

# Tausendsassa Ionenkanal

## Auch in braunen Fettzellen von Bedeutung

Von Detlef Siemen

Wenn wir frieren, ziehen wir uns wärmer an oder stellen die Heizung hoch. Ist beides nicht möglich, fangen wir an, uns zu bewegen, die Muskeln anzuspannen oder – besonders deutlich bei Kindern im Freibad zu beobachten – zu zittern. Viele Säugetiere, besonders kleine mit relativ großer Körperoberfläche und Winterschläfer, aber auch noch neugeborene Menschen, besitzen die bemerkenswerte Fähigkeit, Wärme zu erzeugen, ohne zu zittern. Sie besitzen außer dem normalen „weißen“ Speicherfettgewebe, das vielen von uns als „Rettungsring“ um den Bauch relativ vertraut ist, ein

besonderes Fettgewebe – das braune Fettgewebe. Neben der Speicherfunktion besteht seine Aufgabe hauptsächlich darin, die Körpertemperatur in kritischen Phasen zu erhöhen. In meiner Arbeitsgruppe wird versucht, das Geschehen in der braunen Fettzelle an zwei Orten genauer zu untersuchen, um es besser zu verstehen: in der Zellmembran und in der inneren Mitochondrienmembran. Uns interessieren besonders die Ionenströme, die durch die Membranen fließen, dabei aber gezwungen sind, präformierte Durchtrittsstellen zu benutzen, die sogenannten Ionenkanäle.

Histologen können die beiden Fettgewebe, wenn sie aus ausgewachsenen Zellen bestehen, leicht unterscheiden. Weiße Fettzellen sind größer (bis 100 µm) und besitzen nur einen großen Fetttropfen (Fettvakuole), während braune Fettzellen bei nur rund einem Drittel der Größe viele kleine Fetttropfen enthalten – sie sind plurivakuolär (siehe Titelfoto). Angepaßt an seine besondere Aufgabe findet man die wichtigsten Vorkommen des braunen Fettgewebes im Bereich der Schulterblätter, entlang der Aorta, im Halsbereich und im Nierenlager. An diesen Orten ist es relativ leicht schon makroskopisch an seiner kräftig braunen Farbe zu erkennen. Dieser Farbeffekt entsteht in Proteinen der Mitochondrien. Mitochondrien sind Organellen, in denen die Zellatmung stattfindet. Sie sind gewissermaßen die Kraftwerke der Zelle, und es gibt sie reichlich im braunen Fettgewebe.

So ist es nicht erstaunlich, daß schon 1551 dem Schweizer Naturforscher Conrad Gessner das Gewebe als etwas Besonderes auffiel. Er schreibt über das Murmeltier (damals mit wissenschaftlichem Namen noch *Mus alpinus*, also „Alpenmaus“ genannt) und ihr braunes Fett: „Dorsum praepingue habent, qu(m) caeterae corporis partes sint macrae quamque haec vere nec pinguitudo, nec caro dici potest, sed ut mamillaru(m) caro in bubus, inter eas est medium quidda(m).“ Die Übersetzung von C. G. aus einer späteren deutschsprachigen Auflage lautet: „... hat einen fetten Rücken, da doch der andere Leib mager ist, wiewol solches eigentlich nicht fett zu nennen, sondern etwas mittels zwischen Fleisch und Fett, als das Euter an der Kuh oder anderen Thieren ist.“

Seit über 20 Jahren weiß man, wodurch das braune Fettgewebe in die Lage versetzt wird, direkt Wärme erzeugen zu können. Wir wollen uns zum besseren Verständnis dafür die

Reaktionskette ansehen, die bei der Aktivierung einer Zelle abläuft. Es gibt viele freie Nervenendigungen des Sympathicus im braunen Fettgewebe. Als Transmitter (extrazellulärer Botenstoff) konnte Noradrenalin nachgewiesen werden. Noradrenalin reagiert mit  $\beta$ - und  $\alpha$ -Rezeptoren in der Fettzellmembran. Die zahlreichen  $\beta$ -Rezeptoren bewirken über einen „second messenger“ (intrazellulärer Botenstoff) einen Fettsäureabbau in den Vakuolen. Freie Fettsäuren oder solche, die bereits für den weiteren Abbau aktiviert wurden, sind in der Lage, kleine Poren in der inneren der beiden Mitochondrienmembranen zu öffnen. Und diese kleinen Poren, die in bestimmten Eiweißmolekülen enthalten sind, machen die Besonderheit der braunen Fettzellen aus.

Normalerweise wird nämlich in jeder Zelle geatmet, indem in der Atmungskette, einer Enzymkaskade, die sich in der inneren Mitochondrienmembran jeder Zelle befindet, Sauerstoff mit Wasserstoff in einer „kontrollierten Knallgasreaktion“ zu Wasser verbindet. Der notwendige Wasserstoff wird aus dem Zitronensäurecyclus angeliefert. Doch werden durch die Atmungskette auch Protonen aus den Mitochondrien hinausgeworfen und häufen sich im Cytoplasma an. Es entsteht also ein Konzentrationsgefälle für Protonen, und das läßt sich trefflich als Energiequelle für ein Protein benutzen, das aus Adenosindiphosphat (ADP) durch Anlagerung eines Phosphatrestes das energiereiche Adenosintriphosphat (ATP), die Energiequelle der meisten Lebensvorgänge im Körper, herstellt und das deswegen ATP-Synthetase genannt wird. Bei seiner Herstellung entsteht – wie bei jeder Energieumwandlung – Wärme als Abfallprodukt. Die Reaktion wird gebremst, wenn entweder ein Überschuß an ATP entstanden ist oder der Protonenkonzentrationsunterschied als treibende Kraft nicht groß genug ist. So wird ver-

ständig, warum das Mitochondrium auch als Kraftwerk der Zelle bezeichnet wird.

In der braunen Fettzelle gibt es nun die erwähnten Porenproteine, die als „Kurzschluß“ für Protonen verstanden werden können. Die Wasserstoffionen entziehen sich ihrer Aufgabe, beim Einstrom in die Zelle ATP herzustellen, und diffundieren stattdessen durch das Kurzschlußprotein. Dieser Weg kann nicht durch einen Überschuß an ATP gebremst werden, und auch die Atmungskette läuft ungebremst weiter, dabei weiter Wärme erzeugend. Der Muskel dagegen muß, um Wärme zu erzeugen, ATP verbrauchen, sprich: äußere Arbeit leisten. Wie nun ein Auto nicht nur aus Kraftstofftank und Motor besteht, so gibt es auch bei der braunen Fettzelle zusätzlich eine Vielzahl anderer Prozesse, die kontrolliert und geregelt werden müssen. Sie sind vielfach schlechter bekannt als der Wärmebildungsmechanismus selbst, deswegen aber nicht weniger wichtig.

### Einzelkanalströme

Ionenkanäle sind Proteinporen, die kontrolliert geöffnet und geschlossen werden, also Schleusentore besitzen müssen. Je nach Öffnungszustand der Mehrheit der Kanäle ändert sich die Leitfähigkeit der Membran oder ihr Kehrwert, der elektrische Widerstand, und damit nach dem Ohmschen Gesetz auch die Membranspannung. Wir wissen zum Beispiel, daß es bei Aktivierung der Zelle zu einem vorübergehenden Zusammenbruch der Ruhemembranspannung von etwa -60 mV auf einen neuen Wert von etwa -20 mV kommt. Die Ströme, die durch einen einzelnen Ionenkanal fließen, sind normalerweise sehr klein, d. h. etwa 0,5 bis 5 pA (pico Ampère), je nach Spannung und Kanalart. 1 pA entspricht 1 Bil-



liardstel Ampère, also rund 3 Billiardstel dessen, was durch eine 60 Watt Glühbirne fließt.

Durch geeignete Verstärker kann man solche Ströme sichtbar machen – das Problem liegt darin, einzelne Proteinmoleküle einzufangen und ihre Umgebung elektrisch abzudichten.

Dieses Problem kann mit der sogenannten „patch clamp“-Technik gelöst werden, die 1981 zuerst von zwei Deutschen am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen publiziert wurde und die in der biologischen und medizinischen Forschung seitdem weltweit zu einer Flut von neuen Erkenntnissen geführt hat. Einer der beiden Autoren, Professor Dr. Erwin Neher, ist Schunck-Preisträger des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen des Jahres 1986. Der Vogt-Preisträger für Naturwissenschaften 1990, Dr. Peter Jonas, und der Schunck-Preisträger 1990, Dr. Helmut Kettenmann, haben ihre Ergebnisse ebenfalls mit dieser Methode gewonnen. Die Technik wird in Gießen in der Botanik, in der Pharmakologie und in der Humanphysiologie angewendet.

Man zieht Glaskapillaren in mehreren Schritten zu feinen Spitzen aus, die einen Innendurchmesser von etwa 1 bis 2  $\mu\text{m}$  haben. Um die scharfen Kanten der Glasränder zu glätten, führt man die Pipetten mit dem Mikromanipulator an einen glühenden Platindraht heran.

Dabei schmilzt auch die Öffnung etwas weiter zu (auf ca. 0,5  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser). Die Pipetten werden mit einer Salzlösung gefüllt und von der Rückseite mit einem chlorierten Silberdraht versehen, der eigentlichen Elektrode. Die so vorbereitete Pipette wird wiederum mit dem Mikromanipulator an eine braune Fettzelle herangeführt, bis sie die Zelle berührt. Dabei bildet sich ein inniger Kontakt zwischen Zelle und Glas aus. Wenn der Vergleich auch nicht ganz korrekt ist, dann kann man sich das etwa so vorstellen, wie wenn man mit der bloßen Hand eine gefrorene Türklinke anfaßt. Der Kontakt ist sehr hochohmig, etwa 10 bis 20 G $\Omega$ . Durch leichtes Saugen an der Pipette kann man die Kontaktbildung fördern. Reißt man nun die Pipette von der Zelle weg, wird der Membranfleck (englisch „patch“, daher „Patch clamp“) mit herausgerissen. Er verschließt weiterhin die Pipette, und mit einer zusätzlichen Elektrode in der Badlösung kann man nun die Ströme messen und analysieren, die durch die in diesem Membranfleck enthaltenen Kanäle fließen. Meist sind es wenige, gelegentlich nur ein einzelner. Um unter kontrollierten Bedingungen zu arbeiten, wird die Spannung über die Membran sorgfältig konstant gehalten; der Strom, der dafür aufgebracht werden muß, entspricht dem Strom, der über die Membran und durch die Kanäle fließt. Die Kanäle kennen nur zwei Leitfähigkeitszustände: Entweder sie sind geöffnet oder geschlossen. Daher

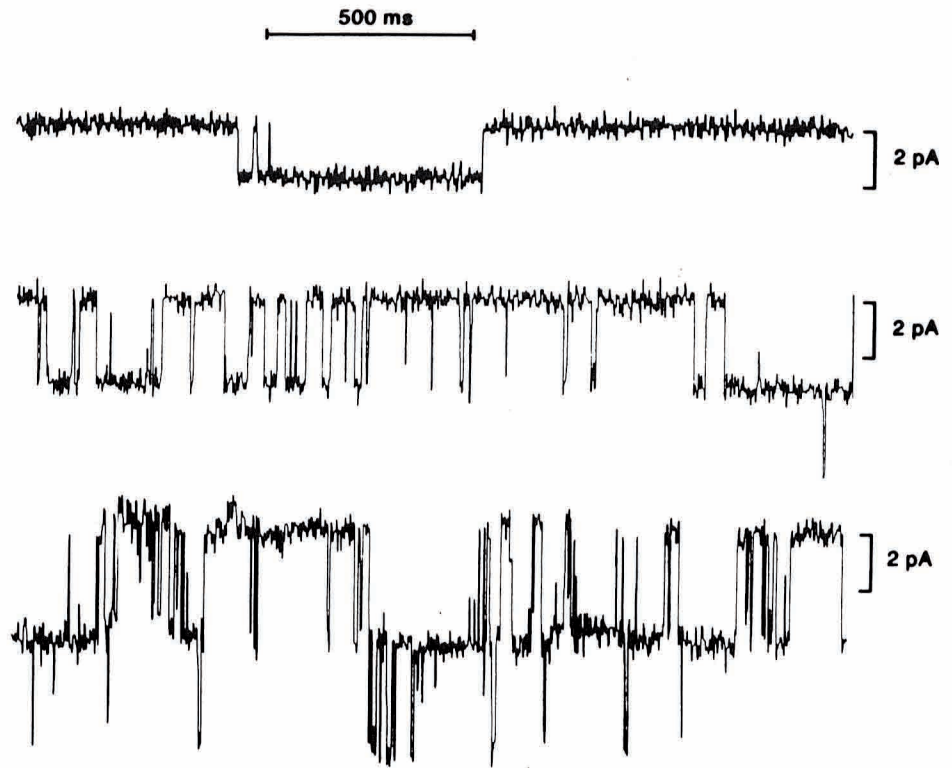


Abb. 1: Rechteckförmige Einzelkanalströme durch einen für monovalente Kationen schwach selektiven Kanal. Öffnet ein Kanal, bewegt sich die Kennlinie nach unten. In der mittleren Registrierung wird kurzfristig, in der unteren Registrierung mehrfach ein zweites, offenes Niveau erreicht. Es müssen in diesem Membranfleck also mindestens zwei Kanalproteine enthalten sein. Von oben nach unten vergrößerte Stromamplitude und verlängerte Öffnungsdauern durch erhöhte Versuchstemperatur.

haben die gemessenen Ströme ein charakteristisches rechteckförmiges Aussehen (Abb. 1).

## Zellmembran

Gleich die ersten Experimente an braunen Fettzellen waren von Erfolg gekrönt. Es wurde ein Ionenkanal mit einer Leitfähigkeit von etwa 43 pS bei 37 °C nachgewiesen. Die Experimente der Abb. 1 sind bei 18,6 °C, 32,8 °C und bei 39,5 °C (von oben nach unten) ausgeführt worden. Man sieht, daß die Schleusentore bei Kälte langsamer arbeiten, und weil sie dann genauer zu beobachten sind, wurden viele Experimente bei niedrigeren Temperaturen ausgeführt. Auch die Stromamplitude nimmt bei Kälte ab. Zu unserer Überraschung fanden wir heraus, daß der Kanal Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen annähernd gleich gut passieren läßt. Damit gehört er in dem mittlerweile recht groß gewordenen Zoo von Ionenkanälen einer Art an, die zum damaligen Zeitpunkt nur in drei Arbeiten kurz erwähnt war. So etwas ist natürlich eine Herausforderung. Inzwischen wissen wir, daß dieser Kanal spannungsabhängig ist (erst beim Zusammenbrechen der normalerweise über einer biologischen Membran liegenden Ruhemembranspannung öffnet er

sich). Wir wissen, wie er auf Temperaturschwankungen reagiert, und vor allem können wir aus seiner unterschiedlichen Fähigkeit, verschiedene kleine, einfach positiv geladene Ionen zu leiten, auf seinen inneren Aufbau zurückschließen. So muß es etwa in der Mitte des elektrischen Spannungsfeldes über die Membran einen anionischen Bindungsort geben, an den die kleinen Kationen bei der Passage kurz binden, ehe sie weiterfließen können. Bei einem Kanaldurchmesser von etwa einem Millionstel Millimeter relativiert sich natürlich die Genauigkeit dieser Aussage ein wenig. Für einen ähnlichen Kanal wurde der genaue Kanaldurchmesser von 6,5 Å in der Arbeitsgruppe aus Seattle, USA, bestimmt, in der ich 1982/83 während eines Forschungsaufenthaltes mitgearbeitet habe.

Am bedeutsamsten war jedoch, daß mit unseren Ergebnissen eine Brücke zwischen biophysikalischen Daten und der physiologischen Funktion gebaut werden konnte: Mit Hilfe der Meßdaten läßt sich berechnen, daß in eine mittlere braune Fettzelle bei ihrer Aktivierung 15,5 fmol Natriumionen pro Sekunde einströmen (1 Femtomol = 10<sup>-15</sup> Mol). Die müssen natürlich wieder entfernt werden, und das geschieht durch eine Ionenpumpe, ein Protein, das für seine Arbeit Stoffwechselenergie in



Form des erwähnten ATPs benötigt. Für die Produktion genau dieser Menge ATP in den Mitochondrien läßt sich der Sauerstoffbedarf berechnen, denn zwischen biologischer Oxidation und ATP-Produktion besteht ein stöchiometrisches Verhältnis. Kontrollmessungen des Sauerstoffverbrauchs mit einer Platinelektrode in einer Zellsuspension passen gut zu unseren Berechnungen.

## Mitochondrienkanäle

Wir konnten so Vermutungen bestätigen, nach denen bei der Umwandlung der Energie, die zum Entfernen der Natriumionen aus dem Zellinneren gebraucht wird, etwa 5 bis 15 Prozent der Wärme frei wird, die die braune Fettzelle insgesamt produzieren kann. Doch wo werden die übrigen 85 bis 95 Prozent produziert? Die – das weiß man schon länger – stammen aus dem oben beschriebenen Kurzschlußmechanismus in der inneren Mitochondrienmembran. Daher bestand unser Ziel darin, diesen Kurzschluß als Ionenkanal zu zeigen und die durch ihn fließenden Ströme zu messen.

Um an die Mitochondrien heranzukommen, werden die Zellen homogenisiert, d. h. durch eine Glasröhre gequetscht, in der sich ein rotierender Teflonstempel befindet. Dabei platzt die Zellmembran, und durch Zentrifugation mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten bei 0 bis 4 °C können die Mitochondrien von schweren Zelltrümmern und leichteren Eiweißmolekülen getrennt werden. Jetzt braucht nur noch die störende äußere Membran entfernt zu werden. Das Problem wurde durch einen hyposmotischen Schock gelöst. Für wenige Minuten wurden die Mitochondriensuspensionen in eine Lösung mit 30fach verdünnter Ionenkonzentration überführt. Dabei platzte die äußere Mitochondrienmembran auf, und die sonst stark gefaltete innere Membran entwickelte sich zu einem fragilen, im Phasenkontrast sichtbaren, etwa 3 µm großen Bläschen, auch Mitoplast genannt. Die aufgeplatzte Membran hat nur noch an einer als dunkler Punkt im Mikroskop sichtbaren Stelle Kontakt mit der inneren Membran. Diese ist der „patch-clamp“-Methode nun frei zugänglich, und in unseren Experimenten wurde in der Tat sofort ein Kanal sichtbar, der sich später als Anionenkanal entpuppte. Tauscht man nämlich im Bad und/oder in der Pipettenlösung nach und nach die unterschiedlichen Ionen gegen andere aus und beobachtet dabei Zu- oder Abnahme der Stromamplitude, so ist schnell herauszufinden, von welchem Ion oder von welcher Gruppe von Ionen der jeweilige Strom getragen wird.

Meist schließen sich sofort pharmakologische Tests an. Der Elektrophysiologe ist glücklich, wenn er schnell ein Toxin oder Pharmakon findet, das mit hoher Potenz spezifisch bindet

und den gerade entdeckten Ionenkanal gleich wieder blockiert oder zumindest in seinem Verhalten nachhaltig modifiziert. Als hilfreich erweist sich dabei eine Zusammenarbeit mit den Gießener Humanpharmakologen, die aus den Giften von Schlangen, Skorpionen und anderen Tieren z.T. äußerst wirksame Toxine isolieren.

Doch gerade für die pharmakologischen Tests trat bei den Messungen an der inneren Mitochondrienmembran eine Schwierigkeit auf: Mehrfache Lösungswechsel in der Pipette sind zwar möglich aber schwierig. Auf der anderen Seite erreicht der Lösungswechsel im Bad

nicht die Innenseite der Membran, denn das Herausreißen von „patches“ aus Mitochondrien ist noch nicht gelungen. Die Rettung brachte die sogenannte „whole-cell“-Methode, die hier natürlich „whole mitochondrion“-Methode heißen muß. Bei ihr gelingt es, beispielsweise durch einen relativ starken Spannungspuls den Membranpatch in der Pipettenspitze zu zerstören. Jetzt ist die Pipettenlösung und damit die Pipettenelektrode mit dem Mitochondrieninneren verbunden, und es können alle Kanäle in der übrigen Membran gleichzeitig gemessen werden – eben das „whole-mitochondrion“. Die gemessenen Ströme sind

nicht mehr rechteckförmig, sondern haben komplexere Verlaufskurven, jetzt bestimmt durch das statistische Verhalten vieler Kanäle.

### Zusammenfassung und Perspektiven

Mit dieser Methode haben wir gezeigt, daß von den Anionenkanälen im Mittel mindestens 19 pro Mitochondrium vorhanden sind, und daß sie sich gut durch mikromolare Konzentrationen von Purindi- und Trinukleotiden, z.B. ATP, ADP oder GDP (Guanosindiphosphat), blockieren lassen (Abb. 2). Diese Konzentrationen sind in der Zelle nichts Ungewöhnliches – vermutlich werden diese Kanäle also überwiegend geschlossen sein, oder es gibt einen uns noch unbekanntem Öffnungsmechanismus, der die blockierende Wirkung der Nukleotide überwindet. Nun kann man natürlich stolz sein, die „patchclamp“-Technik vom zellulären Niveau mit Erfolg auf das Niveau von Zellorganellen heruntergeführt zu haben. Aber eigentlich wollten wir ja das Entkopplungsprotein messen. Kann der Anionenkanal – erste Vermutungen in dieser Richtung sind in der Literatur aufgetaucht –

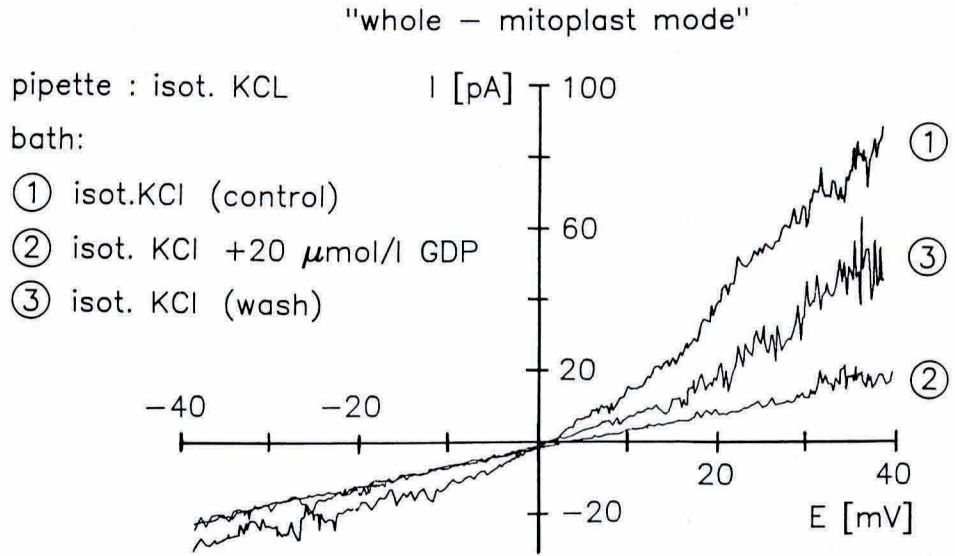


Abb. 2: Stromkennlinie gemessen am ganzen Mitochondrium bei kontinuierlich steigender Membranspannung. Der überproportionale Anstieg im positiven Bereich ist Ausdruck des sich auf Depolarisation hin öffnenden Anionenkanals. Dieser Effekt fehlt unter dem Einfluß von 20  $\mu\text{mol/l}$  GDP. Die Nukleotidwirkung ist teilweise reversibel.

mit dem gesuchten Protein identisch sein? Wir haben inzwischen verschiedene Hinweise, daß das nicht der Fall ist. Eher ist es so, daß das Entkopplungsprotein in seiner Leitfähigkeit

kleiner ist, als von uns angenommen, und daß wieder einmal die Meßmethode verfeinert werden muß, um den Beitrag dieser Proteine aus dem elektrischen Grundrauschen heraus-

zuheben. Wissenschaftlerarbeit hat eben selten ein Ende. Trotzdem haben unsere Ergebnisse schon Beiträge zum besseren Verständnis der Vorgänge in der aktivierten braunen Fettzelle geliefert. Besonders die Fragen nach dem Weg des ausströmenden Natriums und damit nach der Quelle und der Ursache des Zusammenbruchs des Ruhepotentials der Zelle erscheint gelöst. Aber schon tauchen auch hier neue Fragen auf. Der ebenfalls beobachtete Anstieg der Calcium-Konzentration im Zellinneren kann nach unseren Befunden nicht auf demselben Weg verursacht werden – aber wo kommt es dann her, das Calcium? ...

### Zum Autor:

**Prof. Dr. Detlef Siemen,** Jahrgang 1950, war von 1978 bis November 1990 als wissenschaftlicher Mitarbeiter und als Hochschulassistent am Physiologischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin an der Universität Gießen tätig. Er hat in Kiel Biologie studiert und dort 1980 promoviert. Längere Forschungs-



aufenthalte an der University of Washington in Seattle, USA, und an der Universität Stockholm, Schweden. 1989 Habilitation am Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Seit Dezember 1990 Professur für Zellbiologie am Institut für Zoologie der Universität Regensburg. Wissenschaftliche Arbeiten über Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionenkanäle an Nervenzellmembranen, über den nikotinischen Acetylcholinrezeptor an Skelettmuskelzellen sowie über Ionenkanäle in Zell- und inneren Mitochondrienmembranen von braunen Fettzellen.