

Eine der größten Herausforderungen für das Zentralnervensystem aller Lebewesen ist es, möglichst schnell zu reagieren. Dies ermöglicht schnelle Schutzreflexe und letztendlich auch den Ablauf gedanklicher Prozesse innerhalb tolerierbarer Zeit. Um Signale über größere Abstände schnell zu vermitteln, hat die Natur elektrische Signalmechanismen entwickelt. Für die Weiterleitung des Signals auf nachgeschaltete Zellen und auch für die Interaktion zwischen den Milliarden von Nervenzellen in unserem Gehirn bedient sie sich allerdings weitgehend einer chemischen Signalübertragung. Dies geschieht an den so genannten Synapsen. Dort gibt die präsynaptische Nervenendigung den Neurotransmitter, einen Botenstoff, ab. Der Neurotransmitter diffundiert über den Zwischenraum zwischen zwei kommunizierenden Zellen und öffnet Ionenkanäle in der nachgeschalteten Zelle. In den Nervenzellen findet also ein Doppelschritt statt: Ein elektrisches Signal in der sendenden Zelle löst ein chemisches Signal aus, indem es den Transmitter freisetzt, und dieser wiederum bewirkt ein elektrisches Signal in der empfangenden Zelle. Man mag sich fragen, warum die Natur sich eines so komplizierten Prozesses bedient, wenn doch Geschwindigkeit ein wesentlicher Faktor ist, und wie es unsere Nervenzellen dennoch bewerkstelligen, dass der Prozess einigermaßen schnell abläuft.

Pegasus im Nervenland

Vorratshaltung sorgt für Geschwindigkeit in Nervenzellen

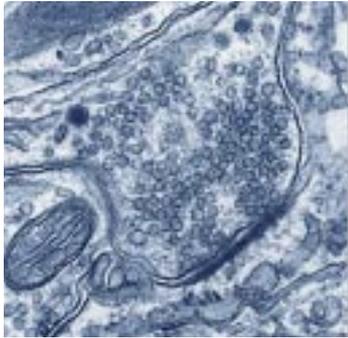
Erwin Neher

Synaptische Plastizität

Zunächst zur ersten Frage: Eine mögliche Antwort liegt in der Bedeutung der so genannten »synaptischen Plastizität«. Nach übereinstimmender Meinung der meisten Neurobiologen haben die besonderen Leistungen des Gehirns ihre Begründung darin, dass die Verbindungen zwischen den einzelnen Nervenzellen nicht starr sind, sondern einem ständigen Wandel unterliegen. Synaptische Plastizität heißt, dass sich die Synapsen mit dem Signaldurchfluss verändern, und zwar jeder Typus von Synapse in sehr charakteristischer Weise. Je nach Synapsentyp und Reizmuster können diese Änderungen über lange Zeit Bestand haben oder nur kurzzeitig wirken. Die Vielfalt und die breite Zeitskala der möglichen Veränderungen

bedingen es, dass die »Schaltkreise« unseres Zentralnervensystems zum einen Gedächtnis entwickeln und sich zum anderen spontan aufgrund von Sinneseindrücken oder während gedanklicher Prozesse umorganisieren können. Man kann argumentieren, dass es die Komplexität der synaptischen Übertragung ist, die diese vielfältige Regulation auf mehreren Zeitskalen erlaubt.

Beim Studium der verschiedenen Mechanismen synaptischer Plastizität ist offensichtlich, dass sich die Natur nahezu aller Regulationsmechanismen bedienen kann, die im Laufe der Evolution für die unterschiedlichsten Aufgaben entwickelt wurden – von den Mechanismen der Stoffwechselregulation bis zu den Signalen, die Wachstum und Zelldifferenzierung steuern. Bestünde die



Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Synapse zwischen hippocampalen Zellen in Kultur. Deutlich zu sehen ist der »Vorrat« an synaptischen Vesikeln, wovon einige wenige an die präsynaptische Membran angedockt sind, die meisten jedoch in Warteposition stehen.

Abbildung: Jürgen Klingauf, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie.

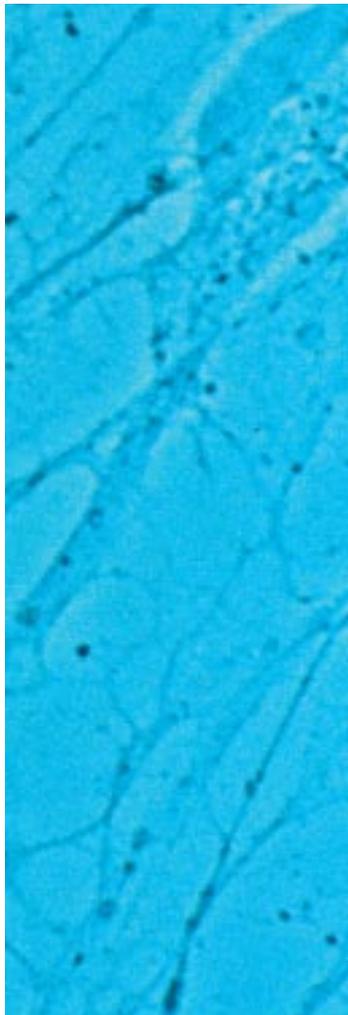
synaptische Transmission in einer einfachen elektrischen Kopplung, so wäre dies nicht möglich.

Botenstoffe auf Vorrat

Nach diesem Exkurs über »Plastizität« zurück zur Frage der Geschwindigkeit: Wie schaffen es unsere Synapsen, trotz dieser Umständlichkeit schnell und in höchstem Grade reguliert zu reagieren? Die Forschungsarbeiten der Abteilung Membranphysik am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, in Kooperation mit dem Sonderforschungsbereich 406 »Synaptische Interaktionen in neuronalen Zellverbänden« und dem SFB 523 »Protein- und Membrantransport zwischen zellulären Kompartimenten« sowie mit dem neuen DFG Forschungszentrum Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB) entwickelten darauf einige Antworten.

Die Synapsen bedienen sich in der Frage der Geschwindigkeit eines Tricks: Der zur Signalübertragung notwendige Botenstoff (Neurotransmitter) wird, in so genannten Vesikeln verpackt, auf Vorrat gehalten. Jede Nervenendigung enthält eine Vielzahl solcher synaptischer Vesikel, die bei Ankunft eines Nervenimpulses mit der Membran der Nervenfasers verschmelzen und ihren In-

halt ausschütten. Die Bildung von membranumhüllten Vesikeln verschiedenster Art, ihre Beladung mit Inhaltsstoffen, Transport solcher Vesikel und ihre Verschmelzung mit anderen Strukturen sind Prozesse, die an vielen Stellen unserer Körperzellen ständig ablaufen. Auch die einfachsten Organismen weisen eine Vielzahl solcher vesikulären Strukturen auf, die in ihren Zellen sehr verschiedene Aufgaben übernehmen. Die Vorrathaltung in der Nervenzelle ist somit ein weiteres Beispiel dafür, dass das Nervensystem entwicklungsgeschichtlich alte Zellmechanismen aufgreift und diese zur Erfüllung seiner komplexen Aufgaben perfektioniert.



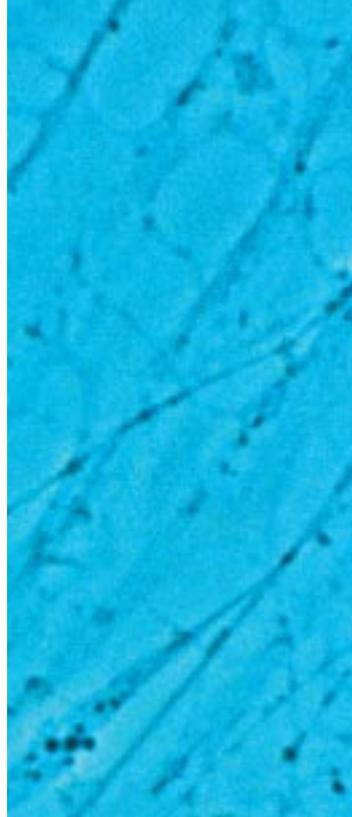
Kalziumkonzentration als Auslöser

Drei unserer Forschungsprojekte verfolgen unterschiedliche Arbeitsansätze, die Teilfragen dieser komplexen Regulationsmechanismen klären. Zunächst zur Schnelligkeit: Wie erwähnt, beherbergen die meisten Zelltypen eine Vielzahl von Vesikeln, ein Teil davon mit Transportaufgaben betraut, wovon wiederum einige dieser Aufgaben – ähnlich der Freisetzung des Neurotransmitters aus der Nervenzelle – in der Sekretion verschiedenster Substanzen besteht. Diese Substanzen werden hergestellt (synthetisiert), in Vesikel verpackt, transportiert und, wenn ein solches Vesikel die Zellmembran erreicht, irgendwann auch freigesetzt. Geschwindigkeit spielt dabei in der Regel keine große Rolle. In der Nervenendigung ist dies anders: Transmitterbeladene Vesikel werden an die Zellmembran transportiert und verharren dort, bis ein Nervenimpuls das Signal zur Freisetzung gibt. Da auf einen bestimmten Vorrat zurückgegriffen werden kann, läuft dann alles sehr schnell ab. Seit etwa 50 Jahren ist bekannt, dass ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{++}]$) der unmittelbare Auslöser für die Freisetzung ist. Bis vor kurzem wußte man allerdings nicht, wie hoch das Kalzium $[Ca^{++}]$ ansteigen muss, damit es diese Aufgabe erfüllen kann. Wir haben in einer speziellen Synapse im Hirnstamm von Ratten Abschätzungen erarbeitet sowohl über die Größe als auch den Zeitverlauf von $[Ca^{++}]$ (Schneggenburger & Neher, 2000). Wir haben festgestellt, dass am Ort der Freisetzung ein sehr lokaler $[Ca^{++}]$ -Anstieg um einen Faktor 100 und mehr stattfindet, der allerdings nur eine halbe Millisekunde andauert. Offensichtlich bilden sich beim Öffnen von $[Ca^{++}]$ -Kanälen in deren Nachbarschaft eng umgrenzte Bereiche hoher $[Ca^{++}]$ -Konzentra-

tion aus, die nach dem Schliessen der Kanäle sofort wieder verschwinden und somit schnelles An- und Abschalten der synaptischen Transmission ermöglichen. Eine quantitative Beschreibung dieser Prozesse ist wichtig für die Beantwortung weiterführender Fragen in Bezug auf kurzzeitige »plastische« Veränderungen bei repetitiver Reizung (Felmy et al., 2003) und über die molekulare Natur des Kalzium-Sensors.

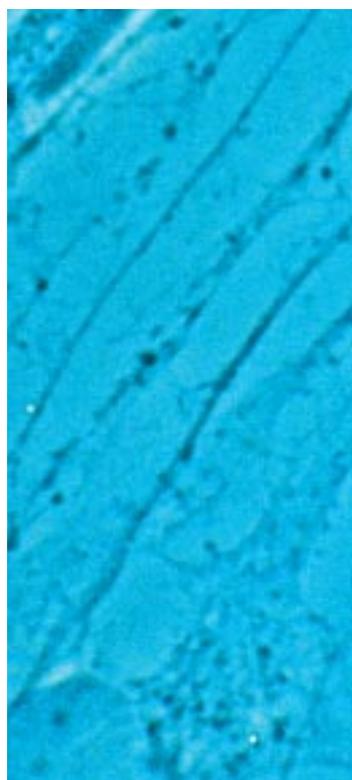
Molekulare Akteure

Ein zweiter Arbeitsansatz konzentriert sich auf die molekularen Akteure des Freisetzungsprozesses. Jüngste Untersuchungen haben ergeben, dass sich nach der Anlagerung eines sekretorischen Vesikels an die Zellmembran ein so genannter »SNARE«-Komplex bildet. Dieser besteht aus Molekülen, von denen einige (SNAP25 und Syntaxin) in der Zellmembran verankert sind und ein weiteres (Synaptobrevin) in der Vesikelmembran. Durch die Bildung des Komplexes werden die beiden Strukturen aneinandergedehftet. Es ist vorgeschlagen worden, dass die dabei frei werdende Energie letztendlich auch das Verschmelzen der beiden Membranen bewirkt (Jahn et al. 2003). Ähnliche Reaktionen finden in vielen Zelltypen und dort auch an vielen Stellen statt. Wo immer innerhalb der Zelle Membranstrukturen fusionieren, sind sehr ähnliche Moleküle (Isoformen der oben genannten SNARE-Proteine) wirksam, so zum Beispiel in den Zellbestandteilen endoplasmatisches Retikulum, im Golgiapparat und an den Endosomen. Das Besondere im Nervensystem ist, dass der Prozess offensichtlich nicht zur Vollendung gelangt, sondern in einem späten Stadium der Komplexbildung innehält und auf das auslösende Signal – den Kalziumanstieg – wartet. Dadurch entsteht ein »Vorrat« an sekretionsbereiten Vesikeln, die, wann immer



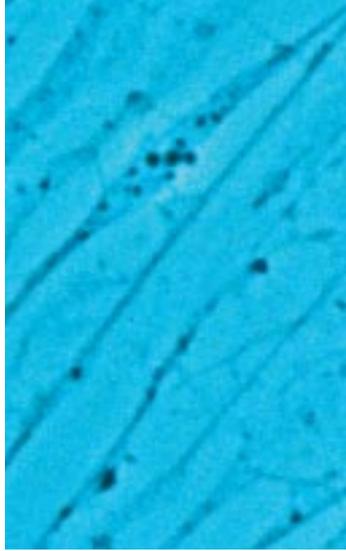
[Ca⁺⁺] ansteigt, innerhalb von Bruchteilen einer Tausendstelsekunde freigesetzt werden können.

Wir haben uns die Frage gestellt, welche Moleküle dafür verantwortlich sind, dass sich in der »neuronalen« Sekretion dieser Vorrat ausbilden kann. Dazu haben wir nicht mit Neuronen experimentiert, sondern mit den Zellen der Nebenniere, welche im Stresszustand das Hormon Adrenalin ausschütten. Dieser Prozess funktioniert auch nach dem neuronalen Prinzip der Vorratshaltung, hat aber den Vorteil,



dass sich in den relevanten Zelltypen die beteiligten Moleküle leichter manipulieren lassen (Rettig & Neher, 2002).

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein Mäusestamm, von amerikanischen Kollegen bereitgestellt (Washbourne et al., 2002), in dem durch genetische Manipulation eine der Komponenten des SNARE-Komplexes, das Protein SNAP-25, eliminiert ist. Aus den Nebennierenzellen dieser Mutante lassen sich Kulturen anlegen. Eine biophysikalische Analyse dieser Zellen ergab, wie erwartet, dass der Vorrat an sekretionsbereiten Speichervesikeln leer war; es war nur eine sehr langsam ablaufende Freisetzung (Sekretion) messbar. Behandelte man solche Zellen jedoch mit einem Virus, welcher die genetische Information für SNAP25 enthielt, so exprimierten die Zellen das Protein und erlangten gleichzeitig auch wieder ihre Sekretionsfähigkeit. Dies bestätigte, dass SNAP25 für die Sekretion essenziell ist. Führte man dieses so genannte »Rescue-Experiment« mit der neuronalen Isoform von SNAP25 durch, so wurde ein großer Vorrat an sekretionsbereiten Vesikeln und dementsprechend eine schnelle Sekretion nach Stimulierung beobachtet. Dasselbe Experiment mit einer ubiquitären Form des Proteins (das heißt, mit einer Form, die auch in vielen nicht-neuronalen Zellen vorkommt) durchgeführt, hat zwar die Sekretionsfähigkeit der Zellen teilweise wieder hergestellt: Interessanterweise jedoch war sie sehr langsam und zeigte keine Anzeichen von Vorratshaltung. Ebenso interessant war ein weiterer Befund: Ein Überschuss (Überexpression) der ubiquitären Form des Proteins in Zellen von normalen Tieren bewirkte den Verlust des Vorrats. Dies führte zu folgender Interpretation der molekularen Vorgänge: Bei der Bildung des SNARE-Komplexes lagern sich die Komponenten entsprechend



ihrer Verfügbarkeit zusammen. Komplexe, welche die neuronale Form enthalten, besitzen die Eigenschaft, einen Vorrat zu bilden. Ist die ubiquitäre Form im Überschuss vorhanden, so verdrängt diese das neuronale SNAP25 und Vorratshaltung wird verhindert (Soerensen et al., 2003). Das Protein SNAP25, dem bislang nur eine Rolle beim Freisetzungsvorgang selbst zugesprochen worden war, bestimmt und reguliert unsere Ergebnisse zufolge auch maßgeblich die Frage der Vorratshaltung.

Regulierter Nachschub

Ein drittes Projekt befasst sich ebenfalls mit Vorratshaltung, jedoch nun wieder in den neuronalen Zellen und Synapsen im Hirnstamm von Ratten und in Zusammenhang mit der Regulation der Transmitterfreisetzung. Damit kommen wir wieder zurück zum Problem der synaptischen Plastizität. Eine der wichtigsten Formen der Kurzzeitplastizität ist die so genannte Kurzzeitdepression, die an vielen (aber nicht allen!) Synapsentypen beobachtet werden kann. Sie besteht darin, dass bei repetitiver, schnell aufeinanderfolgender Reizung einer synaptischen Verbindung die Synapsenstärke sukzessive abnimmt. Dies kann viele Gründe haben; eine wichtige Ursache dafür ist jedoch das Aufbrauchen des Vorrats an Botenstoffen. Eine spontane Reaktion auf diesen Sachverhalt könnte sein: Das hat die Natur schlecht gemacht; die Vorratshaltung sollte sicherer ausgelegt sein!

Das Gegenargument lautet: Keineswegs! Kurzzeitdepression ist ein wichtiger Mechanismus der synaptischen Plastizität, und die Natur benutzt die vorhandenen Mechanismen der Regulation von Vesikeltransport zum Ziele der Gestaltung dieser Kurzzeitplastizität. Für dieses Gegenargument sprechen unsere jüngeren Befunde, die zeigen, dass der

»Vesikelnachschub« ein hochregulierter Prozess ist. Bereits vor einigen Jahren konnten wir zeigen, dass die Wiederherstellung des Vorrats nach intensiver Reizung durch einen erhöhten Kalziumspiegel in der Zelle beschleunigt wird. Dieser Effekt wird durch das Protein Calmodulin vermittelt. Unsere neuesten Untersuchungen zeigen, dass neben Ca^{++} /Calmodulin eine gewisse

Konzentration des Botenstoffes zyklisches cAMP nötig ist, um die Beschleunigung des Nachschubs sicherzustellen. Im Normalzustand ist nach unseren Untersuchungen offensichtlich genügend viel cAMP vorhanden. Unter dem Einfluss eines zweiten, inhibitorischen Transmitters – zum Beispiel γ -amino-Buttersäure (GABA) – wird der cAMP-Spiegel abgesenkt, was dann eine vollständigere Entleerung des Vorrats und eine langsamere Wiederauffüllung bedingt (Sakaba & Neher, 2003). Dieses Zusammenwirken eines schnellen erregenden Transmittersystems (Glutamat) mit einem langsamen, inhibitorischen Transmitter (GABA) eröffnet vielfältige Möglichkeiten einer kom-

Neurotransmitter release at synapses is a highly regulated process which enables our brain to constantly change the strength of the connections between individual neurons – a process termed synaptic plasticity. The mechanism of exocytosis, by which the transmitter is liberated from storage vesicles, is very similar to other types of secretory processes in various cells and tissues. An important feature of »neurosecretion« however, is that secretory vesicles, docked at special release sites, accumulate and

form a »stockpile« which allows for a very rapid, robust response, whenever nerve activity demands so. Work in our department concentrates on three questions: 1) What is the time course and magnitude of the Ca^{++} signal which is the immediate trigger for release? 2) Which molecular properties are responsible for the fact that nerve terminals accumulate a readily-releasable stockpile of synaptic vesicle? 3) What signalling mechanisms regulate the supply of vesicles to this stockpile?



Prof. Dr. Erwin Neher, Jahrgang 1944, ist wissenschaftliches Mitglied der Max-Planck-Gesellschaft und Direktor am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Er entwickelte zusammen mit Prof. Dr. Bert Sakmann die Patch-Clamp-Technik, für die die beiden Forscher im Jahre 1991 mit dem »Nobelpreis für Medizin oder Physiologie« ausgezeichnet wurden. Erwin Neher studierte Physik in München und Madison, Wisconsin (USA) und promovierte im Jahre 1970 an der TU München. Seit 1972 arbeitet er am MPI in Göttingen, nur unterbrochen von längeren Auslandsaufenthalten an der Yale University, New Haven (USA) und am California Institute of Technology, Pasadena (USA).

plexen Regulation synaptischer Verbindungsstärken.

Es wird höchst interessant sein, zu erforschen, in welcher Weise diese Regulation das Zusammenwirken einzelner Synapsen in Neuronenverbänden beeinflusst. Die ständig in unserem Zentralnervensystem ablaufende Aktivität stellt nämlich eine ausgeklügelte Balance zwischen erregenden und hemmenden Einflüssen dar. Diese ist in pathologischen Zuständen (zum Beispiel bei Epilepsie und bei Schizophrenie) gestört. Die hier beschriebene Regulation auf zwei Ebenen, nämlich der einzelnen synaptischen Antwort als auch der Kurzzeitplastizität, ist sicher ein wesentliches Element für das Verständnis dieses komplexen Prozesses und für die Wiederherstellung einer gestörten Balance. ◀

Literatur

Felmy, F., Neher, E. and R. Schneggenburger (2003). Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37, 801-811.

Jahn, R., Lang, T. and T.C. Sudhof (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.

Rettig, J. and E. Neher (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{++} -triggered exocytosis. *Science* 298, 781-785.

Sakaba, T. and E. Neher (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA_B receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* (in press).

Schneggenburger, R. and Neher, E.: Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406, 889-893 (2000).

Soerensen, J., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C. and E. Neher (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114, 75-86.

Washbourne, P., Thompson, P.M., Carta, M., Costa, E.T., Mathews, J.R., Lopez-Bendito, G., Molnár, Z., Becher, M.W., Valenzuela, C.F., Partridge, L.D. and M.C. Wilson (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat. Neurosci.* 5, 19-26.

European Neuroscience Institute Göttingen (ENI-G)

(red.) Das European Neuroscience Institute Göttingen (ENI-G) wurde auf gemeinsame Initiative der Universität Göttingen und der Max-Planck-Gesellschaft im Jahr 2001 gegründet. Das Institut wird vom Bereich Humanmedizin und den Göttinger Max-Planck-Instituten für biophysikalische Chemie und für experimentelle Medizin sowie der Schering AG unterstützt. Zurzeit unterhält das ENI-G vier unabhängige Nachwuchsgruppen, die das gemeinsame Ziel der experimentellen Erforschung des gesunden und kranken Nervensystems verfolgen. Die Gruppen kooperieren auf den Gebieten der Genetik, Molekularbiologie, Biophysik, Elektrophysiologie und bei der Anwendung neuester bildgebender Verfahren. Dem ENI-G gehören rund 30 Wissenschaftler und Promovenden sowie zehn weitere Mitarbeiter an. Das Institut unterhält europaweite Kontakte mit Forschern und Arbeitsgruppen ausländischer Universitäten und Forschungseinrichtungen. Darüber hinaus ist es in die Lehre eingebunden, insbesondere in den internationalen Studiengang Neurosciences. Vorstandssprecher des ENI-G ist der Göttinger Nobelpreisträger Prof. Dr. Erwin Neher, stellvertretender Vorstandssprecher ist Prof. Dr. Diethelm W. Richter.

Die vier Nachwuchsgruppen des ENI-G beschäftigen sich mit folgenden Themen: Signaltransduktion bei Migration und Struktureller Plastizität der Neuronen (Leitung: Dr. Fred Wouters), Entwicklung Funktioneller Eigenschaften in Endokrinem Gewebe (Leitung: Dr. Marjan Rupnik), Neuroimmunologie (Leitung: Dr. Harald Neumann) sowie Molekulare Mechanismen Synaptischer Plastizität in *Drosophila* (Leitung: Dr. Stephan Sigrist).

Die Nachwuchsgruppe »Signaltransduktion« erforscht die Prozesse, die beim Wachstum und der Entwicklung von Nervenzellen stattfinden. Gezeigt werden soll, wie die Veränderungen in der zellulären Umgebung über ein komplexes Netzwerk von Signalwegen funktionelle Formveränderungen in Nervenzellen hervorrufen. Diese Prozesse sind medizinisch relevant für ein Verständnis von neuronaler Regeneration und neurodegenerativen Krankheiten, wie zum Beispiel der Alzheimer'schen Krankheit. In dem Projekt werden neue bildgebende Verfahren wie die FRET-Technik (Fluorescence Resonance Energy Transfer) und die FLIM-Technik (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) eingesetzt. In der Nachwuchsgruppe »Neuroendokrinologie« wird die Funktion, Entwicklung und Regeneration von neuroendokrinem Gewebe untersucht mit dem Ziel, die Hormon produzierenden Zellen soweit zu analysieren, dass sie möglicherweise bei Zellersatztherapien eingesetzt werden können. Medizinisches Anwendungsgebiet wäre beispielsweise die Therapie bei Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse (Diabetes). Die Immunität des Nervensystems ist Thema der Nachwuchsgruppe »Neuroimmunologie« mit dem Forschungsziel, entzündliche Erkrankungen des Gehirns – beispielsweise bei Multipler Sklerose – besser zu verstehen. Außerdem experimentieren die Wissenschaftler mit genetisch umprogrammierten Stammzellen, die in erkranktes Gewebe wandern, um dort therapeutische Proteine freizusetzen. Die molekularen Mechanismen bei der Bildung der Synapsen (signalübertragende Strukturen zwischen Nervenzellen) am Modellorganismus der Fruchtfliege (*Drosophila*) bestimmen das Arbeitsgebiet der Nachwuchsgruppe »Synaptische Plastizität«. Besser verstehen möchte man die Ausbildung neuer synaptischer Kontakte sowie die Modifikation existierender Synapsen, um eine Vorstellung über die zellbiologischen Grundlagen der neuronalen Informationsspeicherung zu gewinnen.