

INSTITUTO DE ESPAÑA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**PHARMACOLOGY OF SYNAPTIC TRANSMISSION:
AN ELECTROPHYSIOLOGIST'S VIEW**

Discurso del

Prof. Dr. Erwin Neher

**Leído en la sesión del día 30 de abril de 2009
para su Toma de Posesión como Académico de Honor**

Y contestación del

Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez



Madrid, 2009



Prof. Dr. Erwin Neher

Director del:
Department Membranbiophysik at the
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,
Göttingen, Germany

Erwin Neher nació en 1944 en Landsberg am Lech, Alemania, y se crió en Buchloe, Bavaria. Realizó sus estudios de Bachillerato en el *Gymnasium* de Mindelheim que realizó entre 1954 y 1963. Es ahí donde se interesa por los seres vivos y los problemas técnicos y analíticos, siendo las Matemáticas y la Física sus asignaturas predilectas. Cuando realiza su examen de acceso a la Universidad, el *Abitur*, tenía claro que quería convertirse en Biofísico. En el otoño de 1963 comienza sus estudios de Física en la Escuela Técnica de Munich (*Technische Hochschule*) obteniendo su *Vordiplom* en Física en 1965, que revalidaría con un Master en Ciencias en la Universidad de Wisconsin en 1967. De vuelta en Alemania obtiene su Doctorado en el Instituto de Tecnología de la Universidad de Munich.

En 1972 se incorpora al "*Molekularer Systemaufbau Abteilung*" del *Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie de Göttingen* como investigador.

En 1976 publica su trabajo crucial, en el que por primera vez se registran canales iónicos aislados en la membrana de músculo denervado de rana (*Nature*, 260, 799-802).

Realiza una estancia sabática (1975-76) como investigador invitado en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Yale, donde confirma sus resultados previos.

De vuelta a Alemania es uno de los creadores del *Membranebiophysik gruppe*, de cuyas investigaciones saldrían los principales trabajos del "*patch-clamp*".

En 1982 es promovido a Director del departamento de Biofísica de Membranas del mismo Instituto.

Ha recibido numerosos Premios y distinciones como los Premios Nernst-Haber-Bodenstein de la Sociedad Alemana de Química-Física (1977), Feldberg (Felberg Foundation, Londres, 1979), K. C. Cole (Biophysical Society, USA, 1982), Harold Lamport (Academia de Ciencias de Nueva York, 1982), Spencer (Columbia University, 1986), Leibniz (1986), International Research Award (Gairdner Foundation, Toronto, 1989), Hans Hellmut Vits (Universidad de Münster, 1990), Bristol-Myers Squibb Research Award (New York, 1990), Gerard (Sociedad Americana de Neurociencias, 1991); es también miembro de la Academia Europea (1989), de la National Academy of Sciences (1989), etc.

En 1991 le fue concedido, junto con su amigo y compañero Bert Sakmann, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina.

Pharmacology of Synaptic Transmission: An electrophysiologist's view

Lecture on the occasion of the solemn ceremony
at the
Real Academia Nacional de Farmacia

It is an extraordinary distinction to accept the honorary membership of the Real Academia Nacional de Farmacia. I feel particularly privileged about this move – since my training and main scientific efforts are not in pharmacology, but in electrophysiology and biophysics of membranes. This is why I dedicate this lecture to the interface between pharmacology and my field, trying to convey to you my perception of some of the major advances in pharmacology during the last 40 years. This view necessarily is biased towards functional aspects, in particular those, which I was lucky to be able to contribute. Let me make it clear that this is only a small fraction of advances that have been made in this period, particularly with approaches of molecular biology and genetics.

Phase I: Otto Loewi's 'Vagusstoff'

In the 1970s my interest was in ion channels. Originally concerned with voltage-dependent ion channels (a physicist's preoccupation) my attention got redirected towards Acetylcholine-activated

channels at the frog neuromuscular junction. Bert Sakmann convinced me that these are the type of ion channels, which are most likely to yield to single-channel recording. The concept of 'ion channels' had not yet been proven. Questions such as whether they existed and, if so, what their current signals are like, were typical issues at that time. So, we made an effort to refine electrophysiological recording methods with the goal to record current signals reflecting the opening and closing of single ion channels. The result was the 'patch clamp technique', in which a measuring pipette is pressed against a cell surface trying to collect currents, which flow through channels within the 'patch' of membrane, (the area covered by the pipette). In 1976 we published the first such recordings. They clearly showed that currents change in a step-like manner, when channels are activated by Acetylcholine and that the duration of such episodes of current flow is a stochastic variable – as expected from a single-molecule reaction (Neher and Sakmann, 1976).

The recording method at that time was rather primitive. A limiting factor for the resolution of the method is the tightness of the seal between recording pipette and membrane – in other words, the ability of the pipette to prevent currents to escape being guided to the amplifier. For many years all our efforts to improve the seal were without success. Nevertheless, we managed (at moderate resolution) to characterize activation of nicotinic channels by various cholinergic agonists (Neher & Sakmann, 1976; Sakmann et

al.,1980) and to demonstrate transient block of open channels by local anesthetics (Neher and Steinbach, 1978).

Phase II: 'Whole Cell Recording' and second messenger pathways

In January 1980 some very strange observations were made in the laboratory: although we had made numerous attempts over the years to improve the pipette-to-membrane seal (see above), progress in this respect had been limited and almost come to a standstill. But then, suddenly, in a few cases, the seal improved spontaneously by more than two orders of magnitude. Luckily I realized that a few circumstances had to coincide for this to happen: You had to use a new and clean pipette for each attempt and you had to apply light suction to the pipette *after* touching the cell. Immediately this became standard practice in the laboratory and within a few days everybody was able to record single channel currents at tenfold better resolution.

Further surprises were at hand: We realized that, once a so-called 'Gigaseal' was obtained, the physical connection between membrane and pipette seemed to be very tight. It turned out that the patch could be broken by a short pulse of suction without loss of the seal. This implied that a conducting pathway was established between pipette and the interior of the cell, which is well insulated from the outside. In this configuration currents recorded by the pipette are those flowing across the entire cell surface. This is why this configuration was dubbed the 'whole-cell' recording mode. This

recording mode soon became the standard for electrophysiological recordings from mammalian cells, which in most cases were too small to tolerate the traditional electrode impalement.

Whole-cell recording offered another advantage (or disadvantage, depending on the point of view): The passage-way between pipette and cell interior was wide enough for ions and small molecules to be rapidly exchanged between the two compartments. This way one could load cells with agents like second messengers and indicator dyes by just including these molecules in the pipette solution. The flip-side, of course, was that endogenous second messengers, including small regulatory proteins, were readily lost, by 'wash-out' into the pipette. Nevertheless researchers, particularly pharmacology – oriented colleagues, were able to figure out, how a large variety of ion channels is linked up, through second messengers and G-proteins, with receptors at the cell surface. In a typical experiment of that sort channel gating would be studied while second messengers are infused into the cell or else are being washed out. Two more configurations of the patch clamp technique, both working with small patches isolated from the cellular context, provided additional options for studying interactions between channels and regulatory agonists under tight control (Hamill et al. 1981). My own attempts to exploit such possibilities for the study of modulatory effects on channels were not exactly on the most promising track (Clapham and Neher, 1984a,b). However, I was fascinated by the signal pathways, which emerged in the 80s, and by the fact that receptors with such diverse roles as photoreception and adrenergic transmission were

almost identical molecules. In 1988 I summarized the technique and literature findings on the control of ion channels by second messengers in a lecture (the 1st Hertford lecture) to the British Pharmacological Society (Neher, 1988) .

Phase III: Modulation of synaptic transmission – presynaptic aspects.

Synaptic transmission and its modulation by pharmacological agents continues to offer some of the most challenging problems in the Neurosciences. While it was established already in the 1960s that an influx of calcium ions is the immediate trigger for neurotransmitter release (Katz), simple questions, such as how high the concentration of calcium ions ($[Ca^{++}]$) has to rise, remained without answers until recently. The modulation of synaptic strength by preceding activity (short- and long-term plasticity) and by pharmacological agents remained topics of intense research efforts. On the other hand it has become consensus among neuroscientists that such dynamic changes in functional connectivity of neurons are at the very basis of signal processing in the brain.

Rapid progress has been made in the last 20 years with respect to the modulation of postsynaptic responses. The pharmacology of the receptors for the most common excitatory and inhibitory neurotransmitters and many modulators is well established. On the presynaptic side progress has been much more limited, one reason being that presynaptic nerve endings usually are very small

structures, not readily accessible to experimental manipulations. However, there are exceptions. It has been known since 1893 that in the brainstem there are synapses with extraordinarily large cup-shaped nerve endings - the so-called calyces of Held (Held, 1893). They are transmitting signals in the auditory pathway and were favorite objects of study of Ramon y Cajal, because he considered them as strong evidence for the neuron-concept. When I. Forsythe (1984) and the Sakmann laboratory (Borst et al, 1995) showed that the 'whole-cell' recording mode could be performed on these nerve endings, it was obvious that this might be the key to the resolution of a number of basic questions on neurotransmitter release. My laboratory, therefore, made a focused effort towards a detailed quantitative description of neurotransmitter release. In the following I will summarize our findings under three aspects: The rapid Ca^{++} -triggering, multiple roles of Ca^{++} , and the modulation of neurotransmitter release by slower signaling pathways.

Ca⁺⁺-triggering is fast, depends on nano-domain [Ca⁺⁺] and is relatively robust: The whole-cell recording mode, applied to the Calyx of Held, allows one to load this nerve terminal with reagents, such as Ca^{++} -indicator dyes and caged compounds. We used these possibilities to establish a quantitative relationship between the intracellular $[\text{Ca}^{++}]$ and the rate of neurotransmitter release. In these experiments a flash of UV-light is applied to a Calyx, which had been loaded with the caged- Ca^{++} compound DM-nitrophen (Ellis-Davies, 2003) and a low-affinity Ca^{++} indicator dye. This raises $[\text{Ca}^{++}]$ instantaneously, in a step-like fashion, to values

between 2 and 20 μM (depending on the strength of the flash). As a result, a transient release of neurotransmitter can be observed, the peak rate of which rises with the 4th to 5th power of $[\text{Ca}^{++}]$. Having established such a 'dose-response-curve' one can ask, what $[\text{Ca}^{++}]$ is needed in order to elicit a response of the kind, which is typically observed during an action potential. The answer is, that it is a transient increase of an amplitude of 10-20 μM and an extremely short half-width of only about 500 μsec . Biophysical modeling of Ca^{++} dynamics in the vicinity of Ca^{++} channels then indicates that such waveforms are expected to occur at distances of 20-50 nm from single or small clusters of Ca^{++} channels, when these open for short periods (see Neher and Sakaba, 2008 for review). Thus, these studies suggest that there is a tight ultrastructural correlation between release-ready vesicles and assemblies of Ca^{++} channels. The tightness of this coupling seems to be developmentally regulated (Wang et al., 2008) and the exact shape of the 'dose-response-curve' is slightly modified by phorbol ester (Lou et al., 2005). This indicates that Ca^{++} -triggering may be mildly modulated by signal pathways involving diacylglycerol. However, apart from these effects, little influence of other modulators and second messengers on the 'dose-response-curve' has been found, indicating that Ca^{++} -triggering is a 'robust' phenomenon (see Neher, 2006 and Neher and Sakaba, 2008 for review).

Multiple roles of $[\text{Ca}^{++}]$: Apart from triggering exocytosis (the fusion of synaptic vesicles with the plasma membrane), as described

above, $[Ca^{++}]$ has been recognized at several types of synapses to enhance the recruitment of new vesicles to release sites during ongoing activity. Likewise, it accelerates the restoration of a 'pool' of readily-releasable vesicles after periods off intense stimulation. Depletion of this pool during activity has been established as a major mechanism of 'short-term depression (STD)' in glutamatergic synapses. STD, on the other hand, serves for a multitude of signal processing tasks in the central nervous system. We studied the role of $[Ca^{++}]$ in regulating the availability of vesicles in detail and found for instance that during a 100 Hz stimulus train (which is well within the range of physiological responses during tone bursts) recruitment of releasable vesicles is enhanced about 10-fold over basal rates (Hosoi et al., 2007). This enhancement is essential for sustained transmission, since availability of vesicles is the rate-limiting step during physiological activity levels of the auditory nerve (Hermann et al., 2007). We found that this critical step is modulated not only by $[Ca^{++}]$ but that the enhancement also requires cAMP (Sakaba and Neher, 2003). Recent experiments by T. Sakaba have shown that it is sensitive to manipulations involving a number of other signaling pathways (personal communication).

Modulation of neurotransmitter release: Viewed together the findings from the Calyx of Held suggest that prime candidates for presynaptic modulation of neurotransmitter release are mechanisms involved in the recruitment of vesicles to active zones. Pharmacological agents influencing these processes may emerge,

once the molecular mechanisms of these processes have been established. Compared to that manipulation of the release machinery itself seem to be less promising, since its properties turned out to be rather robust. Beyond those mechanisms addressed here, there is plenty of evidence for pharmacological agents, which modulate the electrical excitability of the nerve terminal, its action potential waveform and the Ca^{++} influx during an action potential. Multiple subtypes of Ca^{++} channels in secretory systems (Gandia et al., 1995) are regulated in many different ways (Catterall and Few, 2008) and by a multitude of mechanisms (Kisibevski and Zamponi, 2008). Pharmacological agents acting through G-proteins and Ca^{++} channels can change neurotransmitter release at the Calyx of Held over an order of magnitude (Takahashi et al., 1998). In summary besides pharmaca, which target the ion channels of the presynaptic terminal, the future may reveal substances, which interfere with vesicular trafficking

References

- Borst, J.G.G., Helmchen, F., and Sakmann, B. (1995). Pre- and postsynaptic whole-cell recordings in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J. Physiol.* 489, 825–840.
- Catterall, W.A. and Few, A.P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59, 882-901.
- Clapham, D.E. and Neher, E., 1984a. Substance P reduces acetylcholine-induced currents in isolated bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, 347, 255-277.

- Clapham, D.E. and Neher, E., 1984b. Trifluoperazine reduces inward ionic currents and secretion by separate mechanisms in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, 353, 541-564.
- Ellis-Davies, G.C. (2003). Development and application of caged calcium. *Methods Enzymol.* 360, 226-238.
- Forsythe, I.D. (1994). Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro. *J. Physiol.* 479, 381–387.
- Gandía, L., Borges, R., Abillos, A. and García, A.G. (1995). Multiple types of calcium channels are present in rat chromaffin cells. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 430, 55-63.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981). Improved Patch-clamp Techniques for High-resolution Current Recording from Cells and Cell-free Membrane Patches. *Pflügers Arch.*, 391, 85-100.
- Held, H. (1893). Die centrale Gehörleitung. *Arch. Anat. Physiol.* 17, 201-248.
- Hermann, J., Pecka, M., von Gersdorff, H., Grothe, B. and Klug, A. (2007). Synaptic transmission at the calyx of Held under in vivo-like activity levels. *J. Neurophysiol.* 98, 807-820.
- Hosoi N, Sakaba T and Neher E. (2007). Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *J Neurosci.* 27, 14286-14298.
- Kisilevsky, A.E. and Zamponi, G.W. (2008). Presynaptic calcium channels: structure, regulators and blockers. *Handbook Exp. Pharmacol.* 184, 45-75.
- Lou, X, Scheuss, V. and Schneggenburger, R. (2005). Allosteric modulation of the presynaptic Ca^{2+} sensor for vesicle fusion. *Nature* 435, 497-501.

- Neher E. and Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59, 861-872.
- Neher, E. (1988). The use of the patch-clamp technique to study second messenger-mediated cellular events. *Neuroscience*, 26, 727-734.
- Neher, E. (2006). A comparison between exocytic control mechanisms in adrenal chromaffin cells and a glutamatergic synapse. *Pflügers Arch.* 453, 261-268.
- Neher, E., Steinbach, J.H., 1978. Local Anaesthetics Transiently Block Currents Through Single Acetylcholine-Receptor Channels. *J. Physiol.*, 277, 153-176.
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- Sakaba, T. and Neher, E. (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA_B receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424, 775–778.
- Sakmann, B., Patlak, J., Neher, E., 1980. Single Acetylcholine-Activated Channels Show Burst Kinetics in the Presence of Desensitizing Agonist Concentrations. *Nature*, 286, 71-73.
- Takahashi, T., Kajikawa, Y. and Tsujimoto, T. (1998). G-protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABA_B receptor. *J. Neurosci.* 18, 3138-3146.
- Wang L.-Y., Neher E. and Taschenberger, H. (2008). Synaptic Vesicles in Mature Calyx of Held Synapses Sense Higher Nanodomain Calcium Concentrations during Action Potential-Evoked Glutamate Release. *J. Neurosci.* 28, 14450-14458.

Discurso de
contestación pronunciado
por el

Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

LAUDATIO DEL PROF. DR. EDWIN NEHER

Por el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez

Académico de Número

Excelentísima Sra. Presidenta

Excelentísimos Sres. Académicos

Dear Profesor Edwin Neher

Señoras y Señores,

Hoy es un día muy especial para mí por varios motivos. En primer lugar, he sido honrado por los Académicos de esta Institución con el privilegio de realizar la Laudatio del Prof. Erwin Neher, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1991 en el acto de su toma de posesión como Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia. En segundo lugar, tengo el placer de dar la bienvenida a un gran investigador que ha realizado importantes aportaciones científicas que nos han permitido conocer mejor dos aspectos básicos de la farmacología: la transmisión sináptica y el acoplamiento excitación-secreción de neurotransmisores y hormonas. Finalmente, como electrofisiólogo cardiaco tengo una deuda impagable de gratitud, ya que la técnica del parche de membrana que él desarrolló nos ha permitido abordar el estudio

de los canales iónicos desde nuevas perspectivas. Y es que como afirmaban Ackerman y Clapham (1), los canales iónicos son las proteínas responsables de generar y orquestar las señales eléctricas que permiten al cerebro pensar, al corazón latir y al músculo contraerse.

En mi Laudatio hablaré del científico, de su descubrimiento de la técnica del parche de membrana y del discurso de nuestro nuevo Académico de Honor.

El Científico

Erwin Neher nació en Landsberg-Lech (Alemania) el 20 de marzo de 1944 en el seno de una familia de 5 hermanos, aunque su niñez transcurrió en Buchloe, un pueblecito cercano, que distaba 70 kilómetros de la ciudad de Munich. Recuerda que su casa estaba rodeada de un gran jardín donde pasaba horas examinando las plantas y los animales. Su padre trabajaba como administrador de una central lechera, razón por la que fue eximido de ir al frente, y su madre era una profesora que cuidaba de sus 5 hijos. En su biografía reconoce que tuvo el privilegio de crecer en los difíciles años de la postguerra en una familia no destrozada por el desastre y en la que la presencia de su madre sin duda dejó una honda huella en su educación temprana y en su personalidad.

A los 10 años entró en Gymnasium de Mindelheim, regido por los hermanos Maristas. De aquella época recuerda la gran dedicación y el carácter abierto de sus profesores y cómo muy pronto se interesó por dos asignaturas, la física y las matemáticas. Por

entonces leía sobre temas relacionados con la cibernética (el tema estrella de la época) y ya mostró un gran interés por la teoría de Hodgkin y Huxley sobre la excitación nerviosa. No es pues de extrañar que en 1963 al terminar el *Gymnasium* y recibir el Abitur, que le permitía ingresar en la universidad, su elección estuviera ya hecha: sería un biofísico. Para ello primero estudiaría físicas y después biológicas. En el otoño de 1963 inició sus estudios en el Technische Hochschule de Munich, donde en 1965 obtuvo su Vordiplom en Ciencias Físicas. En 1966, ganó una Beca Fulbright para trabajar durante un año en la Universidad de Wisconsin, bajo la dirección del profesor W.W. Brennan, obteniendo al final de su estancia el Master en Ciencias en 1967. Ese mismo año, finalizada su formación en Física, decidió abordar la de Biología y a su vuelta a Munich buscó un proyecto de su interés, centrado, si fuera posible en la excitación nerviosa. Y lo encontró en el Max-Planck-Institut für Psychiatrie, donde Hans Dieter Lux investigaba los mecanismos sinápticos en motoneuronas y registraba corrientes iónicas en neuronas de caracol. Con Lux aprende los conceptos de la electrofisiología, trabaja con pipetas de succión y se familiariza con la técnica de fijación de voltaje (voltage clamp). Ello le permite realizar su primera publicación en 1969, donde analiza las corrientes transmembrana en neuronas de caracol (*Helix pomatia*) en la revista *Pflügers Arch* (2). Quiso la casualidad que se encontrara en este Instituto con otro doctorando, Bert Sakmann, quien compartía su interés por el estudio de los mecanismos sinápticos neuronales y, lógicamente, pronto se hicieron amigos.

En 1972 se incorpora como investigador al "Molekularer Systemaufbau Abteilung" del *Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie* de Göttingen. En dicho Instituto vuelve a encontrarse en 1973 con Sakmann, quien regresaba de completar tres años de estudios postdoctorales en el Departamento de Biofísica que dirigía Bernard Katz en el University College de Londres. Precisamente había sido Katz quien había postulado que la señal producida por un neurotransmisor era consecuencia de la activación de una familia de canales iónicos situados en la membrana postsináptica cuya conductancia era difícil de medir. Por tanto, no es de extrañar que al reencontrarse ambos investigadores decidieran caracterizar los diversos subtipos de canales activados por la acetilcolina a nivel de la placa neuromuscular denervada de rana, preparación en la que empezaron a registrar la actividad de los canales iónicos utilizando pipetas extracelulares en vez de los clásicos microelectrodos de vidrio utilizados por aquel entonces. La pregunta a responder era doble: si existían canales iónicos y si era así, cómo eran las corrientes que generaban.

La técnica del parche de membrana

El trabajo de Alan Hodgkin y Andrew Huxley (1952) y de Bernard Katz (1966) sugería que el potencial de acción generado en las células excitables era debido a cambios transitorios en la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ y K^+ , llegando a postular la existencia de dos conductos específicos para ambos iones. Estos conductos (denominados canales iónicos) debían de

poder activarse-abrirse en respuesta a cambios en el potencial de membrana y cerrarse-inactivarse tras haber permanecido abiertos durante un corto espacio de tiempo. Sin embargo, no se disponía de las técnicas necesarias para aislar y caracterizar las corrientes iónicas que generan los distintos canales. Para registrar una corriente de 1 pA en una amplitud de banda de 1KHz con un 10% de exactitud, la resistencia interna de la señal debería ser igual o superior a 2 GΩ. Sin embargo, las técnicas convencionales de microelectrodos obligaban a utilizar células muy grandes con una resistencia de entrada de 50-100 KΩ.

El primer registro de parches de membrana en fibras musculares denervadas de rana fue realizado por Sakmann y Neher en 1976, utilizando pipetas de vidrio con un diámetro de punta de 0.5-1 μm que colocaban sobre la superficie celular. Cuando presionaban la punta de la pipeta contra la superficie de la membrana se formaba un sello de alta resistencia (de ≈50 MΩ). El problema de esta técnica era que persistía un gran ruido de fondo (ruido de Johnson), producido por el contacto eléctrico entre el vidrio de la punta de la pipeta y el parche de membrana, que se sumaba a la señal registrada. Además, el sello no era perfecto, dada la aparente irregularidad en la membrana plasmática y de la boca de la pipeta, lo que impedía formar un sello de alta resistencia entre ambas y permitía el escape de corriente. Cuando publicaron este trabajo, el Prof. Neher se encontraba de año sabático trabajando con Charles F. Stevens en la Universidad de Yale, quien reprodujo los registros realizados en Göttingen, confirmando que no se trataba de un artefacto experimental y que el hallazgo tenía

una indudable importancia biológica. Además, el hallazgo de que la señal aparecía en forma de ondas cuadradas era una prueba de que los canales de las membranas biológicas se abrían y cerraban con carácter estaocástico, en forma todo o nada.

Pero tras el éxito inicial vino el tiempo de la frustración en el que sus múltiples intentos por mejorar la resistencia del sello modificando las preparaciones celulares y las puntas de las pipetas no dieron ningún resultado. Gracias al trabajo oscuro y persistente de Neher y Sackman, de un grupo de jóvenes brillantes que habían llegado a sus laboratorios, como Joseph Patlak, Alain Marty y Owen Hamill y de Fred Sigworth, ingeniero electrónico californiano experto en semiconductores que mejoró la calidad de los preamplificadores, se consiguió vencer todas las dificultades. El gran hallazgo vino en noviembre de 1980 con el descubrimiento del “giga-sello”, que se producía cuando se acerca una pipeta de vidrio pulida a la superficie de una célula aislada y libre de restos celulares (1-5 μm), a la cual se aplica una ligera presión negativa. Ello hace que parte de la membrana se invagine en la pipeta y, por un proceso desconocido, se produzca una unión entre la membrana y la pipeta, aumentando la resistencia a valores entre 1-100 giga Ω . Este gigasello asegura que la corriente eléctrica que fluye a través de la pipeta sea idéntica a la corriente que fluye a través de la región (“parche”) de la membrana que cubre el extremo de la pipeta. Además, la gran estabilidad de los megasellos permitió realizar múltiples configuraciones en la técnica. Si después de sellar la punta de la pipeta contra la membrana se aplica una pequeña succión, el fragmento de

membrana incluido en la pipeta se rompe y se consigue el *registro de la célula completa* ("whole-cell recording"), que permite registrar la corriente que fluye a través de todos los canales de la membrana. Por otro lado, utilizando otras configuraciones de la técnica es posible registrar las corrientes iónicas generadas por uno o más canales presentes en el parche de membrana incluido dentro del diámetro de la micropipeta. Por tanto, la técnica del parche de membrana permitió demostrar la existencia de canales iónicos, registrar las corrientes que se generan a su través, conocer sus propiedades biofísicas (selectividad, cinética de activación e inactivación) y diferenciar unos canales de otros en base a que fueran activados por cambios de voltaje, o mediadores extracelulares o intracelulares.

El trabajo en el que se describía la técnica del parche de membrana y sus distintas configuraciones fue publicado en 1981 en la revista *Pflugers Archives* (3) constituye uno de los artículos más citados en los últimos 30 años y fue la base de la concesión del Premio Nobel de Medicina en 1991 a Neher and Sakmann "*for their discoveries concerning the function of single ion channels in cells*". El impacto de esta técnica ha sido enorme, basta con hacer notar que la referencia original había recibido hasta el pasado domingo 15.846 citaciones y que se ha pasado de 3 trabajos científicos que incluían la palabra "channel" en su título en 1970 a más de 1000 en 1990 y este mismo mes al introducir esta palabra en el Pub-Med aparecían más de 118.500 citas. Ello confirma la gran repercusión científica que la técnica del parche de membrana ha tenido en la comunidad científica para conocer el

papel de los canales iónicos en la regulación de múltiples procesos biológicos.

Una característica de los giga-sellos es que permiten determinar la capacitancia eléctrica de la membrana, una medida de la superficie del área celular, habiéndose observado que la capacitancia aumentaba en condiciones de exocitosis masiva, posiblemente debido a la incorporación de la membrana vesicular en la plasmática. Aprovechando esta característica, a partir de 1982, el interés del Prof. Erwin Neher se desvió de los canales en sí mismos a los procesos que ellos inician en las células y que conducen a una respuesta celular. A lo largo de los años ha centrado su actividad investigadora en conocer los mecanismos implicados en el acoplamiento excitación-secreción de neurotransmisores y hormonas en distintos tipos celulares y, más concretamente, en el proceso de exocitosis de catecolaminas a nivel de las células cromafines de la médula adrenal y de otros neurotransmisores en células excitables o no (p.ej. mastocitos). Desde su primer trabajo en 1982, el Prof. Neher ha analizado con extraordinaria meticulosidad y elegancia experimental el papel de la concentración intracelular de Ca^{2+} y de los distintos canales de Ca^{2+} , K^+ y Cl^- en estos procesos. Otro tema que ha interesado a nuestro Laureado ha sido el análisis de los mecanismos presinápticos implicados en la transmisión sináptica, tales como la cinética del aumento focal de Ca^{2+} en los puntos de exocitosis (microdominios), el papel de los distintos contingentes o poblaciones vesiculares, el reclutamiento de vesículas y los fenómenos de potenciación, facilitación y depresión sináptica

inducidos ya sea por la propia actividad sináptica, por neurotransmisores o por fármacos.

El discurso

El discurso del profesor Neher lleva como título “La farmacología de la transmisión sináptica: la visión de un electrofisiólogo”. Inicia su discurso afirmando que no es un experto en farmacología, sino un electrofisiólogo y un biofísico de membranas. Pero no caigamos en la trampa, ya que el Prof. Neher ha trabajado mucho y muy bien en múltiples aspectos farmacológicos. ¿O hay algo más farmacológico que la modulación de la transmisión sináptica? Prueba de ello es que el primer recuerdo de su discurso es para Otto Lowei, otro destacado alumno de la Universidad de Munich, quien en 1921 demostró que la estimulación del nervio vago producía la liberación a nivel de los terminales postganglionares de la acetilcolina, lo que le valió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1936. Y por si queda alguna duda, en su discurso afirma que la transmisión sináptica y su modulación farmacológica continua siendo uno de los principales retos en Neurociencias. También repasando su Curriculum podemos comprobar su amplio conocimiento de la modulación farmacológica de los canales iónicos que incluye anestésicos locales, trifluoroperazina, toxinas (tetánica y botulínica, conotoxinas) y un amplio repertorio de agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos, colinérgicos y serotoninérgicos.

En su discurso, el Prof. Neher menciona que a pesar del gran avance producido en la modulación de las repuestas postsinápticas, los procesos presinápticos son peor conocidos y ello debido, en gran parte, a las reducidas dimensiones de los terminales presinápticos, que limitan su manipulación experimental. Sin embargo, Erwin Neher nos sorprende identificando una preparación experimental idónea, los cálices de Held, estructura del sistema auditivo descrita con gran elegancia por D. Santiago Ramón y Cajal. En esta preparación ha podido demostrar que durante el potencial de acción nervioso se produce un marcado aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (10-20 μM) en un área restringida situada a unos 20-50 nm de los canales de Ca^{2+} durante un periodo muy corto de tiempo (500 μseg), siendo este proceso regulado por ésteres de forbol. Para finalizar, el Prof. Neher señala el importante papel que la concentración intracelular de Ca^{2+} juega en el reclutamiento de vesículas que van a ser liberadas durante la actividad nerviosa, así como en los procesos de facilitación y depresión sináptica inducidos por la estimulación nerviosa de alta frecuencia y el papel que dicho reclutamiento juega en la modulación de la liberación presináptica de neurotransmisores. Toda esta ingente actividad científica pone de relieve la excepcional calidad científica y la extraordinaria dedicación del Prof. Neher a la investigación productora de ideas, a la ciencia de verdad, que contribuye al avance de nuestros conocimientos.

Una última mención debe ir dirigida a reseñar la relación existente entre el Prof. Neher y diversos investigadores españoles que trabajan en la célula cromafín, entre ellos los Drs. Antonio García, Francisco Abad, Manuela García López, Javier García Sancho, Almudena Albillos, Rafael Fernández-Chacón y Antonio Rodríguez Artalejo, quien, además, es Académico Correspondiente de nuestra Institución. De muchos de estos compañeros he recibido siempre el mismo mensaje: que el Prof. Neher es un hombre cabal, trabajador, modesto, accesible, de una sencillez y de una gran generosidad. Ello confirma que estamos no sólo ante un excelente investigador, sino también ante una gran persona.

Epílogo

Mrs. President, dear Members of the Royal Academy, ladies and gentlemen, today we incorporate into the National Royal Academy of Pharmacy to professor Erwin Neher as an Honorary Member of our Institution. This is the highest distinction that we can offer in Spain to a scientist. I hope that now that you have crossed the lintel of the door of this building that in the old times was the School of Pharmacy of Madrid you feel that this is your house forever, where you will have a place to share with us new concepts on membrane biophysics and on the modulation of the synaptic transmission in a warm and friendly atmosphere. In the name of all members of the Academy, welcome Prof. Neher to you new house.

He dicho,

Bibliografía

1. Ackerman, M. J., Clapham, D. E. Ion channels--basic science and clinical disease. *N. Engl. J. Med.* 1997;336:1575-1586.
2. Neher, E., Lux, H. D. Voltage clamp on Helix pomatia neuronal membrane; current measurement over a limited area of the soma surface. *Pflugers Arch Eur. J. Physiol.* 1969;311:272-277.
3. Hamill, O. P., Marty, A. Neher, E. Sakmann, B. Sigworth, F. J. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflügers Archiv Eur. J. Physiol.* 1981;391:85-100.