Bean, Steven Hladky und Denis Haydon. Diese hatten die ersten Ionenkanäle in künstlichen Membranen beobachtet.

1.3.1 Die ersten Kanäle mit der Black-Film-Technik

Bean, Hladky und Haydon konstruierten eine Messapparatur mit zwei Kammern, die durch eine Teflonwand getrennt waren, in der sich ein kleines Loch befand. Die beiden Kompartimente füllten sie mit Salzlösung und strichen dann einen Tropfen Phospholipidlösung über das Loch in der Trennwand. Das Lipid bildet ähnlich einer Seifenblase einen dünnen Film über dem Loch, der durch die äußeren Kräfte (Auftrieb des Öls, Wasserdruck und elektrostatische Anziehung der beiden Wasserkörper) zu einer Lipiddoppelschicht zusammengedrückt wird. Da diese Membran optisch schwarz erscheint, nennt man sie *black film* oder auch nach den Erfindern Müller-Rudin-Membran.

Das Loch wird also von einer künstlichen Lipiddoppelschicht verschlossen, die einen sehr hohen elektrischen Widerstand für Ionen bildet. Gibt man jedoch bestimmte Proteine, wie das bakterielle Antibiotikum Gramicidin A, in die Salzlösung einer der beiden Kammern, steigt die Ionenleitfähigkeit der Membran sprunghaft an: Das Peptid Gramicidin A lagert sich in die künstliche Membran ein und bildet dort spontan Ionenkanäle. Diese öffnen und schließen sich nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip und rufen so kurzfristige, sprunghafte Änderungen des Stroms durch die Membran hervor.

Diese Experimente zeigten zum ersten Mal das Verhalten einzelner Ionenkanäle. Es handelte sich allerdings um ein künstliches Modell und nicht um natürliche Kanäle aus Nerven- oder Muskelzellen. Die ersten Messungen zu solchen Kanälen stammten aus dem Labor von Bernard Katz (1911–2003), einem gebürtigen Leipziger, der – als Jude von den Nationalsozialisten verfolgt – 1935 nach England auswanderte und später am University College in London arbeitete (Katz 1986).