

Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Untersuchungen
zur Mg^{2+} -Regulation in CA1-Pyramidenzellen
des Ratten-Hippokampus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Petra Schulte

aus Dorsten

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W.-R. Schluë

Koreferent: Prof. Dr. K. Lunau

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Funktionelle Bedeutung des Mg^{2+}	1
1.2 Regulation von $[Mg^{2+}]_i$	4
1.3 $[Mg^{2+}]_i$ -Regulation bei neuronalen Zellen von Ratten	7
1.4 Messung von Mg^{2+}	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Versuchstiere und Präparation	11
2.1.1 Versuchstiere	11
2.1.2 Präparat	11
2.1.3 Herstellung der Hirnschnittpräparate	12
2.2 Versuchslösungen und Pharmaka	13
2.2.1 Versuchslösungen	13
2.2.2 Pharmaka	16
2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen	16
2.3.1 Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen	16
2.3.2 Intrazelluläre Ableitung des E_m	18
2.4 Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Hilfe von ionensensitiven Glasmikroelektroden	19
2.4.1 Nicolsky-Eisenman-Gleichung	19
2.4.2 Herstellung Mg^{2+} -sensitiver Zweikanal-Glasmikroelektroden	21
2.4.3 Eichung der Mg^{2+} -sensitiven Mikroelektroden	22
2.4.4 Versuchsanordnung	23
2.5 Vorversuche zur Anwendung ionensensitiver Glasmikroelektroden	24
2.5.1 Elektrolytgefüllte Theta-Glasmikroelektroden	24
2.5.2 Mg^{2+} -sensitive Theta-Glasmikroelektroden	25
2.6 Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen	28
2.6.1 Theoretische Grundlagen am Beispiel von Mag-Fura-2	28
2.6.2 Messung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Mag-Fura-2	30
2.6.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Fura-2	31
2.6.4 Beladung der CA1-Pyramidenzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	32
2.7 Auswertung der experimentellen Daten	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Qualität der Hirnschnittpräparate	36
3.2 Vorversuche zur Verwendung von Mag-Fura-2	37

3.2.1	Herstellung von Injektionselektroden mit Hilfe von Vertikal-Elektrodenziehgeräten	37
3.2.2	Herstellung von Injektionselektroden mit Hilfe von Horizontal-Elektrodenziehgeräten	38
3.2.3	Mikromanipulatoren	38
3.3	[Mg ²⁺] _i -Messungen nach Beladung der Zellen mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM	39
3.4	Effekte der iontophoretischen Farbstoffinjektion auf die CA1-Pyramidenzellen	39
3.5	E _m , [Ca ²⁺] _i und [Mg ²⁺] _i von CA1-Pyramidenzellen unter Ruhebedingungen	40
3.6	E _m , [Ca ²⁺] _i und [Mg ²⁺] _i von CA1-Pyramidenzellen in Abhängigkeit von [Na ⁺] _a	40
3.7	Beladung der CA1-Pyramidenzellen mit Mg ²⁺	42
3.8	Wirkung von Imipramin auf den Mg ²⁺ -Einstrom	43
3.9	Wirkung von Co ²⁺ und Ni ²⁺ auf den Mg ²⁺ -Einstrom	44
3.10	Abhängigkeit des Mg ²⁺ -Auswärtstransportes von [Na ⁺] _a	45
3.11	Einfluss der Osmolarität auf den Mg ²⁺ - Auswärtstransport	46
3.12	Imipramin-Sensitivität des Mg ²⁺ -Auswärtstransportes	47
3.13	Versuche zur Bestimmung von [Na ⁺] _i mit SBF1	48
4.	Diskussion	50
4.1	Qualität der Hirnschnittpräparate	50
4.2	[Mg ²⁺] _i -Messungen nach Beladung der Zellen mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM	51
4.3	Iontophoretische Injektion von Mag-Fura-2	52
4.4	Effekte der Farbstoffinjektion auf die CA1-Pyramidenzellen	53
4.5	E _m unter Ruhebedingungen und in Abhängigkeit von [Na ⁺] _a	54
4.6	[Ca ²⁺] _i unter Ruhebedingungen und in Abhängigkeit von [Na ⁺] _a	54
4.7	[Mg ²⁺] _i unter Ruhebedingungen und in Abhängigkeit von [Na ⁺] _a	55
4.8	Beladung der CA1-Pyramidenzellen mit Mg ²⁺	56
4.9	Wirkung von Co ²⁺ und Ni ²⁺ auf [Mg ²⁺] _i und den Mg ²⁺ -Einstrom	58
4.10	Abhängigkeit des Mg ²⁺ -Auswärtstransportes von [Na ⁺] _a	59
4.11	Einfluss der Osmolarität auf den Mg ²⁺ - Auswärtstransport	60
4.12	Imipramin-Sensitivität des Mg ²⁺ -Auswärtstransportes	61
4.13	Versuche zur Bestimmung von [Na ⁺] _i mit SBF1	62
4.14	Berechnungen zur Stöchiometrie des Na ⁺ /Mg ²⁺ -Austauschers	63
4.15	Schlussbetrachtung	65
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Abbildungen	93

1. Einleitung

Magnesiumionen (Mg^{2+}) sind im intrazellulären Milieu von tierischen Zellen mit einer Gesamtkonzentration von bis zu 30 mM (Maguire 1990) die häufigsten divalenten Kationen und nach K^+ die zweithäufigsten Kationen überhaupt. Dennoch wurde der Erforschung der physiologischen Funktionen von Mg^{2+} lange Zeit kaum Bedeutung zugemessen. Das Interesse an Mg^{2+} bei medizinischen, biologischen und pathophysiologischen Fragestellungen nahm erst in den letzten zwei Jahrzehnten zu und führte zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung von Mg^{2+} für viele zelluläre Prozesse. In diesem Zusammenhang kommt der Regulation der freien, intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration ($[Mg^{2+}]_i$) eine besondere Rolle zu, jedoch sind die Kenntnisse hierzu noch lückenhaft. Murphy (2000) beschrieb diese Tatsache treffend mit dem Titel „Mysteries of magnesium homeostasis“.

1.1 Funktionelle Bedeutung des Mg^{2+}

Während die Mg^{2+} -Gesamtkonzentration zwischen 10 und 30 mM liegt (Maguire 1990), erreicht der Anteil von $[Mg^{2+}]_i$ mit 0,1 bis 1 mM in den meisten tierischen Zellen weniger als ein Zehntel der Mg^{2+} -Gesamtkonzentration (Flatman 1991, Freudenrich et al. 1992, Gow et al. 1995, Kato et al. 1997, McGuigan et al. 1991, Nakayama & Tomita 1991, Nishimura et al. 1993, Sasaki et al. 1997). Die große Diskrepanz zwischen Mg^{2+} -Gesamtkonzentration und $[Mg^{2+}]_i$ geht auf ein hochwirksames intrazelluläres Mg^{2+} -Puffersystem zurück. Der größte Anteil des intrazellulären Mg^{2+} liegt in gebundener Form bzw. in intrazellulären Speichern vor. ATP, Phosphokreatin, RNA, negativ geladene Phospholipide der Zellmembran und Ca^{2+} -bindende Proteine, wie z.B. Troponin oder Parvalbumin, dienen als Bindungspartner für Mg^{2+} (Übersicht in: Ebel & Günther 1980, Günther et al. 1984a, Irving et al. 1987, Nanninga 1961), wobei mehr als 50 % des intrazellulären Mg^{2+} mit ATP einen Komplex bilden (Gupta et al 1978). In Mitochondrien (Bogucka & Woitczak 1971, 1976, Féray & Garay 1986, Günther et al. 1995, Koss et al. 1993), im Zellkern und in Mikrosomen (Übersicht in: Ebel & Günther 1980) finden sich sehr hohe Mg^{2+} -Konzentrationen und vermutlich dienen diese Zellorganellen als intrazelluläre Mg^{2+} -Speicher.

Mittlerweile ist eine Fülle von zellulären Prozessen bekannt, die Mg^{2+} -abhängig sind oder durch Mg^{2+} moduliert werden. Alvarez-Leefmans et al. (1987) bezeichneten Mg^{2+} als

„Dreh- und Angelpunkt bei der Feinkontrolle und Koordination der Zellaktivität“, da Mg^{2+} den Aktivitätszustand vieler Enzyme beeinflusst und eine Vielzahl von metabolischen Reaktionen kontrolliert. Die Zahl der Enzyme, insbesondere von ATPasen, Phosphatasen, Kinasen und Polymerasen, die durch Mg^{2+} reguliert werden, wird auf mehr als 300 geschätzt (Beyenbach 1990, Günther 1981, Maguire 1984, Prescott et al. 1988, Wacker 1980, Walser 1967, White & Hartzell 1989). Die Mg^{2+} -Wirkung beruht dabei auf einer Bindung an ein Substrat, das als Mg^{2+} -Substrat-Komplex vom Enzym umgesetzt wird und/oder einer Bindung direkt an das Enzym, wodurch eine Konformationsänderung ausgelöst wird, die zur Bindung des Substrates führt. Die Umsetzung eines Mg-Substrat-Komplexes findet bei vielen ATP-abhängigen Enzymen statt, die ATP nur in Verbindung mit Mg^{2+} (Mg-ATP) akzeptieren, wie zum Beispiel bei der Hexokinase und der Phosphoglyceratkinase. Die Regulation enzymatischer Aktivität durch direkte Bindung von Mg^{2+} an das Enzym selbst, ist beispielsweise bei der Enolase, der Pyruvat-Kinase oder auch der Pyrophosphatase verwirklicht (Übersicht in: Ebel & Günther 1980). Bei der Bildung von cAMP durch die Adenylatcyclase, die ein wichtiges Element des Signaltransduktionssystems für viele Hormone und Neurotransmitter ist und über Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration zahlreiche zelluläre Funktionen steuert (Maguire 1984), kommen beide Strategien der Enzymbeeinflussung durch Mg^{2+} zum Einsatz: die Adenylatcyclase benötigt als Substrat Mg-ATP und besitzt zusätzlich eine Bindungsstelle für Mg^{2+} (Cech et al. 1980).

Mg^{2+} wirkt an zahlreichen intrazellulären Ca^{2+} -Bindestellen kompetitiv zu Ca^{2+} . In Muskelzellen beeinflusst Mg^{2+} durch die Bindung an Troponin C die Kraft- Ca^{2+} -Beziehung und durch die Bindung an Parvalbumin die Muskelrelaxation (Donaldson & Kerrick 1975, Fabiato & Fabiato 1975, Hou & Johnson 1989, Kerrick & Donaldson 1972).

An der Zellmembran ist Mg^{2+} durch Abschirmung negativ geladener Phospholipide am Erhalt der Membranfluidität beteiligt (Amler et al. 1987, Tongyai et al. 1989, Widmer et al. 1992). Weiterhin leistet Mg^{2+} Beiträge zur Anordnung des Zytoskeletts und zur Einlagerung von Proteinen in die Zellmembran (Ebel & Günther 1980, Prescott et al. 1988).

Darüber hinaus stabilisiert Mg^{2+} die Struktur der DNA (Triebel et al. 1988) und ist bei pro- und eukaryotischen Zellen zur Auslösung von Mitose und DNA-Synthese notwendig (Walker & Duffus 1980, Walker 1986). Bei der Proteinsynthese wirkt Mg^{2+} auf rRNA

(Cox & Hirst 1976), mRNA (Horlitz & Klaff 2000), tRNA (Friederich & Hagermann 1997, Reid & Cowan 1990) und die Ribosomen-Struktur stabilisierend (Allen & Wong 1986, Spemulli & Kraus 1987). Daneben wirkt es für verschiedene DNA- und RNA-Polymerasen als Kofaktor (Focher et al. 1990)

Aus neurobiologischer Sicht ist Mg^{2+} hinsichtlich der Beeinflussung verschiedenster transmembranaler Ionen-transportsysteme von besonderer Bedeutung. Mg^{2+} verändert beispielsweise das Öffnungsverhalten von K^+ -Kanälen (Chuang et al. 1997, Ferguson 1991, Horie et al. 1987, Horie & Irisawa 1989, Matsuda et al. 1987, Robbins et al. 1992), Na^+ -Kanälen (Albitz et al. 1990, Cukierman & Krueger 1990, Lin et al. 1991) und Ca^{2+} -Kanälen (Blanchard et al. 1997, Pearson & Dolphin 1993, Wu & Lipsius 1990) und moduliert die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers (Parker et al. 1989). Die Ca^{2+} -Pumpe benötigt eine ausreichende Versorgung mit Mg-ATP, um die muskuläre Relaxation zu erleichtern (Dhalla & Zhao 1988, Engelender & De Meis 1996) und die Na^+/K^+ -ATPase ist zur Aufrechterhaltung des Na^+ -Gradienten ebenfalls auf Mg-ATP angewiesen (Askari et al. 1983, Bonting et al. 1983, De Weer 1976, Dunham & Glynn 1961, Flatman 1981, Harris 1972, Skou 1957, 1960, Sachs 1988).

Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen nimmt Mg^{2+} im medizinischen Bereich einen wachsenden Stellenwert ein, beispielsweise könnte eine latente Unterversorgung mit Mg^{2+} an der Entwicklung verschiedener Herzkrankheiten beteiligt sein (Smetana 1997), weshalb Mg^{2+} neuerdings zur Behandlung von Herzrhythmiem und Herzinfarkten eingesetzt wird. Bei Herzinfarkten tritt während der Reperfusion in den betroffenen Herzmuskelzellen eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) auf, die zytotoxische Werte erreichen kann. Vermutlich wirkt Mg^{2+} bei frühzeitiger Infusion nach einem Herzinfarkt u.a. kompetitiv zu Ca^{2+} und kann bei der Kompensation von zytotoxischen Effekten helfen (Übersicht in: McLean 1994, Seelig & Elin 1996). Neurologische Erkrankungen wie Schizophrenie und Depression werden mit Veränderungen des Mg^{2+} -Gehaltes im Blutplasma in Verbindung gebracht. Mg^{2+} kann hier zur Entwicklung des Krankheitsbildes beitragen (Ananth & Yassa 1979, Kirov & Tsachev 1990, Widmer et al. 1992). Der Mg^{2+} -Gehalt des Hirngewebes nimmt bei akutem und chronischem Alkoholkonsum ab (Altura et al. 1991, Mullins & Vink 1995). Bei traumatischen Hirnverletzungen sinkt der Mg^{2+} -Gehalt des Blutes (Cernak et al. 2000, Memon et al. 1995) sowie des Hirngewebes (Vink et al. 1987).

Verschiedene Studien bestätigen eine begünstigende Wirkung von Mg^{2+} bei der Behandlung von Hirntraumen (Übersicht in: Vink & Cernak 2000) und Hirninfarkten (Muir 2001). Bei Migräne sinkt der Mg^{2+} -Gehalt des Blutes und des Hirngewebes ab und wird mit neuronaler Übererregbarkeit und der Initiation von „spreading depression“, die als Auslöser des Migräne-Kopfschmerzes diskutiert werden, in Verbindung gebracht (Übersicht in: Welch & Ramadan 1995). Durch eine Reduktion des extrazellulären Mg^{2+} lässt sich unter anderem epileptiforme Aktivität in Hirnschnitten des Ratten-Hippokampus auslösen (Mody et al. 1987, Whittington et al. 1995).

1.2 Regulation von $[Mg^{2+}]_i$

Bei allen bisher untersuchten tierischen Zellen liegt $[Mg^{2+}]_i$ zwei bis drei Größenordnungen unterhalb des Wertes, der sich für eine passive Verteilung von Mg^{2+} über der Membran ergeben würde (Maguire 1990, McGuigan et al. 1991). Daher galt den Mechanismen, die Mg^{2+} aktiv aus der Zelle entfernen, in vielen Untersuchungen großes Interesse. Ein primär aktiver Mechanismus für den Mg^{2+} -Auswärtstransport wurde bisher noch nicht gefunden, wohl aber sekundär aktive Mechanismen, die sowohl Na^+ -abhängig als auch Na^+ -unabhängig sein können.

An verschiedenen Zelltypen wurden Na^+/Mg^{2+} -Austauscher nachgewiesen, die intrazelluläres Mg^{2+} gegen extrazelluläres Na^+ austauschen. Die Stöchiometrie, Energieabhängigkeit und Sensitivität dieser Austauscher gegenüber bestimmten Pharmaka, insbesondere Amilorid, variiert von Präparat zu Präparat (Übersicht in Beyenbach 1990, Flatman 1991). Na^+/Mg^{2+} -Austauscher mit Stöchiometrien von $1 Na^+ : 1 Mg^{2+}$ (Buri & McGuigan 1990, Flatman & Smith 1990, Frenkel et al. 1989, Günzel & Schlue 1996, Lüdi & Schatzmann 1987), $2 Na^+ : 1 Mg^{2+}$ (Blatter 1990, 1991, Günther et al. 1995, Günther & Vormann 1990) und $3 Na^+ : 1 Mg^{2+}$ wurden beschrieben (Féray & Garay 1988, Tashiro & Konishi 1997). Frenkel et al. (1989) und Lüdi & Schatzmann (1987) postulierten, dass der Na^+/Mg^{2+} -Austauscher zusätzlich Energie aus der Spaltung von ATP benötigt. Dagegen sprechen die Daten von Dipolo & Beaugé (1988), Günther et al. (1990) und Günther & Vormann (1995) eher für eine Aktivierung des Austauschers durch direkte Phosphorylierung und damit gegen einen primär aktiven Transport von Mg^{2+} . In den meisten Fällen konnten die Na^+/Mg^{2+} -Austauscher durch Amilorid, Imipramin und Quinidin inhibiert werden (Féray

& Garay 1986, 1988, Flatman & Smith 1990, Günther et al. 1989, 1990, Günzel & Schlue 1996, Nakayama & Nomura 1995, Wolf et al. 1994). Der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher in Herzzellen wird hinsichtlich seiner hormonellen Beeinflussbarkeit kontrovers diskutiert. Mehrere Arbeitsgruppen haben bei Applikation von Adrenalin und Noradrenalin eine Steigerung des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Auswärtstransportes beobachtet (Günther & Vormann 1992, Romani et al. 1991, Romani & Scarpa 1990, 1992), jedoch konnten Altschuld et al. (1994) diese Ergebnisse am gleichen Präparat nicht bestätigen. Bei verschiedenen Präparaten führte membrangängiges cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) in Form von Derivaten, wie 8-Bromo-cAMP und Dibutyryl-cAMP, oder der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin zu einem verstärkten Mg^{2+} -Auswärtstransport (Günther & Vormann 1992, Romani et al. 1991, Romani & Scarpa 1990). Die Aktivierung der IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat)-Kaskade und/oder der Arachidonsäure-Kaskade bewirkte ebenfalls eine Steigerung der Aktivität des Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Austausches (Wolf et al. 1994, 1996).

Als Beispiele für Na^+ -unabhängige Mechanismen des aktiven Mg^{2+} -Transports sind Cl^- -abhängige Mg^{2+} -Kotransporte in Vertebraten-Erythrozyten (Günther et al. 1989, 1990), Enterozyten von Fischen (Bijvelds et al. 1996, 1998) und Ratten-Hepatozyten (Romani et al. 1993) zu nennen. Bei Hepatozyten wurde von Cefaratti et al. (1998) außerdem ein $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher beschrieben. Bei Herzmuskelzellen der Ratte gibt es ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -abhängiges Mg^{2+} -Regulationssystem (Ödblom & Handy 1999). In Epithelzellen des Schafrumens (Leonard-Marek et al. 1998) sowie des Caecums und Colons der Ratte (Scharrer & Lutz 1990) sprechen experimentelle Befunde für einen $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher. In Tintenfisch-Riesenaxonen gibt es Hinweise auf einen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher (Rasgado-Flores & Gonzales-Serratos 1990) und Montes et al. (1990) beschrieben in Muskelzellen der Seepocke neben einem Na^+ -abhängigen auch einen K^+ -abhängigen Mg^{2+} -Transport. In Neuronen des medizinischen Blutegels wird neben einem $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher auch ein $\text{Mg}^{2+}/\text{Malat}$ -Kotransport postuliert (Günzel et al. 2002). Bei pflanzlichen Zellen konnte in der Vakuolenmembran ein elektrogener $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher nachgewiesen werden, der auch Zn^{2+} als Substrat akzeptiert (Shaul et al. 1999).

Die Kenntnisse über die Mechanismen des Mg^{2+} -Einstroms in die Zelle sind zur Zeit noch begrenzt. Vermutlich gelangt Mg^{2+} dem elektrochemischen Mg^{2+} -Gradienten folgend pas-

siv durch Ionenkanäle oder Carrier in die Zelle. Im Vergleich zu anderen physiologisch relevanten Ionen, wie Na^+ , K^+ und Ca^{2+} , hat Mg^{2+} den kleinsten Ionenradius und in wässriger Lösung die größte Hydrathülle, die bei der Passage durch Ionenkanäle abgestreift werden muss. Die aufzuwendende Dehydratationsenergie ist sehr hoch und behindert die Permeation durch unspezifische Kationenkanäle (Burnashev et al. 1992, Flatman 1991). Die Eigenschaften Mg^{2+} -spezifischer Transportsysteme sollten an diese Eigenschaften angepasst sein (Smith & Maguire 1998). Ein spezieller Mg^{2+} -Kanal (Alr1) konnte bisher nur in der Plasmamembran von Hefezellen nachgewiesen werden (Graschopf et al. 2001). In der inneren Mitochondrienmembran von Hefezellen und Menschen wurden Homologe zu diesem Protein gefunden (Zsurka et al. 2001). Bei *Salmonella typhimurium* wurde ein Protein (CorA) identifiziert und kloniert, das Mg^{2+} zelleinwärts transportiert. Außerdem konnten an diesem Präparat P-Typ-ATPasen (MgtA und MgtB) nachgewiesen werden, die ebenfalls einen Mg^{2+} -Einstrom vermitteln (Übersicht in: Smith & Maguire 1998). Elektrophysiologische Studien an anderen Präparaten legen einen Mg^{2+} -Einstrom durch Ionenkanäle nahe. Preston (1990) fand bei *Paramecium* Mg^{2+} -Ströme, die er auf einen Ionenkanal zurückführte, der zwar für Mg^{2+} durchlässig ist, nicht aber für Na^+ und K^+ . Bei Stäbchenphotorezeptoren Retina von Kröten wird ein Mg^{2+} -Einstrom durch einen Ionenkanal vermutet, der zwischen Ca^{2+} und Mg^{2+} nur geringfügig unterscheiden kann (Nakatani & Yau 1988). Bei Seepocken weisen Ergebnisse von Montes et al. (1989) auf eine Mg^{2+} -Leitfähigkeit der Muskelzellen hin, die etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die Leckleitfähigkeit für Na^+ .

Maguire (1987) fand in einer Hybridzelllinie aus Neuroblastom- und Gliazellen eine rezeptorgekoppelte Modulation des Mg^{2+} -Einstroms, die sich mit der Differenzierung der Zellen verändern kann. Bei kultivierten Neuronen des Rattengehirns wird ein Mg^{2+} -Einstrom durch ionotrope NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren vermutet (Stout et al. 1996).

Die Umkehr von Mg^{2+} -Transportmechanismen ist eine weitere Möglichkeit des Mg^{2+} -Einstroms. Bei Retzius-Neuronen des Blutegels beruht der Mg^{2+} -Einstrom bei Applikation hoher extrazellulärer Mg^{2+} -Konzentrationen beispielsweise auf einem Zusammenspiel zwischen der Umkehr des 1 Na^+ /1 Mg^{2+} -Austauschers und einem passiven Mg^{2+} -Einstrom, der durch polyvalente Kationen (Ni^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} oder Gd^{3+}) teilweise blockiert werden kann

(Günzel & Schlue 1997). Ascites-Zellen weisen einen Furosemid-sensitiven $\text{HCO}_3^-/\text{Mg}^{2+}$ -Cotransport auf, der für die Wiederbeladung Mg^{2+} -verarmter Zellen verantwortlich zu sein scheint und beim Erreichen physiologischer Mg^{2+} -Konzentrationen inaktiviert (Günther & Vormann 1985, Günther et al. 1986). Bei Hühner-Erythrozyten transportiert der elektro-neutrale $2 \text{Na}^+/1 \text{Mg}^{2+}$ -Austauscher im Umkehrmodus extrazelluläres Mg^{2+} in die Zelle hinein (Günther et al. 1984b, Günther & Vormann 1985) und durch Amilorid wird dieses Transportsystem gehemmt (Günther & Vormann 1988). Ähnliche Ergebnisse erhielten Féray & Garay (1987) an Erythrozyten von Ratten, die darüber hinaus beobachteten, dass der $2 \text{Na}^+/1 \text{Mg}^{2+}$ -Austauscher auch Mn^{2+} transportiert.

1.3 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Regulation bei neuronalen Zellen von Ratten

Die Untersuchungen zur $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Regulation in neuronalen Zellen von Säugetieren beschränken sich zur Zeit auf kultivierte Neuronen als Präparate, die entweder aus dem Dorsalwurzel-Ganglion oder dem Vorderhirn von Ratten stammten.

Bei kultivierten Dorsalwurzel-Ganglienzellen der Ratte löste eine Depolarisation einen gleichzeitigen Anstieg von $[\text{Mg}^{2+}]_i$ und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus, der durch Cadmium und Verapamil als Blocker spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle hemmbar war (Kato et al. 1997). Der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg war auch in Abwesenheit von extrazellulärem Mg^{2+} zu beobachten und schließlich wurde eine Ca^{2+} -induzierte Mg^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Mg^{2+} -Speichern postuliert. Gotoh et al. (1999) stellten in einer nachfolgenden Untersuchung fest, dass der depolarisationsinduzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg etwa 0,5 Sekunden früher begann als der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg und schlossen sich daher der These von Kato et al. (1997) an.

In kultivierten kortikalen Rattenneuronen konnten Brocard et al. (1993) durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren eine $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Erhöhung auslösen, die von der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig war. Der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg war in Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ vergrößert und konnte durch Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration weiter gesteigert werden. Diese Befunde führten die Autoren auf die Beteiligung eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers an der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Erhöhung zurück. In einer späteren Untersuchung zeigten Stout et al. (1996) jedoch, dass der durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ausgelöste $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg auf der Permeation von Mg^{2+} durch diese Ionenkanäle

beruhte und dass der größte Anteil des anschließenden Mg^{2+} -Auswärtstransports durch einen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bewirkt wurde. Zusätzlich postulierten sie die Existenz eines weiteren Mg^{2+} -Transportmechanismus, der durch extrazelluläres Ca^{2+} gehemmt wurde.

1.4 Messung von Mg^{2+}

Mg^{2+} besitzt in wässriger Lösung einen kleinen Ionenradius. Die hohe Ladungsdichte auf der Oberfläche des Ions führt zur Ausbildung einer großen Hydrathülle, die nur unter hohem Energieaufwand entfernt werden kann. Die Bindestellen für Mg^{2+} müssen groß sein und sind auch anderen Ionen zugänglich und daher für Mg^{2+} unspezifisch. Die Interferenz durch andere Ionen bei der Mg^{2+} -Detektion mit Farbstoffindikatoren oder Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden kann beträchtlich sein.

Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Messung der totalen intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration sind Atom-Absorptions-Spektroskopie (Sanui & Rubin 1982) und Röntgen-Mikroanalyse (Somlyo et al. 1981, 1985).

Zur Messung der freien, intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration werden vor allem ^{31}P - oder ^{19}F -NMR (Cohen & Burt 1977, Kirschenlohr et al. 1988, Wu et al. 1981), Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden (Buri & McGuigan 1991) und Mg^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (Raju et al. 1989). In der Vergangenheit gab es zudem Messungen mit Hilfe von Nullpunkttitrationen (Alvarez-Leefmans et al. 1987), Enzymabhängigkeitstests (England et al. 1967) und metallochromen Färbungen (Scarpa 1974).

Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden und der Mg^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Mag-Fura-2 sind für direkte, kontinuierliche Messungen am lebenden Präparat am besten geeignet. Der wichtigste Vorteil der Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden ist die simultane Bestimmung der Mg^{2+} -Konzentration und des Membranpotentials. Da der Öffnungsquerschnitt der Glasmikroelektroden relativ groß ist, ist außerdem sichergestellt, dass nur die Mg^{2+} -Konzentration des Zytoplasmas bestimmt wird und nicht die von intrazellulären Organellen. Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden können jedoch wegen ihrer Größe nur bei Zellen mit einer bestimmten Mindestgröße verwendet werden.

Mag-Fura-2 ist in zwei Formen erhältlich: in der membrangängigen Acetoxymethylester-Form (Mag-Fura-2/AM) und in der membranimpermeablen Form (Mag-Fura-2). Die beiden Formen des Farbstoffs unterscheiden sich in der Beladungstechnik. Bei Mag-Fura-2/AM sind alle fünf der (negativ geladenen) Carboxylgruppen des Farbstoffs durch Veresterung mit einer Acetoxymethylgruppe neutralisiert. Dadurch ist Mag-Fura-2/AM ungeladen und hydrophob und somit membranpermeabel. Außerdem ist Mag-Fura-2/AM in diesem Zustand nicht Mg^{2+} -sensitiv (inaktiver Zustand). Nachdem der Farbstoff durch die Zellmembran in den Intrazellulärraum gelangt ist, wird er in die Mg^{2+} -sensitive, membranimpermeable Form überführt, indem die Acetoxymethylgruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten werden. Mag-Fura-2/AM kann bei Zellen beliebiger Größe angewendet werden. Der Nachteil dieser Form des Farbstoffs ist seine Akkumulation in intrazellulären Speichern (Churchill & Louis 1999, Hofer et al. 1995, 1998), so dass eine ausschließlich zytoplasmatische Messung von Mg^{2+} nicht sicher ist. Bei der membranimpermeablen Form von Mag-Fura-2, die mit Hilfe von Glasmikroelektroden iontophoretisch oder durch Druck in die Zellen injiziert wird, kann dieses Problem ausgeschlossen werden. Jedoch sollten die Zellen wegen der Notwendigkeit der Farbstoffinjektion, wie bei Verwendung von Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden, eine bestimmte Mindestgröße haben, wobei diese aufgrund der unterschiedlichen Elektrodeneigenschaften deutlich kleiner sein kann als bei Anwendung Mg^{2+} -sensitiver Glasmikroelektroden. Mögliche Interferenzen mit verschiedenen Substanzen müssen sowohl bei Verwendung Mg^{2+} -sensitiver Glasmikroelektroden als auch bei Verwendung von Mag-Fura-2, sorgfältig geprüft und berücksichtigt werden. Beispielsweise interferiert am Mg^{2+} -Sensor Mg^{2+} -sensitiver Glasmikroelektroden in erster Linie K^+ , bei Mag-Fura-2 dagegen Ca^{2+} .

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel angefertigt, eine Messmethode zur Bestimmung von $[Mg^{2+}]_i$ in CA1-Pyramidenzellen im Schnittpräparat des Ratten-Hippokampus zu etablieren, um schließlich Erkenntnisse zur $[Mg^{2+}]_i$ -Regulation in diesem Zelltyp zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht, die Methode Mg^{2+} -sensitiver Glasmikroelektroden zu verwenden. Da die Anwendung Mg^{2+} -sensitiver Glasmikroelektroden zu keinen konkreten Ergebnissen führte, ist die Entwicklung der Technik und ihre Anwendung im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Bestimmung von $[Mg^{2+}]_i$ erfolgte mit Hilfe des Mg^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Mag-Fura-2. Im Verlauf der Untersuchungen wurden der Mg^{2+} -Einstrom und der Mg^{2+} -Auswärtstransport untersucht, wobei als Mechanismus des Mg^{2+} -Auswärtstransportes ein Na^+/Mg^{2+} -Austauscher identifiziert werden konnte.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Präparation

2.1.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an Hirnschnittpräparaten des Hippokampus von Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) durchgeführt, die in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet worden waren. Die Wistar-Ratte gehört dem Stamm der *Chordata* (Klasse *Mammalia*, Ordnung *Rodentia*, Familie *Muridae*) und ist eine typische Albino-Ratte, die durch Zuchtauswahl zu Laborzwecken gezüchtet wurde.

Abb. 1A zeigt eine schematische Darstellung der Außenansicht eines vollständig freigelegten Rattengehirns. Das Vorderhirn ist stark entwickelt und überdeckt Zwischenhirn und Mittelhirn nahezu vollständig. Die Oberfläche der beiden Großhirnhemisphären ist glatt und zeigt nicht die für höhere Säugetiere charakteristischen Furchen und Windungen. In der Darstellung ist die linke Großhirnhemisphäre eröffnet und legt den Blick auf den Hippokampus frei.

2.1.2 Präparat

Der Hippokampus, auch Ammonshorn bzw. Cornu ammonis genannt, ist eine bilaterale Struktur, die dem limbischen System zugerechnet wird. Sie umfasst das Subikulum und den Gyrus dentatus. Der Hippokampus wird weiterhin aufgrund histologischer Eigenschaften in die Regionen CA1, CA2 und CA3 unterteilt (CA von Cornu ammonis, Übersicht in: Isaacson 1987).

Der wichtigste exzitatorische Schaltkreis des Hippokampus ist trisynaptisch (Abb. 1B). Die wichtigsten kortikalen Afferenzen dieses Schaltkreises laufen aus dem entorhinalen Kortex über die Axone des Traktus perforans in den Gyrus dentatus ein, die mit den Dendriten der Körnerzellen verschaltet sind. Die Körnerzellen senden ihre Axone, die Moosfasern, zu den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen im Hippokampus. Die Axone der CA3-Pyramidenzellen verlassen den Hippokampus über die Fimbria, zweigen aber vorher an den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen endende Kollaterale ab, die sogenannten Schafferkol-

lateralen (Amaral & Witter 1989). Die Axone der CA1-Pyramidenzellen verlassen den Hippokampus sowohl über die Fimbria als auch über das Subikulum. Der Erregungsfluss innerhalb dieses zentralen Schaltkreises wird durch lokale Schaltkreise, die überwiegend inhibitorisch wirken, zusätzlich moduliert (Übersicht in: Freund & Buzsáki 1996).

2.1.3 Herstellung der Hirnschnittpräparate

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden *in vitro* an Hirnschnittpräparaten des Ratten-Hippokampus durchgeführt. Für die Herstellung dieser Präparate wurden 4-6 Wochen alte Wistar-Ratten durch Inhalationsnarkose mit Enfluran (2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl-(difluormethyl) ether, Produktbezeichnung: Ethrane, Abbott GmbH, Wiesbaden) narkotisiert und mittels einer Guillotine dekapitiert. Zuerst wurde die Kopfhaut durch einen Schnitt entlang der Längsachse des Tieres mit einem Skalpell durchtrennt und mit den Fingern zu den Seiten geschoben, um das Schädeldach freizulegen. Anschließend wurde mit einem tiefen Skalpellschnitt quer zur Längsachse der Interparietalknochen mit dem darunter liegenden Kleinhirn entfernt. Zur Eröffnung des Schädeldachs wurde der Parietalknochen entlang der Medianlinie mit einer Schere unter flacher Schnittführung bis über das Bregma hinaus eröffnet. Mit einer Knochenzange wurden die halbierten Knochenplatten inklusive der darunter liegenden Hirnhaut entfernt. Das Gehirn wurde sofort mit sauerstoffgesättigter (Carbogen-Begasung: 95 % O₂, 5 % CO₂), eiskalter (2-4 °C), Ca²⁺-reduzierter Lösung überspült (Präp-ACSF, Tabelle 1, ACSF = Artifizielle Cerebro-Spinal-Flüssigkeit). Danach wurden durch einen querverlaufenden Skalpellschnitt in Höhe des Bregmas die Riechlappen sowie ein kleiner Teil des Vorderhirns abgetrennt und die beiden verbliebenen Hirnhälften mit dem Skalpell voneinander getrennt. Eine der beiden Hirnhälften wurde mit Hilfe eines gebogenen Lösungsspatels entnommen und in eiskalte, sauerstoffgesättigte Präp-ACSF überführt. Die Zeit zwischen Dekapitation und Hirnentnahme betrug in der Regel weniger als eine Minute. Nach ca. 90 s wurde die Hirnhälfte mit einem Spatel vorsichtig der eiskalten Lösung entnommen, mit der Medianseite auf ein Stück Filterpapier getupft, mit einem Tropfen Gewebekleber (Bonding) auf einem Teflonblock fixiert und, von eiskalter, sauerstoffgesättigter Präp-ACSF bedeckt, mit einem Vibratom (Vibroslice NVSLM 1) in 350 µm dicke Scheiben geschnitten. Mit Hilfe einer gekürzten, feuerpolierten Pasteurpipette (Durchmesser ca. 4 mm) wurden die Hirnschnitte in eine Petrischale überführt, um den Hippokampus unter Sichtkontrolle (Binokular, Olympus) mit

zwei feinen Skalpellenspitzen zu isolieren. Während dieses Präparationsschrittes wurden geschädigte Hirnschnitte aussortiert und verworfen (Alger et al. 1984, siehe auch Kapitel 4.1). Die erhaltenen 6-8 Hirnschnittpräparate des Ratten-Hippokampus wurden in sauerstoffgesättigte ACSF (Tabelle 1) überführt und bis zum Beginn des Experimentes, jedoch mindestens für eine Stunde, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Kontrolle des pH-Wertes war die ACSF mit Phenolrot (Aldrich) versetzt. Die Hirnschnittpräparate waren bis zu 12 Stunden haltbar (siehe auch Kapitel 3.1).

2.2 Versuchslösungen und Pharmaka

2.2.1 Versuchslösungen

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Zur Herstellung der Versuchslösungen wurden 10-fach konzentrierte Stammlösungen verwendet, die mit demineralisiertem Wasser (spezifischer Widerstand: 18 M Ω *cm, Entsalzungsanlage, Milli Q Reagent Watersystem, Millipore) im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden. Alle Lösungen waren CO₂/HCO₃⁻ gepuffert, wobei der pH-Wert durch ständige Begasung mit Carbogen auf 7,4 eingestellt wurde. Die Begasung der Versuchslösungen diente auch der Versorgung der Hirnschnittpräparate mit Sauerstoff. Die Temperatur der Lösungen in der Versuchswanne betrug 34,5 °C und wurde mit Hilfe des in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Wasserbades eingestellt.

In den Experimenten wurde durch Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration in der Badlösung ([Mg²⁺]_a) ein Mg²⁺-Einstrom in die CA1-Pyramidenzellen ausgelöst. Um bei der [Mg²⁺]_a-Erhöhung die Osmolarität der Lösung konstant zu halten, wurde die Na⁺-Konzentration in der Badlösung ([Na⁺]_a) entsprechend reduziert. Bei einer Erhöhung von [Mg²⁺]_a von 1,3 auf 30 mM entspricht dies einer [Na⁺]_a-Reduktion von etwa 150 auf 110 mM. Damit der Beitrag eines möglicherweise vorhandenen Na⁺/Mg²⁺-Austauschers am Mg²⁺-Einstrom konstant blieb, wurde auch in den übrigen Lösungen [Na⁺]_a konstant auf 110 mM eingestellt, wobei ein osmotischer Ausgleich mit Cholin-Cl erfolgte. Zusätzlich wurde der Mg²⁺-Einstrom in Gegenwart von 50 mM [Na⁺]_a untersucht. Hier reichte in der 30 mM Mg²⁺/50 mM Na⁺-Lösung die Erhöhung von [Mg²⁺]_a auf 30 mM zum osmotischen Ausgleich allein nicht aus. Daher mussten zusätzlich etwa 57 mM Cholin-Cl hinzugefügt wer-

den (Tabelle 1). Um eine Na^+ -Konzentration von 15 mM zu erreichen, wurde NaCl vollständig durch Cholin-Cl ersetzt. Zusätzlich musste NaHCO_3 von 25,6 auf 13,8 mM reduziert werden. Die Einstellung des pH-Wertes von 7,4 und die richtige Osmolarität wurde durch Zugabe von 11,8 mM Cholin- HCO_3 gewährleistet. Die Osmolaritäten der Versuchslösungen wurden mit Hilfe eines Osmometers (Gonotec Osmomat 030) überprüft. Sie variierten zwischen 294 und 300 mOsmol/kg und stimmten mit dem theoretisch berechneten Wert von 302 mOsmol/kg gut überein. Die Lösung mit 194 mM Na^+ wurde durch Zugabe von 43 mM NaCl ohne osmotischen Ausgleich hergestellt, wobei die Osmolarität 385 mOsmol/kg betrug. In Kontrollexperimenten wurde eine Lösung verwendet, der anstelle von NaCl 86 mM Sorbitol hinzugefügt wurden (387 mOsmol/kg).

Tabelle 1 : Zusammensetzung der Versuchslösungen (Angaben in mM)

	NaCl	KCl	MgCl₂	CaCl₂	NaH₂PO₄	Cholin-Cl	NaHCO₃	Glucose	Cholin-HCO₃
ACSF	124	3	1,3	2	1,24	-	25,6	10	-
194 mM Na⁺	167	3	1,3	2	1,24	-	25,6	10	-
110 mM Na⁺	80,4	3	1,3	2	1,24	43,7	25,6	10	-
50 mM Na⁺	23,2	3	1,3	2	1,24	100,8	25,6	10	-
15 mM Na⁺	-	3	1,3	2	1,24	124	13,8	10	11,8
30 mM Mg²⁺/ 110 mM Na⁺	80,4	3	30	2	1,24	-	25,6	10	-
30 mM Mg²⁺/ 50 mM Na⁺	23,2	3	30	2	1,24	57,2	25,6	10	-
Präp-ACSF	126,3	3	1,3	0,5	1,24	-	25,6	10	-

Der pH-Wert wurde durch ständige Begasung mit Carbogen auf 7,4 konstant gehalten.

2.2.2 Pharmaka

Um Imipramin (Hydrochlorid, Sigma) vor einer möglichen photochemischen Zersetzung zu schützen, wurde die Substanz bis zum Beginn des Experimentes dunkel gelagert. Versuchslösungen mit Imipramin wurden jeweils nur an einem Versuchstag benutzt.

Nickel (Ni^{2+}) und Cobalt (Co^{2+}) wurden in Form von Chloridsalzen den Versuchslösungen direkt zugesetzt. Diese Versuchslösungen enthielten kein NaH_2PO_4 , um Niederschlagsbildung zu vermeiden.

2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.3.1 Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik zur Herstellung von Hirnschnittpräparaten am Institut für Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität etabliert. Die Vitalität der Hirnschnittpräparate wurde durch elektrische Reizung in der CA3-Region und Ableitung der ausgelösten Feldpotentiale in der CA1-Region geprüft. Mit Hilfe der Amplitude der Feldpotentiale wurde die Vitalität der Hirnschnittpräparate beurteilt. Die elektrische Reizung sowie die Ableitung des Feldpotentials wurden dabei extrazellulär vorgenommen.

Zur Herstellung der Reizelektroden wurden zwei feine, elektrisch isolierte Wolfram-Drähte (WPI, Microelectrode Tungsten TM33B10) von hinten durch die beiden Kanäle eines Theta-Glaskapillaren-Rohlings (TCG 200-15, Clark Electromedical Instruments) eingeführt, so dass vorne die Spitzen der Drähte etwa 5 mm aus den Öffnungen hervorragten. Die Drähte wurden mit Sekundenkleber (UHU) fixiert.

Zur Herstellung der Ableitelektroden wurden 15 cm lange Glaskapillaren mit Innenfilament (GC 150 F-15, Clark Electromedical Instruments) zunächst halbiert und dann mittels eines Vertikal-Elektrodenziehgerätes (Narishige PE-2) zu zwei Glasmikroelektroden ausgezogen. Mit Hilfe einer Injektionskanüle wurden die Glasmikroelektroden von der hinteren Öffnung her mit ACSF gefüllt. Anschließend wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt und die hintere Öffnung mit Hartklebewachs (Deiberit 502, Ludwig Böhme K.-G.) verschlossen.

Die Spitzendurchmesser der Ableitelektroden waren $< 1 \mu\text{m}$ und die Widerstände betragen in ACSF etwa $80 \text{ M}\Omega$. Da bei zu hohem Widerstand der Ableitelektrode das nur wenige Millivolt große Nutzsignal durch ein beträchtliches Reizartefakt überlagert und damit nicht mehr messbar war, wurden kurz vor dem Experiment die Elektrodenspitzen mit einer feinen Dumontpinzette unter Sichtkontrolle vorsichtig abgebrochen, so dass der Spitzendurchmesser nun etwa $5 \mu\text{m}$ betrug und der in ACSF gemessene Widerstand $< 5 \text{ M}\Omega$ war (Abb. 2B).

In Abb. 2A ist der Aufbau der Apparatur schematisch dargestellt. Mit einer stumpfen Pasteurpipette wurde ein Hirnschnittpräparat in die Versuchswanne aus Acrylglas überführt und mittels eines U-förmig gebogenen, mit Nylonfäden (Falke) bespannten Titandrahtes (WPI, TI4024) beschwert. Eine kontinuierliche Überspülung des Hirnschnittpräparates mit sauerstoffgesättigter Versuchslösung erfolgte durch einen gravitationsgetriebenen Lösungszufluss in die Versuchswanne (Volumen ca. 1 ml) mit einer Geschwindigkeit von ca. 4 ml/min. Der Lösungsabfluss erfolgte durch Abtropfen und wurde durch einen schmalen Streifen saugfähigen Filterpapiers (Tissue Tek, LT4699) erleichtert. Die Lösungen wurden über einen gasdichten Schlauch (Tygon R 3603, $\varnothing 2 \text{ mm}$) zugeführt, so dass O_2 -Sättigung und pH-Wert der Versuchslösungen nicht durch die Diffusion von O_2 bzw. CO_2 durch die Schlauchwandung hindurch beeinträchtigt wurden.

Die Temperatur der Versuchslösungen in der Versuchswanne betrug $34,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Sie wurde eingestellt, indem der Zuflussschlauch kurz vor der Versuchswanne über eine Distanz von ca. 30 cm durch ein Wasserbad geleitet wurde, dessen Temperatur über einen Thermostaten (Lauda) geregelt wurde. Um eine optimale Wärmeübertragung zu gewährleisten, war im Wasserbad der Schlauch durch ein Stahlröhrchen gleichen Querschnittes ersetzt. Die Temperaturkontrolle in der Versuchswanne erfolgte mit Hilfe eines Miniaturthermometers (Geissinger electronic, GTH 1200 Digitalthermometer).

Die Badlösung war über eine mit einem chloriertem Silberdraht versehene Agarbrücke (3 % Agar in 3 M KCl) geerdet. Die Positionierung von Reiz- und Ableitelektrode erfolgte unter optischer Kontrolle (Wild, Herbrug, Schweiz) mit Hilfe von mechanischen Mikromanipulatoren (Leitz). Die Reizelektrode war über eine Reizisoliereinheit (Digitimer, Modell DS2) mit einem Reizpulsgenerator (Digitimer, Modell D100) verbunden. Das Sig-

nal der Ableitelektrode wurde über einen Messverstärker (WPI Electrometer, Modell Duo 773) sowohl einem Oszilloskop (Nicolet Digital Oscilloscope 2090) als auch über einen Analog-Digital-Wandler (Eigenbau Elektronik-Werkstatt der Universität Düsseldorf) einem Computer zugeleitet. Die Umwandlung der Messdaten in ein Dateiformat, das in das Tabellenkalkulationsprogramm Exel 97 eingelesen werden konnte, erfolgte mittels eines nicht-kommerziellen Datenerfassungsprogramms (E. von Berg, Institut für Neurobiologie, Universität Düsseldorf). Zur Reduzierung von elektrischen Störungen befanden sich Versuchswanne, Messkopf, Binokular und Mikromanipulatoren in einem geerdeten Faraday-Käfig.

2.3.2 Intrazelluläre Ableitung des E_m

Konventionelle Einzelkanal-Glasmikroelektroden wurden zur Ableitung des Membranpotentials (E_m) verwendet. 10 cm lange Glaskapillaren mit Innenfilament (Borosilikatglas BF 100-50-10) der Firma Sutter wurden mit einem Horizontal-Elektrodenziehgerät (Sutter Instrument Co., Flaming/Brown Micropipette Puller, Modell P 97) zu zwei Glaskapillaren ausgezogen, deren Spitzendurchmesser etwa 0,1 μm betrug (Rasterelektronenmikroskop-Untersuchung, Abb. 2C). Nach dem blasenfreien Füllen mit 2 M KAc/5 mM KCl-Lösung und Einführen eines chlorierten Silberdrahtes wurde die hintere Öffnung der Glasmikroelektroden mit Hartklebewachs verschlossen. Der in ACSF gemessene Widerstand der Glasmikroelektroden lag zwischen 120 M Ω und 160 M Ω .

Die Versuchsanordnung zur intrazellulären Ableitung von E_m entsprach der Anordnung zur Ableitung von Feldpotentialen, wobei die Einrichtungen zur extrazellulären Reizung keine Verwendung fanden. Der Einstich in die Zelle erfolgte „blind“ durch Positionierung der Glasmikroelektrode über den Zellkörpern der Pyramidenzellen der CA1-Region und anschließendes Absenken der Glasmikroelektrode mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (David Kopf Instruments, Hydraulic Micro-Drive, Direct 1:1) in Schritten von 2-5 μm . Zusätzlich wurde eine elektrische Einstichhilfe verwendet. Dabei handelte es sich um eine elektrische Sinusschwingung (Frequenz: 4 kHz, Amplitude: 120 mV), die jeweils für etwa eine Sekunde über den Messverstärker (WPI Electrometer, Modell Duo 773) auf die Glasmikroelektrode gelegt wurde. Direkt nach dem Einstich wurde für etwa 10 min ein

Strom von $-0,5 \text{ nA}$ in die Zelle injiziert, um deren E_m zu stabilisieren bzw. das Einheilen der Glasmikroelektrode zu erleichtern.

2.4 Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Hilfe von ionensensitiven Glasmikroelektroden

Der ursprünglichen Planung des Projektes entsprechend, wurde zu Beginn der Arbeit der Versuch unternommen, $[\text{Mg}^{2+}]_i$ bei CA1-Pyramidenzellen mit Hilfe von ionensensitiven Glasmikroelektroden zu messen.

2.4.1 Nicolsky-Eisenman-Gleichung

Mit ionensensitiven Mikroelektroden können intrazelluläre Ionenaktivitäten in Form von Ionenpotentialen gemessen werden. Dazu wird die Elektrodenspitze mit einem Flüssigmembran-Ionophor gefüllt und mit einer „back-fill“-Lösung überschichtet, die das zu messende Ion enthält. Ideale Flüssigmembran-Ionophore sind für nur eine Ionensorte permeabel.

Das Potential, das sich über der Flüssigmembran einstellt, ist proportional zum Logarithmus der Aktivität ($\log a_i$) dieser Ionensorte in der Lösung und wird durch die Nernst-Gleichung (1) beschrieben (Ammann 1986):

$$E = E_0 + s * \log a_i \quad (1)$$

E: Potential der ionensensitiven Messzelle

E_0 : konstantes Standardpotential

a_i : Aktivität des Messions

s: Nernst'sche Steigung: $s = 2,303 * \frac{R * T}{z_i * F}$

R: allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T: absolute Temperatur

z_i : Ladung des Messions

F: Faradaykonstante (96487 Cmol^{-1})

Abweichend vom Idealfall weisen reale Flüssigmembran-Ionophore eine gewisse Sensitivität für Störionen auf (Interferenzen), daher treten bei geringen Messionenaktivitäten Abweichungen vom Nernst'schen Verhalten auf. Der Zusammenhang zwischen Ionenpotential, Messionen- und Störionenaktivität kann durch die Nicolsky-Eisenman-Gleichung (2) beschrieben werden (Ammann 1986, Eisenman 1962):

$$E = E_0 + s * \log \left(a_i + \sum_j k_{i,j}^{\text{pot}} \left(a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}} \right) \quad (2)$$

a_i, a_j : Aktivität des Messions, Aktivität der Störionen

z_i, z_j : Ladung des Messions, Ladung der Störionen

$k_{i,j}^{\text{pot}}$: potentiometrischer Selektivitätskoeffizient des Ionophors

Der potentiometrische Selektivitätskoeffizient des Ionophors $k_{i,j}^{\text{pot}}$ ist das Maß für die Bevorzugung des Messions gegenüber den Störionen. Das Detektionslimit eines Flüssigmembran-Ionophors ist definiert als die Messionenaktivität (a_i^0), bei der Messionen und Störionen gleichermaßen zum Potential E beitragen. Dies bedeutet:

$a_i^0 = k_{i,j}^{\text{pot}} * \left(a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}}$, und somit gilt:

$$E = E_0 + s * \log \left(a_i + a_i^0 \right) \quad (3)$$

a_i^0 : Detektionslimit des Flüssigmembran-Ionophors, ausgedrückt als Aktivität

Das Detektionslimit lässt sich graphisch aus dem Schnittpunkt der beiden Asymptoten der Eichkurve ermitteln (Abb. 4B). Das Standardpotential E_0 und die Nernst'sche Steigung s können bei der gesamten Eichung der ionensensitiven Glasmikroelektrode als konstant angesehen werden. Dasselbe gilt auch für den Aktivitätskoeffizienten γ_i des Messions, der Ionenkonzentration c_i und Ionenaktivität a_i verknüpft. ($a_i = \gamma_i * c_i$). In den Eichlösungen sollte γ_i zwischen der höchsten und niedrigsten Messionenkonzentration um weniger als

2 % variieren (siehe Kapitel 2.4.3). Deshalb kann Gleichung 3 näherungsweise durch Gleichung 4 ersetzt werden:

$$E = E_0 + s * \log\left(c_i + c_i^0\right) \quad (4)$$

c_i^0 : Detektionslimit des Flüssigmembran-Ionophors, ausgedrückt als Konzentration

Für die Auswertung der Experimente wurde aus den Eichkurven der einzelnen Mg^{2+} -sensitiven Mikroelektroden (Abb. 4B) jeweils die maximale Steigung als Nernst'sche Steigung s und der Störionenbeitrag (anhand des Messwertes für die nominell Mg^{2+} -freie Eichlösung) ermittelt. Mit Hilfe dieser beiden Größen wurde das Detektionslimit c_i^0 aus dem Schnittpunkt der Asymptoten bestimmt. Die so erhaltenen Werte wurden zur Anpassung der Messpunkte mit der vereinfachten Nikolsky-Eisenman-Gleichung (Gleichung 4) verwendet. Dabei wurde das Standardpotential E_0 durch iterative Minimierung der Summe der quadratischen Abweichungen zwischen den gemessenen und den berechneten Eichsignalen ermittelt (Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß). Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Tabellen-Kalkulationsprogramms QuattroPro (Borland) durchgeführt.

2.4.2 Herstellung Mg^{2+} -sensitiver Zweikanal-Glasmikroelektroden

Wegen ihres geringen Spitzendurchmessers wurden ausschließlich Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs verwendet, wobei der eine Kanal sensitiv für Mg^{2+} -Ionen war und der andere als Referenzkanal zur Messung von E_m diente.

Zur Herstellung dieser Glasmikroelektroden wurden Theta-Glaskapillaren auf eine Länge von 7,5 cm halbiert und mit einem Vertikal-Elektrodenziehgerät (Narishige PE-2) ausgezogen. Um in der Elektrodenspitze einen engen Kontakt der stark hydrophoben Flüssigmembran mit der Elektrodenwandung zu gewährleisten, wurden die Glaskapillaren unter Anwendung der Dampfmethode mit Hexamethyldisilazan (HMDS, Serva) silanisiert (Berridge & Schlue 1978). Hierzu wurden die Glaskapillaren in die Bohrungen eines Silanisierungshalters (Eigenbau der Zentralwerkstatt der Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) gesteckt und für 90 min über die Öffnung eines Weithalskolbens gestellt,

der etwa 20 ml HMDS enthielt und zuvor für etwa 20 min auf eine 45 °C warme Heizplatte gestellt worden war, um eine Silan-gesättigte Atmosphäre zu schaffen. Der spätere Referenzkanal wurde über eine in den Silanisierungshalter eingebaute Kanüle mit Druckluft (1,5 bar) durchströmt, um hier den Kontakt mit dem Silan zu verhindern. Anschließend wurden die Glaskapillaren für zwei Stunden bei 200 °C im Ofen erhitzt, wobei das HMDS mit den Hydroxyl-Gruppen des Glases reagiert. Trimethylsilanreste verblieben an den Hydroxyl-Gruppen und die Glasoberfläche hydrophob wurde (Ammann 1986). Die silanierten Glaskapillaren konnten mehrere Tage im Exsikkator über Kieselgel ohne Beeinträchtigung der Verwendungsfähigkeit aufbewahrt werden.

Das Einfüllen des Mg^{2+} -Sensors (unter Stickstoff gelagerter Mg^{2+} -Ionophor II-Cocktail A, ETH 5214, Fluka) in den silanierten Kanal erfolgte mit Hilfe eines ausgezogenen Kunststoffschlauches, der mit etwas Sensor gefüllt in die hintere Öffnung der Kapillare eingeführt wurde. Durch Kapillarkräfte wurde der Sensor bis zur Elektrodenspitze vorgezogen. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs und zur Beseitigung von Luftblasen wurden die Glasmikroelektroden in einem Exsikkator einem Unterdruck ausgesetzt. Anschließend wurde der Sensor mit Stickstoff-begaster 100 mM $MgCl_2$ -Lösung überschichtet und der Referenzkanal mit 3 M KCl gefüllt. Beide Kanäle wurden mit einem chlorierten Silberdraht versehen und mit Hartklebewachs verschlossen (Deiberit 502, Ludwig Böhme K.-G). Es wurde stets darauf geachtet, dass die Glaswände oberhalb der Elektrolyt-Lösungen weitgehend trocken blieben und der Hartwachs-Verschluss dicht war, um einen Kurzschluss der Elektrodenkanäle zu vermeiden.

2.4.3 Eichung der Mg^{2+} -sensitiven Mikroelektroden

Der Ionenhintergrund aller Eichlösungen entsprach intrazellulären Verhältnissen. Berechnungen nach dem Debye-Hückel Formalismus (Ammann 1986) ergaben, dass sich die Aktivitätskoeffizienten für Mg^{2+} zwischen der höchsten und der niedrigsten Messionenkonzentration in den verwendeten Eichlösungen um weniger als 2 % ändern. Daher konnte Gleichung 4 (Kapitel 2.4.1) angewandt werden, obwohl die Gesamtionenstärke in den verschiedenen Eichlösungen nicht exakt gleich war.

Jede Eichlösung enthielt 25 mM NaCl, 120 mM KCl, 10 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) und zusätzlich entweder 10, 2,5, 0,5 oder 0 mM Mg^{2+} . Die 0 mM Mg^{2+} -Lösung war nominell Mg^{2+} -frei; ihr Mg^{2+} -Gehalt betrug maximal 10^{-5} M (pers. Mitteil. F. Wolf, Universität Rom, Italien). Zum Ansetzen der Eichlösungen wurde eine 1 M $MgCl_2$ Stammlösung der Firma Fluka verwendet. Der pH-Wert aller Lösungen wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt.

Die Glasmikroelektroden wurden den unterschiedlichen Eichlösungen bis zur Einstellung eines konstanten Potentials ausgesetzt. Die Geschwindigkeit, mit der sich das Potential einstellte, war hierbei nicht von der Reaktionszeit der Glasmikroelektrode abhängig, die bei etwa 0,6 s liegt, sondern von der Perfusionsgeschwindigkeit in der Eichkammer (Günzel & Galler 1991). Die gemessenen Potentialwerte wurden mit Hilfe der umgeformten Nicolsky-Eisenman-Gleichung (Gleichung 4, Kapitel 2.4.1) angepasst und ausgewertet. Die Glasmikroelektroden wurden nur dann verwendet, wenn die Steigung im linearen Messbereich mindestens 90 % der Nernst'schen Steigung betrug und das Detektionslimit kleiner als die zu erwartende Messkonzentration ($< 0,4$ mM) war. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, musste die Spitze der Glasmikroelektroden mit einem Schleifmittel-Strahl angeschliffen werden (in Wasser suspendiertes Aluminiumoxid, Micropolish, Buehler). Der Widerstand der Glasmikroelektroden sank dabei um ca. 30-40 G Ω auf Werte von 70-80 G Ω .

2.4.4 Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung zur Eichung der Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Der Mg^{2+} -sensitive Elektrodenkanal wurde mit dem hochohmigen Eingang A ($R_{in} \geq 10^{15} \Omega$) des Zweikanal-Verstärkers (WPI, Model Duo 773) verbunden, während der Referenzkanal an den niederohmigen Eingang B ($R_{in} = 10^{11} \Omega$), angeschlossen wurde. Da der Mg^{2+} -sensitive Elektrodenkanal die Summe aus E_m und Ionenpotential misst, wurde mittels eines integrierten Differenzverstärkers das Ausgangssignal des Kanals B (Referenzkanal) vom Ausgangssignal des Kanals A (Mg^{2+} -sensitiver Kanal) subtrahiert und so das Ionenpotential ermittelt.

2.5 Vorversuche zur Anwendung ionensensitiver Glasmikroelektroden

In der Vergangenheit gab es eine Vielzahl von Untersuchungen, in denen ionensensitive Glasmikroelektroden an neuronalen Geweben von Vertebraten eingesetzt wurden. Allerdings handelte es sich hierbei immer um Untersuchungen des extrazellulären Milieus, wobei die Spitzen der Glasmikroelektroden meist einen Durchmesser von 2-3 μm aufwiesen (Lux & Neher 1973, Heinemann et al. 1977, Gloveli et al. 1995, Leschinger 1994). Intrazelluläre Bestimmungen von Ionenkonzentrationen mit Hilfe ionensensitiver Glasmikroelektroden wurden bisher nur in nicht-neuronalen Zellen von Vertebraten vorgenommen (Übersicht bei: McGuigan et al. 1991, Seki et al. 1993, Mooren et al. 2001). Die intrazelluläre Verwendung in neuronalen Vertebraten-Zellen wäre methodisch völlig neu gewesen und hätte gegenüber der mikrofluorimetrischen Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Fluoreszenzfarbstoffen vor allem den Vorteil gehabt, neben der intrazellulären Ionenkonzentration gleichzeitig E_m bestimmen zu können. Die Zellkörper von CA1-Pyramidenzellen sind mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 30 μm in der Längsachse und etwa 20 μm in der Querachse sehr klein (Tanaka et al. 1999). Die Größe dieser Zellen liegt im Grenzbereich der Anwendbarkeit von ionensensitiven Glasmikroelektroden.

2.5.1 Elektrolytgefüllte Theta-Glasmikroelektroden

Zunächst wurde geprüft, ob es überhaupt möglich ist, Zweikanal-Glasmikroelektroden in CA1-Pyramidenzellen einzustechen. Dazu wurden nicht silanisierte Theta-Glasmikroelektroden direkt nach dem Ausziehen in beiden Kanälen mit 2 M KAc bzw. mit 2 M KCl befüllt. Beide Kanäle wurden mit einem chlorierten Silberdraht versehen und mit den beiden Eingängen eines Zweikanalverstärkers verbunden. Der Versuch, ohne Verwendung der Einstichhilfe nur durch Absenken der Theta-Glasmikroelektrode mit Hilfe des mechanischen Mikromanipulators in die Zellen einzustechen, schlug fehl. Das Eindringen der Elektrodenspitze in die Zelle war nicht sprunghaft, sondern gelang nur durch mehrfaches, vorsichtiges Anheben und Absenken der Glasmikroelektrode über den Feintrieb des Mikromanipulators. Die gemessenen E_m -Werte von nur -40 mV , ebenso wie die hochfrequent auftretenden Aktionspotentiale mit sehr geringen Amplituden von etwa 10 mV, wiesen auf einen schlechten physiologischen Zustand der Zellen hin. Zudem war schon nach einer Dauer von ca. 30 min kein E_m mehr messbar.

In den Experimenten zeigte sich, dass der Einstich unter Verwendung der Einstichhilfe (Kapitel 2.3.2) mit nur minimaler Verletzung der Zellen durchgeführt werden konnte. Das mittlere E_m betrug $-71,5 \pm 5,4$ mV ($n = 4$) und lag damit in der gleichen Größenordnung wie das mittlere E_m , das später mit Einzelkanal-Glasmikroelektroden ermittelt wurde ($-68,4 \pm 11,2$ mV, $n = 183$, siehe auch Tabelle 2). In einer der 4 Messungen löste die Zelle spontan Aktionspotentiale aus, die eine Amplitude von etwa 80 mV aufwiesen und mit einer Frequenz von etwa 0,1 Hz auftraten. Unabhängig von der Elektrodenfüllung (2 M KCl oder 2 M KAc) konnte auf beiden Elektrodenkanälen dasselbe Signal abgeleitet werden. Offenbar befanden sich die Spitzen beider Elektrodenkanäle nach dem Einstich in der Zelle und auch die Elektrodenfüllung beeinflusste das gemessene Signal nicht.

Bei allen Experimenten, die später zur Messung des E_m mit konventionellen Einzelkanal-Glasmikroelektroden durchgeführt wurden, wurde die Einstichhilfe verwendet (Kapitel 2.3.2).

2.5.2 Mg^{2+} -sensitive Theta-Glasmikroelektroden

Da ein Einstechen der Glasmikroelektroden ohne Einstichhilfe aufgrund der starken Zellschädigung nicht zweckmäßig erschien, musste im Hinblick auf die Experimente mit ionensensitiven Glasmikroelektroden zunächst geprüft werden, ob die Einstichhilfe möglicherweise zu einer Schädigung des Mg^{2+} -Sensors führt. Hierzu wurden geschliffene, Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden nach der Eichung drei bis fünf mal für die Dauer von jeweils zwei Sekunden dem elektrischen Signal der Einstichhilfe ausgesetzt und danach erneut geeicht. Das Signal wurde auf den mit 3 M KCl gefüllten Referenzkanal gelegt, um den Sensor kanal so wenig wie möglich zu belasten. Aus dem Registrierbeispiel und den Eichkurven in Abb. 4 wird ersichtlich, dass die Einstichhilfe keinen negativen Effekt auf Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektrode ausübte. In insgesamt drei durchgeführten Experimenten mit verschiedenen Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden kam es nie zu einer Verschlechterung der Mg^{2+} -Empfindlichkeit. Allerdings verursachte das Signal der Einstichhilfe auf dem hochohmigen Eingang des Messverstärkers Spannungsspitzen mit Amplituden bis zu einigen 100 mV. Dadurch dauerte es z.T. bis zu einer Stunde bis sich an diesem Kanal wieder ein konstanter Potentialwert einstellte.

In früheren Arbeiten wurden Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden ausschließlich bei Raumtemperatur verwendet ($\sim 20^\circ C$; Blatter 1990, Günzel & Schlue 1994, 2000, McGuigan 1991, Müller 2000, Schulte 1997), während sie in dieser Arbeit bei einer Temperatur von $34,5^\circ C$ eingesetzt werden sollten. Um zu überprüfen, inwieweit die Temperatur einen Einfluss auf die Elektrodenqualität hat, wurde eine Glasmikroelektrode zunächst bei Raumtemperatur und anschließend bei $34,5^\circ C$ geeicht. Die erhöhte Temperatur beeinflusste die Qualität des Mg^{2+} -Sensors kaum. Die Eichungen ergaben bei $34,5^\circ C$ ein Detektionslimit von $0,20\text{ mM}$ und bei Raumtemperatur $0,21\text{ mM}$. Die Nernst'sche Steigung war bei $34,5^\circ C$ größer ($-30,9\text{ mV/Dekade}$) als bei Raumtemperatur ($-27,8\text{ mV/Dekade}$). Die Erhöhung der Nernst'schen Steigung fiel mit $-3,7\text{ mV/Dekade}$ größer aus als erwartet ($-1,4\text{ mM/Dekade}$), aber die Steigung lag mit $-30,9\text{ mV/Dekade}$ durchaus im Toleranzbereich für Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden (Abb. 4).

Im nächsten Schritt wurde versucht, angeschliffene Mg^{2+} -sensitive Theta-Glasmikroelektroden mit Hilfe der Einstichhilfe in die Zellen einzustechen. Der Referenzkanal wurde zur Kontrolle des Elektrodeneinstichs genutzt, da das Signal des Mg^{2+} -sensitiven Kanals nach Verwendung der Einstichhilfe außerhalb des Messbereichs lag. Es war nicht möglich, solche Glasmikroelektroden in die Zellen einzustechen, obwohl durch den Schleifprozess theoretisch eine Verbesserung der Einsticheigenschaften zu erwarten wäre (Ammann 1986, Brown & Flaming 1986). Die Ursache mag in der verwendeten Schleifmethode liegen: Während Ammann (1986) und Brown & Flaming (1986) Aluminiumoxid-beschichtete Schleifscheiben benutzten, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem Strahl aus in Wasser suspendiertem Aluminiumoxid geschliffen. Obwohl die Formveränderung des Spitzenquerschnitts zum Einstich nicht optimal war, konnte in Übereinstimmung mit Ammann (1986) und Brown und Flaming (1986) eine Reduktion des Elektrodenwiderstandes sowie eine Verbesserung der Nernst'schen Steigung und des Detektionslimits beobachtet werden (Ammann 1986), was vermutlich auf einer Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Sensor und Messflüssigkeit zurückzuführen ist (Spichiger & Fakler 1997).

In weiteren Experimenten wurden ungeschliffene Mg^{2+} -sensitive Theta-Glasmikroelektroden benutzt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Elektrodenspitzen zwar in die Zellen eingestochen werden konnten, jedoch musste die Einstichhilfe weit häufiger verwendet werden als in den beschriebenen Voruntersuchungen. Die zuvor geprüfte 3-5-malige An-

wendung genügte nie, um eine lebende Zelle mit einem E_m beim Einstich von mindestens -50 mV aufzufinden. Da der Einstich „blind“ erfolgte, musste die Einstichhilfe oft bis zu zwanzig mal verwendet werden, bis eine geeignete Zelle gefunden war. Nach dieser intensiven Benutzung der Einstichhilfe in Kombination mit der mechanischen Beanspruchung des Sensors im Spitzenbereich beim Durchdringen der Zellmembran war jedoch der Sensor stark geschädigt. Entweder kehrte das Signal des Sensorkanals, nicht in den Messbereich zurück, so dass der Messverstärker nicht mehr abgleichbar war oder aber der Widerstand des sensitiven Kanals war auf Werte $\ll 1 \text{ G}\Omega$ abgesunken. In beiden Fällen war keine Eichung des Mg^{2+} -sensitiven Kanals mehr möglich. Alle Glasmikroelektroden wurden nach den Einstichversuchen im Lichtmikroskop (Olympus) bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Glasmikroelektroden, deren Widerstand auf dem sensitiven Kanal stark abgesunken war, wiesen in der Elektrodenspitze keinen Sensor mehr auf. Um die Haftung des Sensors in der Elektrodenspitze zu verbessern, wurde die Silanisierungszeit verlängert, jedoch konnte diese Maßnahme das Auslaufen des Sensors bei wiederholter Verwendung der Einstichhilfe nicht verhindern.

Die Methode Mg^{2+} -sensitiver Glasmikroelektroden war für die intrazelluläre Anwendung in CA1-Pyramidenzellen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ungeeignet, da kein geeigneter Kompromiss zwischen den sehr kleinen Durchmessern der Zellkörper der CA1-Pyramidenzellen und den relativ großen Spitzendurchmessern von Mg^{2+} -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden gefunden werden konnte.

2.6 Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen

2.6.1 Theoretische Grundlagen am Beispiel von Mag-Fura-2

Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft kurzwelliges (energiereiches) Licht zu absorbieren und als langwelliges (energiearmes) Licht wieder zu emittieren. Zur Messung von Ionenkonzentrationen werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren Fluoreszenzeigenschaften durch die selektive Bindung einer bestimmten Ionensorte verändert werden. Dabei kann die Bindung des Ions zu einer Änderung der Quantenausbeute bei konstanten spektralen Eigenschaften, aber auch zu einer Änderung im Extinktions- und/oder Emissionsspektrum führen.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen zur Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen (Haugland 1999, Tsien 1989). In dieser Arbeit wurde hauptsächlich der Mg^{2+} -Indikator Mag-Fura-2 (Molecular Probes) verwendet, dessen Extinktionsspektrum durch die Bindung von Mg^{2+} in den kurzwelligen Bereich verschoben wird, während das Emissionsspektrum nahezu konstant bleibt. Die Mg^{2+} -freie Form des Farbstoffs absorbiert maximal bei 369 nm, die Mg^{2+} -gesättigte Form bei 330 nm (Raju et al. 1989). Das Gleichgewicht zwischen beiden Formen lässt sich mit optischen Methoden ermitteln und ermöglicht die Bestimmung der freien Mg^{2+} -Konzentration ($[Mg^{2+}]$).

Grundsätzlich ist es möglich, Mag-Fura-2 mit nur einer Wellenlänge anzuregen und durch Messung der Fluoreszenzemission Rückschlüsse auf $[Mg^{2+}]$ zu ziehen. Dieses Verfahren ist jedoch mit einer Reihe von Schwierigkeiten behaftet. So hängt die Fluoreszenzemission von der Farbstoffkonzentration in der Zelle sowie von apparativen Gegebenheiten, wie z.B. der Intensität des Anregungslichtes ab, so dass am Ende jeder Messung eine Eichung durch Einstellung definierter $[Mg^{2+}]$ erforderlich wäre. Dies setzt voraus, dass Farbstoffkonzentration und apparative Parameter während der Messung konstant bleiben. Zelluläre Transportmechanismen oder Ausbleichung erniedrigen jedoch in der Regel die Farbstoffkonzentration und führen neben Schwankungen der apparativen Parameter zu Fehlern bei der Eichung (Cobbald & Rink 1987, Gryniewicz et al. 1985).

Der Farbstoffindikator Mag-Fura-2 ermöglicht die Anwendung der Ratio-Methode (Gryniewicz et al. 1985, Raju et al. 1989), bei der $[Mg^{2+}]$ unabhängig von den absoluten apparativen Parametern und der Farbstoffkonzentration ermittelt werden kann. Hierzu wird der Farbstoff alternierend mit zwei Wellenlängen λ_1 und λ_2 angeregt und $[Mg^{2+}]$ aus dem Verhältnis der entsprechenden Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 bestimmt, die durch folgende Beziehungen gegeben sind:

$$F_1 = S_{b1} * c_b + S_{f1} * c_f \quad (5)$$

$$F_2 = S_{b2} * c_b + S_{f2} * c_f \quad (6)$$

Hierbei bezeichnen c_b und c_f die Konzentration des Mg^{2+} -gesättigten bzw. Mg^{2+} -freien Farbstoffs. Die Konstanten S_{b1} , S_{b2} , S_{f1} und S_{f2} sind durch die Intensität des Anregungslichtes, die Effizienz des Detektors sowie durch physikalische Farbstoffparameter (Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute) bestimmt. Die Konzentrationen c_b und c_f sind bei einer 1:1-Stöchiometrie, die bei Mag-Fura-2 gegeben ist (Raju et al. 1989), über die Dissoziationskonstante K_d mit $[Mg^{2+}]$ verknüpft:

$$c_b = \frac{c_f * [Mg^{2+}]}{K_d} \quad (7)$$

Für das Verhältnis („ratio“) $R = \frac{F_1}{F_2}$ ergibt sich nach Einsetzen von Gleichung 7 in die

Gleichungen 5 und 6 folgender Zusammenhang:

$$R = \frac{\left(S_{f1} + S_{b1} * \left[\frac{Mg^{2+}}{K_d} \right] \right)}{\left(S_{f2} + S_{b2} * \left[\frac{Mg^{2+}}{K_d} \right] \right)} \quad (8)$$

Die Auflösung von Gleichung 8 nach $[Mg^{2+}]$ ergibt:

$$\left[Mg^{2+} \right] = K_d * \left(\frac{R - (S_{f1}/S_{f2})}{(S_{b1}/S_{b2}) - R} \right) * \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (9)$$

Das Verhältnis S_{f1}/S_{f2} ist der minimale Wert für R, der bei völliger Abwesenheit von Mg^{2+} erreicht wird und deshalb mit R_{\min} bezeichnet wird. Analog stellt S_{b1}/S_{b2} den maximalen Wert R_{\max} dar, der sich bei Mg^{2+} -Sättigung des Farbstoffs ergibt:

$$\left[Mg^{2+} \right] = K_d * \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) * \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (10)$$

2.6.2 Messung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Mag-Fura-2

Zur Eichung wurden die Anregungsspektren von Mag-Fura-2 im Bereich der zu erwartenden Mg^{2+} -Konzentrationen bestimmt (Abb. 6A). Die Eichlösungen enthielten 100 μM Mag-Fura-2 in 125 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,0 und außerdem 5, 2,5, 1, 0,5 und 0 mM $MgCl_2$. Der nominell Mg^{2+} -freien Lösung wurden 10 mM Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) zugesetzt, um die freie Mg^{2+} -Konzentration weiter zu vermindern. Die Eichlösungen wurden im Wasserbad auf etwa 34°C erhitzt, in kleine Messkammern pipettiert (Schichtdicke 150 μm) und in derselben Apparatur vermessen, die auch zur Messung von $[Mg^{2+}]_i$ verwendet wurde. Zur Eichung wurde die Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm ausgewertet. R_{\min} wurde in Mg^{2+} -freier Lösung zu 0,44 bestimmt und der Quotient S_{f2}/S_{b2} zu 2,9. Für K_d wurde ein Wert von 1,5 mM verwendet, der unter Bedingungen gemessen wurde, die etwa den hier vorliegenden Versuchsbedingungen entsprachen (115 mM KCl, 20 mM NaCl, 37°C, pH 7,05; Raju et al. 1989). R_{\max} wurde durch Anpassung der Eichwerte mit Hilfe von Gleichung 10 ermittelt und betrug 2,02. In Abb. 6B ist der Zusammenhang zwischen R(Mag-Fura-2) und $[Mg^{2+}]_i$ dargestellt, der zur Auswertung der Messdaten verwendet wurde.

Vor der Umrechnung in $[Mg^{2+}]_i$ wurde von der Gesamtfluoreszenz die Autofluoreszenz des Präparates subtrahiert. Die Autofluoreszenz wurde am selben Präparat bei einer nicht-injizierten Zelle gemessen. Die Fluoreszenzintensität der mit Mag-Fura-2 beladenen Zellen war 10-50 mal höher als die Autofluoreszenz.

2.6.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Fura-2

Wie ionensensitive Glasmikroelektroden weisen auch Fluoreszenzfarbstoffe eine Interferenz mit Störionen auf. Physiologisch relevante Störionen bei der Messung von $[\text{Mg}^{2+}]_i$ mit Mag-Fura-2 sind hauptsächlich Ca^{2+} -Ionen (Konishi et al. 1991, Raju et al. 1989, Sabatini & Regehr 1998). Daher sollten die experimentellen Bedingungen so gewählt sein, dass $[\text{Ca}^{2+}]_i$ möglichst konstant bzw. zumindest unterhalb von $1 \mu\text{M}$ bleibt (Hofer & Machen 1993, Konishi et al. 1991, Neher & Zucker 1993, Odgen et al. 1995, Raju et al. 1989). Um die Einhaltung dieser Bedingungen sicherzustellen, wurden Kontrollmessungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 (Molecular Probes) durchgeführt.

Die Bindung von Ca^{2+} verschiebt das Extinktionsspektrum von Fura-2 in den kurzwelligen Bereich, ähnlich wie die Bindung von Mg^{2+} an Mag-Fura-2 (siehe Abb. 7A). Entsprechend wurde die Fura-2-Fluoreszenz nach der Ratio-Methode ausgewertet. Auch hier erfolgte die Anregung mit Licht der Wellenlängen $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$.

Für die freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) ergibt sich analog zu Gleichung 10:

$$\left[\text{Ca}^{2+} \right] = K_d * \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) * \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (11)$$

Da eine Eichung von Fura-2 im Bereich der zu erwartenden Ca^{2+} -Konzentrationen (etwa 100 nM) aufwendig ist und unter den vorhandenen technischen Gegebenheiten kaum durchführbar, wurde die Eichkurve über die Bestimmung von R_{\min} und R_{\max} ermittelt. Die Eichlösungen enthielten $100 \mu\text{M}$ Fura-2 in 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7,4. Die Lösung mit der Ca^{2+} -gesättigten Form von Fura-2 enthielt zusätzlich 10 mM CaCl_2 , die Lösung mit der Ca^{2+} -freien Form 10 mM EGTA. Die Anregungsspektren der Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -gesättigten Form von Fura-2 im Bereich von 300 nm bis 450 nm sind in Abb. 7A wiedergegeben. Zur Eichung wurde die Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ ausgewertet. Für R_{\min} wurde ein Wert von $0,34$ bestimmt, für R_{\max} $6,56$ und für den Quotienten S_{f1}/S_{b2} $7,63$. Für K_d wurde ein Wert von 135 nM verwendet (Grynkiewicz et al. 1985). In Abb. 7B ist der Zusammenhang zwischen $R(\text{Fura-2})$ und $[\text{Ca}^{2+}]$ dargestellt, der zur Auswertung der Messdaten verwendet wurde.

2.6.4 Beladung der CA1-Pyramidenzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Wie viele andere Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen ist Mag-Fura-2 sowohl als Kaliumsalz als auch als Acetoxymethylester (Mag-Fura-2/AM) erhältlich (Kapitel 1). Wegen der relativ einfachen Beladungstechnik wurde die Anwendbarkeit von Mag-Fura-2 als Mg^{2+} -Indikator in Hirnschnittpräparaten des Ratten-Hippokampus zunächst mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM geprüft. Weil diese Methode der Farbstoffbeladung aus Gründen, die in Kapitel 3.3 genannt und in Kapitel 4.2 ausführlich diskutiert werden, nicht zur Untersuchung der $[Mg^{2+}]_i$ -Regulation geeignet war, wurde in allen weiteren Experimenten das Kaliumsalz des Farbstoffs verwendet, das iontophoretisch in die Zellen eingebracht werden musste.

Die Beladung der Zellen mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM erfolgte durch 40-minütige Inkubation der Hirnschnittpräparate in sauerstoffgesättigter ACSF, die zusätzlich 10 μM Mag-Fura-2/AM, vorgelöst in wasserfreiem DMSO (Dimethyl-Sulfoxid, Sigma; Endkonzentration 0,1 %), enthielt. Außerdem wurde der Lösung Pferdeserum (Gibco 16050, Endkonzentration 5 %) zugesetzt, um ein Ausfallen des Farbstoffs zu vermeiden. Anstelle des Pferdeserums wurde in einigen Experimenten Pluronic F-127 (Molecular Probes) verwendet, das nach Angaben des Herstellers die gleiche Wirkung haben soll, jedoch wurden mit Pferdeserum bessere Ergebnisse erzielt. Anschließend wurden die Präparate in sauerstoffgesättigte ACSF überführt und ca. 30 min gelagert. Diese Zeit sollte ausreichen, um den Farbstoff vollständig in die aktive Form zu überführen (Churchill & Louis 1999, Grubbs et al. 1991, Quamme & Dai 1990). Alle Schritte der Herstellung der Farbstofflösung und der Farbstoffbeladung erfolgten bei Dunkelheit, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden.

Zur iontophoretischen Injektion von Mag-Fura-2 bzw. Fura-2 wurden konventionelle Einzelkanal-Glasmikroelektroden verwendet, wie sie auch zur Ableitung des E_m eingesetzt wurden (Kapitel 2.3.2, Abb. 2C). Die Spitzen der Glasmikroelektroden wurden mit einer wässrigen Farbstofflösung gefüllt, die jeweils 100 mM Mag-Fura-2 oder Fura-2 enthielt. Dazu wurde eine fein ausgezogene, mit Farbstofflösung gefüllte Glaskapillare mit abgebrochener Spitze, von hinten an das Filament der Glasmikroelektrode geführt. Bei Berührung mit dem Filament bildete sich eine Flüssigkeitsbrücke, über die durch Kapillarkräfte

geringe Mengen der Farbstofflösung bis in die Spitze der Mikroelektrode gezogen wurden. Der elektrische Kontakt zwischen Farbstofflösung und dem Eingang des Messverstärkers wurde durch einen Silberdraht hergestellt. Die Mikroelektrode wurde rückseitig mit Hartklebewachs (Deiberit 502) verschlossen. Der elektrische Widerstand der Glasmikroelektroden betrug in ACSF etwa 300 M Ω und war damit deutlich höher als bei Füllung mit 2 M KAc.

Die Injektion des Farbstoffs erfolgte in derselben Versuchsanordnung, die zur Ableitung von E_m verwendet wurde (Kapitel 2.3.2, Abb. 2A). Der Einstich erfolgte ebenfalls „blind“ unter Verwendung der Einstichhilfe. Das Ruhe- E_m wurde direkt nach dem Einstich ermittelt. Die Injektion der Farbstoffe erfolgte durch Applikation eines hyperpolarisierenden Injektionsstromes von $-0,5$ nA für mindestens 20 min. Nach Abstellen des Injektionsstromes wurde erneut das Ruhe- E_m ermittelt. Betrug es weniger als -50 mV, wurde die Zelle verworfen. Nach der Farbstoffinjektion wurde das Hirnschnittpräparat in die Messkammer des Mikrofluorimeters überführt, in der es mit Hilfe eines gebogenen, mit Nylonfäden bespannten Titandrahtes fixiert und kontinuierlich mit sauerstoffgesättigter Versuchslösung überspült wurde.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem kommerziellen Mikrofluorimeter durchgeführt (Deltascan 4000; PTI, Photon Technology International). Das System bestand aus vier Hauptelementen: Lichtquelle mit Monochromator, Mikroskop, Photometer und einem Rechner zur Steuerung der Apparatur sowie zur Datenaufnahme und -speicherung (Abb. 5). Die Versuchswanne war auf dem Objektisch des Mikroskops montiert.

Das Licht zur Fluoreszenzanregung wurde von einer Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio, UXL-75XE; 75 Watt) geliefert, die von einem Netzgerät mit externer Zündeinrichtung versorgt wurde. Das Licht wurde mit Hilfe einer rotierenden Sektorenscheibe (Chopper) alternierend auf die Eintrittsspalten eines Paares von Monochromatoren (PTI Model 01-001) abgebildet. Der Lichtweg zu den Monochromatoren konnte durch einen mechanischen Verschluss (Shutter) unterbrochen werden. In den Monochromatoren wurde das Licht über ein reflektierendes Gitter (1200 Furchen/mm) in seine spektralen Anteile zerlegt. Das Gitter wurde durch Rechner-gesteuerte Schrittmotoren positioniert, so dass Licht definierter Wellenlänge an den Austrittsspalten austrat. Die Austrittswellenlänge konnte

gegebenenfalls manuell nachjustiert werden. Die spektrale Bandbreite des austretenden Lichtes betrug 4 nm. Zur Weiterleitung des Anregungslichtes auf das Präparat diente ein Quarzlichtleiter, welcher in den Epifluoreszenzeingang des Mikroskops mündete.

Bei dem Mikroskop (Diaphot-TMD, Nikon) handelte es sich um ein inverses System, d.h. das Objektiv befand sich unterhalb des Präparates. Das Anregungslicht wurde durch ein UV-durchlässiges Objektiv (Nikon, Fluor 40 Ph3DL, $V = 40 \times$, numerische Apertur = 0,85) zum Präparat geleitet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde über das Objektiv wieder gesammelt und vom Anregungslicht mittels eines Sperrfilters (Nikon, BA 510/540) getrennt. Das Sperrfilter absorbierte das Anregungslicht und ließ ausschließlich Licht im Wellenlängenbereich von 510-540 nm (grün-gelb) zum Photomultiplier passieren. Ein zweites UV-taugliches Objektiv (Nikon, Fluor 10 Ph2DL, $V = 10 \times$) wurde zur photographischen Dokumentation benutzt (Abb. 5).

Eine Beleuchtungseinrichtung oberhalb des Präparates, bestehend aus Halogenlampe und Kondensator (LWD, Nikon), ermöglichte die Betrachtung des Präparates im Durchlicht. In Kombination mit zwei Blau-Filtern mit UV-Durchlass (BG12 + BG3, Schott) diente diese Beleuchtungseinrichtung auch zur Fluoreszenzanregung bei der Justierung des Präparates und bei der photographischen Dokumentation. Mit Hilfe von Strahlenteilern konnte das Bild entweder dem Betrachter, dem Photometer oder der Kamera zugeführt werden.

Das Photometer enthielt außer dem Lichtdetektor optische Hilfsmittel zur Einstellung des Messfeldes. Form und Größe des Messfeldes waren durch vier verstellbare Blenden auf ein rechteckiges Feld mit Kantenlängen zwischen 10-20 μm festgelegt. Ein Kippspiegel gab alternativ den Weg auf den Lichtdetektor oder auf den Betrachtertubus frei. Als Lichtdetektor diente ein Sekundärelektronen-Vervielfacher kombiniert mit einer Zähl Elektronik (PMT 4000, PTI). Der Lichtfluss während der Messung musste unterhalb einer Grenze von $1,5 \cdot 10^6$ Photonen/s bleiben, da die Zähl Elektronik zeitlich dicht nacheinander eintreffende Photonen nicht mehr diskriminieren konnte. Die Verbindung zwischen Lichtdetektor und Rechner wurde über ein Interface hergestellt.

Als Rechner diente ein Personal Computer (CEMOS, Prozessor: 80486, Intel) mit einem kommerziellen Datenaufnahme- und Verarbeitungsprogramm (PTI). Das Programm besaß

Optionen zur Datenaufnahme, zur rechnerischen und graphischen Bearbeitung der Rohdaten sowie zur Steuerung von Chopper, Shutter und Monochromatoren. Darüber hinaus bestand die Möglichkeit, die Daten so zu konvertieren, dass sie in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 eingelesen werden konnten.

Die Versuchswanne bestand aus einer Aussparung in einer 2,5 mm dicken Plexiglasplatte, welche von unten durch ein Deckglas (Dicke = 150 μm) verschlossen war. Die Wanne war auf dem Kreuztisch des Mikroskops befestigt. Die Versuchslösungen standen etwa 50 cm oberhalb der Versuchswanne, wo sie zur Sauerstoffsättigung mit Carbogen begast wurden. Von dort wurden sie über einen gasdichten Schlauch in die Versuchswanne geleitet. Der gleichmäßige Lösungsabfluss wurde durch einen Fließpapierstreifen vermittelt, über den die Flüssigkeit über einen großlumigen Schlauch in einen Auffangbehälter abgeleitet wurde. Die Flussrate des Systems betrug etwa 4 ml pro Minute. Das Hirnschnittpräparat wurde in Nähe der Einstromöffnung gebracht und der Flüssigkeitspegel in der Versuchswanne durch geeignetes Positionieren des Fließpapierstreifens möglichst niedrig gehalten. Auch in dieser Apparatur wurde die Temperatur der Versuchslösungen in der Versuchswanne auf 34,5 °C eingestellt, indem der Zuflussschlauch kurz vor der Versuchswanne durch ein thermostatisiertes Wasserbad geleitet wurde.

2.7 Auswertung der experimentellen Daten

Alle unter identischen Versuchsbedingungen erhaltenen Messdaten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (S.D.) angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen t-Test nach Student überprüft (Sachs 1992), wobei als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ festgelegt wurde.

Bei den mikrofluorimetrischen Messungen wurde R zunächst mit Hilfe von Gleichung 10 bzw. 11 in eine Ionenkonzentration ($[\text{Mg}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$) umgerechnet, bevor Mittelwerte bzw. Ein- und Ausstromraten bestimmt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Qualität der Hirnschnittpräparate

Die Qualität der synaptischen Verbindung zwischen der CA3- und der CA1-Region wurde untersucht, um sicherzustellen, dass die Hirnschnittpräparate über die Dauer der Experimente vital blieben. Dazu wurde die in Kapitel 2.3.1 beschriebene und in Abb. 2A dargestellte Versuchsanordnung verwendet. Die Schaffer-Kollaterale wurden in der CA3-Region mit Hilfe einer bipolaren Reizelektrode extrazellulär gereizt und die Reizantwort im Bereich der apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in der CA1-Region mit einer stumpfen, ACSF-gefüllten Glasmikroelektrode abgeleitet. Die Positionen von Reiz- und Ableit-elektrode sind in Abb. 8 schematisch dargestellt. Bei einer Reizdauer von 100 ms betragen die angelegten Reizspannungen in der Regel 3-12 V. In der CA1-Region war nach dem Reizartefakt zunächst ein Summenpotential der gereizten Fasern zu sehen, der sogenannte afferente Volley. Daran schloss sich das Feldpotential an, das auf der Summierung von Aktionspotentialen der CA1-Pyramidenzellen beruht. Zunächst wurde für jedes Hirnschnittpräparat durch Variation der Reizspannung die maximale Feldpotentialamplitude ermittelt. Um die Belastung des Hirnschnittpräparates möglichst gering zu halten, wurde dann die Reizspannung so lange verringert, bis die Feldpotentialamplitude etwa 50 % der maximalen Amplitude ($A_{50\%}$) betrug. $A_{50\%}$ lag zwischen 1,9 und 6,6 mV ($\bar{\Delta} = 3,6 \pm 1,6$ mV, $n = 18$) und blieb über Stunden konstant. Die maximale Veränderung von $A_{50\%}$ wurde jeweils ca. 4 ms nach Anlegen der Reizspannung erreicht.

Bei dem in Abb. 8 gezeigten Experiment betrug die angelegte Reizspannung jeweils 6 V. Die Herstellung des Hirnschnittpräparates lag zum Zeitpunkt der ersten Feldpotentialableitung bereits 2 Stunden zurück (gelbe Spur). Das Hirnschnittpräparat wurde in der Versuchswanne belassen und mit sauerstoffgesättigter ACSF überspült. Jeweils 3, 4, 5 und 6 Stunden nach der Herstellung des Hirnschnittpräparates (dunkler werdende Linien) wurde wiederum stimuliert und das resultierende Feldpotential abgeleitet. Es zeigte sich, dass Form und Amplitude des Feldpotentials weitgehend konstant blieben. Auch 9 Stunden nach der Präparation (hellgrüne Linie) war das Feldpotential bei gleichbleibender Reizspannung nahezu unverändert.

3.2 Vorversuche zur Verwendung von Mag-Fura-2

Mg²⁺-sensitive Glasmikroelektroden waren zur Messung von [Mg²⁺]_i in CA1-Pyramidenzellen in Hirnschnittpräparaten des Ratten-Hippokampus ungeeignet. Stattdessen wurde [Mg²⁺]_i mit Hilfe des Mg²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Mag-Fura-2 bestimmt. Die Beladung der Zellen mit dem Farbstoff erfolgte dabei iontophoretisch mit Hilfe von konventionellen Glasmikroelektroden. Hierfür wurden Glasmikroelektroden benötigt, deren Spitzendurchmesser einerseits ausreichend klein war, um die Zellmembran ohne Schädigung zu durchstoßen, andererseits aber groß genug war, um einen ungehinderten Ausstrom des Farbstoffes in die Zelle zu gewährleisten.

3.2.1 Herstellung von Injektionselektroden mit Hilfe von Vertikal-Elektrodenziehgeräten

Verschiedene Glaskapillaren unterschiedlichen Durchmessers (1, 1,2 und 1,5 mm) mit Innenfilament der Firma Clark Electromedical Instruments wurden an unterschiedlichen Vertikal-Elektrodenziehgeräten (Narishige PE-2 oder David Kopf Instruments Modell 700 C) zu konventionellen Glasmikroelektroden ausgezogen. Dabei wurden die Ziehparameter systematisch variiert (Heater: Hitze der Glühwendel, die die Viskosität der Glaskapillaren erniedrigt; Magnet: Kraft, mit der die Glaskapillaren ausgezogen werden). Die Glasmikroelektroden wurden zur Widerstandsmessung bzw. Testinjektion in einzelne CA1-Pyramidenzellen mit 100 mM KCl gefüllt, weil der Widerstand dieser Lösung am ehesten dem Widerstand der wässrigen Farbstofflösung entsprach. Bei Einstichversuchen wurde immer die Einstichhilfe verwendet, dennoch war bei allen verwendeten Elektrodentypen der Einstich in die Zellen von schlechter Qualität. Die E_m-Werte lagen oft nur zwischen -30 und -35 mV und auch eine Strominjektion von -0,5 nA über 20-30 min führte zu keiner Verbesserung des E_m. Häufig war schon 5 min nach Beendigung der Injektion kein E_m mehr messbar.

Mit dem Narishige Vertikal-Elektrodenziehgerät ausgezogene Theta-Glasmikroelektroden ließen sich gut in die Zellen einstechen (vergl. Kapitel 2.5.1). Bei Füllung mit 100 mM KCl konnten Ströme von bis zu -20 nA in die Zellen injiziert werden, jedoch überlebten die Zellen diese hohen Injektionsströme nicht. Waren die Theta-Glasmikroelektroden mit 100 mM wässriger Mag-Fura-2-Lösung gefüllt, verstopften sie bei einem Injektionsstrom

von $-0,5$ nA schon nach 1-2 min Injektionszeit, so dass der Messverstärker übersteuert wurde. Die injizierten Zellen waren unter der Sichtkontrolle im Mikrofluorimeter nur schwer zu erkennen, und Kontrollmessungen ergaben, dass die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes lediglich doppelt so groß war wie die Autofluoreszenz. Zur Messung von $[Mg^{2+}]_i$ wäre jedoch eine Fluoreszenzintensität nötig gewesen, die mindestens der 10-fachen Autofluoreszenz entspricht.

3.2.2 Herstellung von Injektionselektroden mit Hilfe von Horizontal-Elektrodenziehgeräten

Die Probleme bei der Herstellung der Injektionselektroden konnten durch die Beschaffung eines hochwertigen Horizontal-Elektrodenziehgerätes der Firma Sutter Instrument Co., Flaming/Brown Micropipette Puller, Modell P 97 gelöst werden. Mit diesem Gerät konnten bei hoher Reproduzierbarkeit Glasmikroelektroden guter Qualität hergestellt werden, die alle notwendigen Kriterien erfüllten. Mit einer wässrigen 100 mM Mag-Fura-2-Lösung gefüllt, betrug ihr Widerstand 250-300 M Ω . Bei Füllung mit 2 M KAc lag der Widerstand zwischen 120 und 150 M Ω . Diese Elektroden waren sowohl zur Farbstoffinjektion als auch zur Langzeitmessung des E_m geeignet.

3.2.3 Mikromanipulatoren

Verschiedene Mikromanipulatoren wurden zum Einstich der Glasmikroelektroden in die CA1-Pyramidenzellen ausprobiert, u.a. ein mechanischer Mikromanipulator (Leitz), ein Piezostepper (März) und ein hydraulischer Mikromanipulator (David Kopf Instruments). Die Mikromanipulatoren beeinflussten das Einstichergebnis nur wenig. Der hydraulische Mikromanipulator, der schließlich für alle weiteren Experimente genutzt wurde, ermöglichte die beste Einstellung der Elektrodenposition, weil er stufenlos regulierbar war. Dadurch konnten Nachkorrekturen der Elektrodenposition ohne schnelle und ruckartige Bewegungen vorgenommen werden. Außerdem konnte die Bedieneinheit außerhalb des Faradaykäfigs angebracht werden.

3.3 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Messungen nach Beladung der Zellen mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM

Die generelle Anwendbarkeit von Mag-Fura-2 zur Messung von $[\text{Mg}^{2+}]_i$ an Hirnschnittpräparaten des Ratten-Hippokampus wurde unter den gegebenen technischen Voraussetzungen mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM überprüft. Die Verwendung von Mag-Fura-2/AM hat den Vorteil, dass die schwierige Injektionsprozedur zur Farbstoffbeladung der Zellen entfällt und durch Inkubation der Hirnschnittpräparate in farbstoffhaltiger, begaster ACSF ersetzt wird.

Die Präparate wurden nach der Farbstoffbeladung in der Durchflusskammer des Mikrofluorimeters befestigt. Bei Bestrahlung mit UV-Licht war über das gesamte Hirnschnittpräparat die Emission von Fluoreszenzlicht zu sehen. Der Farbstoff war offensichtlich nicht nur in die Zellen eingedrungen, sondern auch durch intrazelluläre Esterasen in die Mg^{2+} -sensitive Form umgesetzt worden. Obwohl das Ergebnis der Farbstoffbeladung hervorragend war, wurde von diesem Verfahren Abstand genommen. Beispielsweise zeigte sich, dass eine 30-minütige Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM in Gegenwart von 50 mM Na^+ nur zu einem geringen Anstieg des Fluoreszenzsignals führte, der unzureichend war, um den Transport von Mg^{2+} aus der Zelle heraus studieren zu können.

3.4 Effekte der iontophoretischen Farbstoffinjektion auf die CA1-Pyramidenzellen

Das E_m der CA1-Pyramidenzellen betrug vor der Injektion von Mag-Fura-2 bzw. Fura-2 im Mittel $-50,4 \pm 8,0$ mV, nach der Injektion lag E_m bei $-65,3 \pm 9,6$ mV ($n = 83$). E_m war somit nach der iontophoretischen Farbstoffinjektion im Mittel um $14,9 \pm 9,8$ mV ($n = 83$) signifikant negativer als zuvor ($p \ll 0,01$, ungepaarter t-Test nach Student). Die Zellen zeigten direkt nach dem Einstich der Injektionselektrode spontan auftretende Aktionspotentiale kleiner Amplitude (≤ 20 mV), die meist innerhalb von ca. 5-10 s verschwanden. Sie wurden als Reaktion der Zelle auf den Elektrodeneinstich gedeutet (Verletzungsentladungen), zumal dieser Effekt auch bei den elektrophysiologischen Untersuchungen auftrat. In einzelnen Fällen dauerten die Aktionspotentiale an und waren auch nach Beendigung der Injektion noch zu beobachten. In diesen Fällen war nach der Injektion die

Frequenz erniedrigt und die Amplitude vergrößert (bis zu 80 mV), wie dies auch bei den elektrophysiologischen Experimenten zu beobachten war.

$[Mg^{2+}]_i$ bzw. $[Ca^{2+}]_i$ konnten nach der Farbstoffinjektion über einen Zeitraum von 0,5 Stunden bis zu 6 Stunden bestimmt werden; die durchschnittliche Dauer der Experimente betrug 134 ± 72 min ($n = 83$).

3.5 E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und $[Mg^{2+}]_i$ von CA1-Pyramidenzellen unter Ruhebedingungen

Jeweils zu Beginn der Experimente wurden E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und $[Mg^{2+}]_i$ unter physiologischen Bedingungen im Ruhezustand bestimmt ($T = 34,5$ °C, $[Na^+]_a = 150$ mM, $pH = 7,4$ und Carbogen-Begasung).

Das E_m der CA1-Pyramidenzellen betrug direkt nach dem Einstich nur $-51,3 \pm 7,6$ mV ($n = 38$). Um das Einheilen der Glasmikroelektrode zu erleichtern, wurde für die Dauer von 10-15 min ein Strom von $-0,5$ nA in die Zellen injiziert, und anschließend ergab sich für E_m ein Mittelwert von $-68,2 \pm 10,3$ mV ($n = 88$). Der Ruhewert von $[Ca^{2+}]_i$ lag bei 30 ± 17 nM ($n = 23$) und für $[Mg^{2+}]_i$ wurde ein Ruhewert von $0,35 \pm 0,18$ mM ($n = 95$) ermittelt (siehe auch Tabelle 2).

3.6 E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und $[Mg^{2+}]_i$ von CA1-Pyramidenzellen in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$

Die Hirnschnittpräparate wurden nach der Bestimmung von E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und $[Mg^{2+}]_i$ für 10-20 min mit Na^+ -reduzierten Versuchslösungen (110, 50 und 15 mM Na^+) überspült und E_m , $[Mg^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ wurden erneut ermittelt (Tabelle 2).

Tabelle 2 : E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und $[Mg^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$

$[Na^+]_a$ (mM)	E_m (mV)	$[Ca^{2+}]_i$ (nM)	$[Mg^{2+}]_i$ (mM)
150	$-68,2 \pm 10,3$ n = 88	30 ± 17 n = 23	$0,35 \pm 0,18$ n = 95
110	$-69,0 \pm 12,5$ n = 48	36 ± 19 n = 20	$0,39 \pm 0,21$ n = 73
50	$-66,2 \pm 11,1$ n = 36	44 ± 29 n = 9	$0,48 \pm 0,26^{**}$ n = 25
15	$-74,8 \pm 11,3$ n = 11	38 ± 22 n = 5	$0,56 \pm 0,28^{**}$ n = 5

E_m wurde mit konventionellen Einzelkanal-Glasmikroelektroden ermittelt, während $[Mg^{2+}]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ mikrofluorimetrisch mit Hilfe von Mag-Fura-2 bzw. Fura-2 bestimmt wurden. Mittelwerte \pm S.D. aus 5 - 95 Messungen. $[Na^+]_a = 150$ mM entspricht physiologischen Verhältnissen; die Messwerte bei den anderen $[Na^+]_a$ wurden 10 – 20 min nach $[Na^+]_a$ -Reduktion aufgenommen.

Die Mittelwerte für E_m bei verschiedenen $[Na^+]_a$ sind in Abb. 9 in einem Säulendiagramm dargestellt. E_m schwankte um einen Wert von ca. -70 mV (Tabelle 2, Abb. 9). Eine einfaktorische Varianzanalyse (Sachs 1992) ergab, dass die für E_m ermittelten Werte unabhängig von $[Na^+]_a$ und nicht signifikant verschieden waren ($p = 0,16$; ANOVA). Daher konnten die einzelnen Mittelwerte für E_m zu einem gesamten Mittelwert zusammengefasst werden, der $-68,4 \pm 11,2$ mV ($n = 183$) betrug.

Das Säulendiagramm in Abb. 10 zeigt die Mittelwerte für $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$. $[Ca^{2+}]_i$ lag immer im nanomolaren Bereich und damit immer weit unterhalb des für Mag-Fura-2 kritischen Wertes von $1 \mu\text{M}$ (siehe Kapitel 2.6.3). Die Mittelwerte für $[Ca^{2+}]_i$ schwankten zwischen 30 ± 17 nM und 44 ± 29 nM (Tabelle 2, Abb. 10). Die einfaktorische Varianzanalyse lieferte für p einen Wert von $0,28$ (ANOVA). Dies bedeutet, dass alle $[Ca^{2+}]_i$ -Werte nicht signifikant verschieden und somit von $[Na^+]_a$ unabhängig waren. Die Zusammenfassung aller Werte lieferte einen mittleren $[Ca^{2+}]_i$ -Wert von 35 ± 20 nM ($n = 57$).

Im Gegensatz zu $[Ca^{2+}]_i$ und E_m war $[Mg^{2+}]_i$ von $[Na^+]_a$ abhängig. Je kleiner $[Na^+]_a$ war, desto höher war der Wert für $[Mg^{2+}]_i$ (Abb. 11, Tabelle 2). Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab, dass die bei den unterschiedlichen $[Na^+]_a$ ermittelten Werte für $[Mg^{2+}]_i$ nicht aus der gleichen Grundgesamtheit stammen ($p = 0,009$, ANOVA). Ein ungepaarter t-Test nach Student (Sachs 1992) ergab, dass die Werte für $[Na^+]_a = 50$ mM ($p = 0,006$) und $[Na^+]_a = 15$ mM ($p = 0,0015$) hoch signifikant von den Werten in ACSF ($[Na^+]_a = 150$ mM) verschieden waren.

3.7 Beladung der CA1-Pyramidenzellen mit Mg^{2+}

Um den Auswärtstransport von Mg^{2+} zu untersuchen, wurden die CA1-Pyramidenzellen durch $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung von 1,3 auf 30 mM für 15-30 min mit Mg^{2+} beladen. $[Na^+]_a$ blieb unverändert und betrug während dieses Vorgangs entweder 110 oder 50 mM. In Abb. 12 sind zwei Registrierbeispiele für diesen Beladungsvorgang wiedergegeben. Die Bestimmung der Mg^{2+} -Einstromraten erfolgte mittels linearer Regression (unterbrochene rote Linien) als $\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ ($\mu M/min$). Während einer 15-30-minütigen Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ auf 30 mM war in Gegenwart von 110 mM $[Na^+]_a$ eine Erhöhung von $[Mg^{2+}]_i$ mit einer durchschnittlichen Rate von $73 \pm 101 \mu M/min$ ($n = 55$) zu beobachten, während $[Mg^{2+}]_i$ in Gegenwart von 50 mM $[Na^+]_a$ mit einer mittleren Rate von $67 \pm 74 \mu M/min$ ($n = 17$) anstieg. Die Mg^{2+} -Einstromraten waren bei den beiden $[Na^+]_a$ nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$, ungepaarter t-Test nach Student) und daher von $[Na^+]_a$ unabhängig. In etwa 30 % der Experimente erfolgte der $[Mg^{2+}]_i$ -Anstieg zweiphasig (vergl. Abb. 19 und Abb. 24). Die erste, langsamere Phase dauerte durchschnittlich $18,3 \pm 5,6$ min und $[Mg^{2+}]_i$ stieg mit einer mittleren Rate von $49 \pm 54 \mu M/min$ auf $0,92 \pm 0,67$ mM an ($n = 22$). In der zweiten, schnelleren Phase war die Rate mit $219 \pm 223 \mu M/min$ hoch signifikant größer ($p = 0,001$, gepaarter t-Test nach Student).

Die Ableitungen des E_m mit konventionellen Einzelkanal-Glasmikroelektroden unter identischen Versuchsbedingungen zeigten, dass gleichzeitig mit der $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung eine Membrandepolarisation auftrat (Abb. 13). Die Amplitude dieser Membrandepolarisation betrug in Gegenwart von 110 mM Na^+ im Mittel $7,1 \pm 3,6$ mV ($n = 24$) und in Gegenwart von 50 mM Na^+ im Mittel $6,7 \pm 3,8$ mV ($n = 21$). Ein ungepaarter t-Test nach Student ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Um auszuschließen, dass der mit Mag-Fura-2 gemessene $[Mg^{2+}]_i$ -Anstieg auf einer Interferenz von Ca^{2+} -Ionen mit Mag-Fura-2 beruhte, wurden Messungen von $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 nach dem gleichen Versuchsprotokoll wie die $[Mg^{2+}]_i$ - bzw. E_m -Messungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Effekt einer Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM auf $[Ca^{2+}]_i$ variabel war. In etwa 50 % aller Experimente reagierten die CA1-Pyramidenzellen sowohl in Gegenwart von 110 mM $[Na^+]_a$ als auch in Gegenwart von 50 mM $[Na^+]_a$ gar nicht, $[Ca^{2+}]_i$ blieb konstant (Abb. 14, grüne Messspuren). In 10 % der Experimente war eine geringfügige Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten (Abb. 14, rote Messspuren) und in 40 % eine Erniedrigung (Abb. 14, blaue Messspuren). Ein Vergleich der Daten durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigte, dass alle ermittelten Werte bzw. alle Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ nicht von $[Na^+]_a$ abhängig waren und aus der gleichen Grundgesamtheit stammten. Der höchste in insgesamt 33 Experimenten gemessene Wert für $[Ca^{2+}]_i$ war mit 111 nM um etwa den Faktor 10 kleiner als der für Mag-Fura-2 kritische Wert von 1 μ M.

3.8 Wirkung von Imipramin auf den Mg^{2+} -Einstrom

Alle bei Säugetierzellen nachgewiesenen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher, die hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Imipramin untersucht wurden, sind durch Imipramin hemmbar. Die Konzentration zur halbmaximalen Inhibition (IC_{50}) betrug beispielsweise bei menschlichen Erythrozyten 30 μ M (Féray & Garay 1988), bei Herzmuskelzellen 79 μ M (Tashiro & Konishi 2000) und bei Frettchenerythrozyten 0,5 mM (Flatman & Smith 1990).

Der Mg^{2+} -Einstrom wurde in Gegenwart von 0,5 mM Imipramin untersucht, um zu klären, ob ein im Umkehrmodus arbeitender Na^+/Mg^{2+} -Austauscher am Mg^{2+} -Einstrom in die CA1-Pyramidenzellen des Ratten-Hippokampus beteiligt ist. In den Experimenten wurde als Vorkontrolle zunächst durch 15-minütige Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM ein Mg^{2+} -Einstrom ausgelöst. Nachdem $[Mg^{2+}]_i$ wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt war, wurden die Zellen für 10 min einer Lösung ausgesetzt, die zusätzlich 0,5 mM Imipramin enthielt, und dann $[Mg^{2+}]_a$ in Gegenwart von Imipramin erneut für 15-20 min auf 30 mM erhöht. Imipramin zeigte keinen Effekt auf den Mg^{2+} -Einstrom, der durch Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ ausgelöst wurde. Nach Absenkung von $[Mg^{2+}]_a$ auf den Ausgangswert (1,3 mM) in Anwesenheit von Imipramin kehrte $[Mg^{2+}]_i$ jedoch nicht auf den Ruhe-

wert zurück, vielmehr stieg $[Mg^{2+}]_i$ unentwegt weiter bis die CA1-Pyramidenzellen schließlich starben (siehe auch Kapitel 3.12).

3.9 Wirkung von Co^{2+} und Ni^{2+} auf den Mg^{2+} -Einstrom

Co^{2+} und Ni^{2+} sind als Inhibitoren des Mg^{2+} -Einstroms bekannt (Flatman & Smith 1991, Günzel & Schlue 1997). Um zu untersuchen, ob diese Ionen auch bei CA1-Pyramidenzellen des Ratten-Hippokampus den Mg^{2+} -Einstrom blockieren, wurde als Vorkontrolle zunächst durch 20-minütige Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM ein Mg^{2+} -Einstrom ausgelöst (Kapitel 3.7, Abb. 12), dessen Rate als Bezugswert für den Mg^{2+} -Einstrom in Gegenwart von Co^{2+} oder Ni^{2+} diente. Nachdem $[Mg^{2+}]_i$ wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt war, wurden die Zellen für die Dauer von 5 min einer Lösung ausgesetzt, die zusätzlich 5 mM Co^{2+} oder Ni^{2+} enthielt. Bei konstanter Co^{2+} - bzw. Ni^{2+} -Konzentration wurde nun $[Mg^{2+}]_a$ erneut für 20 min erhöht. Während der nachfolgenden Reduktion von $[Mg^{2+}]_a$ auf 1,3 mM wurde die Co^{2+} - bzw. Ni^{2+} -Konzentration für weitere 5 min konstant gehalten.

Die Applikation von 5 mM Co^{2+} führte zu keiner zusätzlichen Veränderung des Fluoreszenzsignals von Mag-Fura-2, so dass $[Mg^{2+}]_i$ in Anwesenheit von Co^{2+} unbeeinflusst blieb (Abb. 15). Da Co^{2+} bei Bindung an Mag-Fura-2 das Fluoreszenzsignal löscht (Haugland 1999), ist anzunehmen, dass Co^{2+} nicht in die Zelle eindrang.

In Gegenwart von 5 mM Co^{2+} führte die $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung auf 30 mM zu keinem nennenswerten Anstieg von $[Mg^{2+}]_i$. Der Mg^{2+} -Einstrom war nahezu vollständig blockiert (Abb. 15). Die Ergebnisse sind in Abb. 16 in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Die Mg^{2+} -Einstromrate aus der Vorkontrolle wurde jeweils als Bezugswert für die in Gegenwart von 5 mM Co^{2+} gemessenen Mg^{2+} -Einstromraten verwendet. Der Mg^{2+} -Einstrom in Gegenwart von 5 mM Co^{2+} war auf $3,8 \pm 6,6 \%$ ($n = 3$) hoch signifikant reduziert ($p \ll 0,01$, Student's t-Test).

In Abb. 17 wird ein Registrierbeispiel zur Wirkung von Ni^{2+} auf den Mg^{2+} -Einstrom gezeigt. Während in der Vorkontrolle durch $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung auf 30 mM ein reversibler Anstieg von $[Mg^{2+}]_i$ zu beobachten war, zeigte die Messspur in Gegenwart von 5 mM Ni^{2+}

starkes Rauschen. Dieses Rauschen konnte weder durch Reduktion von $[Mg^{2+}]_a$ auf 1,3 mM noch durch Auswaschen von Ni^{2+} unterdrückt werden.

In Abb. 18 sind für den Zeitraum der Ni^{2+} - bzw. Co^{2+} -Applikation die intrazellulär registrierten Fluoreszenzsignale bei Anregung mit 340 nm (F_{340} , Mg^{2+} -beladene Form, Abb. 18A) und bei Anregung mit 380 nm (F_{380} , Mg^{2+} -freie Form, Abb. 18B) ohne Subtraktion der Autofluoreszenz gezeigt. Beide Signale fielen in Gegenwart von Ni^{2+} (grüne Spuren) auf den Wert der Autofluoreszenz. Vermutlich ist dieser Effekt auf eine Löschung der Mag-Fura-2-Fluoreszenz durch Ni^{2+} zurückzuführen. Demnach ist anzunehmen, dass Ni^{2+} in die Zelle eindrang. In Gegenwart von Co^{2+} (rote Spuren) war neben der normalen Drift durch Farbstoffverlust ebenfalls eine leichte Abnahme des F_{380} -Signals zu sehen (Abb. 18 B). Diese Abnahme war jedoch weniger drastisch und verlief langsamer als in Gegenwart von Ni^{2+} .

3.10 Abhängigkeit des Mg^{2+} -Auswärtstransportes von $[Na^+]_a$

In Abb. 19 ist ein typisches Registrierbeispiel eines Experimentes zur Untersuchung der $[Na^+]_a$ -Abhängigkeit des Mg^{2+} -Auswärtstransportes gezeigt. Nachdem die Zellen durch Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ auf 30 mM mit Mg^{2+} beladen worden waren, wurde $[Mg^{2+}]_a$ wieder auf 1,3 mM abgesenkt, ohne $[Na^+]_a$ zu verändern. Als Folge davon begann $[Mg^{2+}]_i$ in Richtung des Ausgangswertes abzusinken und es stellte sich eine maximale Mg^{2+} -Ausstromrate ein, die analog zur Mg^{2+} -Einstromrate über die Steigung des linearen Kurvenabschnitts als $\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ ($\mu M/min$) ermittelt wurde (unterbrochene grüne Linie). Nachdem in Gegenwart von 110 mM $[Na^+]_a$ die maximale Mg^{2+} -Ausstromrate erreicht war, wurde $[Na^+]_a$ vorübergehend für 5-10 min auf 194, 150, 50 und 15 mM verstellt und jeweils die Mg^{2+} -Ausstromrate bestimmt (unterbrochene rote Linie).

In Tabelle 3 und in Abb. 20 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst. Je geringer $[Na^+]_a$ war, um so geringer war auch die Mg^{2+} -Ausstromrate. Die Raten in Gegenwart von 50 mM $[Na^+]_a$ ($p = 0,004$) und 15 mM $[Na^+]_a$ ($p = 0,00004$) waren hoch signifikant verschieden von den Werten in ACSF (150 mM $[Na^+]_a$; Student's t-Test). Dieses Ergebnis sowie der Befund, dass der $[Mg^{2+}]_i$ -Ruhewert in der gleichen Weise von $[Na^+]_a$ abhängig war (Abb. 11), deutet auf einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher hin, wie schon bei ande-

ren Präparaten nachgewiesen (Flatman & Smith 1990, Günther et al. 1995, Günzel & Schlue 1996, Tashiro & Konishi 1997).

Tabelle 3 : Mg^{2+} -Austroraten in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$

$[Na^+]_a$ (mM)	194	150	110	50	15
$\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ ($\mu M/min$)	$-19,2 \pm 21,4$ ($-37,4 \pm 41,6$) n = 4	$-43,3 \pm 26,7$ n = 11	$-43,9 \pm 47,0$ n = 51	$-21,6 \pm 10,6$ n = 19	$2,3 \pm 16,0$ n = 13

Mittelwerte \pm S.D. aus 4 - 51 Messungen.

3.11 Einfluss der Osmolarität auf den Mg^{2+} - Auswärtstransport

Die Versuchslösung mit 194 mM Na^+ wurde durch Zugabe von 43 mM NaCl ohne osmotischen Ausgleich hergestellt. In dieser Lösung war die Mg^{2+} -Austrorrate langsamer als in ACSF, obwohl eher eine weitere Steigerung oder zumindest eine unveränderte Mg^{2+} -Austrorrate zu erwarten gewesen wäre.

Um zu prüfen, ob die erhöhte Osmolarität der Versuchslösung für den Effekt verantwortlich war, wurde die Mg^{2+} -Austrorrate in einer Lösung mit erhöhter Osmolarität bestimmt. Diese Lösung entsprach in ihrer Zusammensetzung ACSF, enthielt jedoch zusätzlich 86 mM D-Sorbitol (siehe auch Kapitel 2.2.1). Die Zellen wurden bei einer $[Na^+]_a$ von 50 mM durch 15-minütige $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung von 1,3 auf 30 mM mit Mg^{2+} beladen. Anschließend wurden die Zellen mit ACSF überspült bis sich eine maximale Mg^{2+} -Austrorrate einstellte. Danach wurde die 86 mM Sorbitol-Lösung für 20 min appliziert und schließlich wieder ACSF.

Das Registrierbeispiel in Abb. 21 zeigt, dass die Mg^{2+} -Austrorrate in Gegenwart von 86 mM Sorbitol verringert war. Das Säulendiagramm in Abb. 22 fasst die Experimente zusammen und zeigt, dass die mittlere Mg^{2+} -Austrorrate in Gegenwart von 86 mM Sorbitol signifikant auf $49\% \pm 20\%$ der Mg^{2+} -Austrorrate in ACSF verlangsamt war (n = 3, p = 0,048, Student's t-Test).

Wird der osmotische Effekt berücksichtigt, ergibt sich in Gegenwart von 194 mM Na⁺ eine Mg²⁺-Ausstromrate von -37,4 μM/min. Dies ist in Abb. 20 als hellgraue Säule mit gestrichelter Umrandung im Hintergrund dargestellt. Dieser korrigierte Wert unterscheidet sich nicht signifikant vom Mittelwert für die Mg²⁺-Ausstromrate in ACSF.

3.12 Imipramin-Sensitivität des Mg²⁺-Auswärtstransportes

Der Versuchsablauf zur Untersuchung der Imipramin-Wirkung entsprach demjenigen zur Untersuchung der [Na⁺]_a-Abhängigkeit des Mg²⁺-Auswärtstransports. Nachdem sich die maximale Mg²⁺-Ausstromrate eingestellt hatte, erfolgte die Applikation der Imipramin-haltigen Lösung (2, 1, 0,5, 0,25 und 0,1 mM Imipramin) für die Dauer von 5-10 min bei konstanter [Na⁺]_a von 110 mM. Nach der Imipramin-Applikation wurden die Präparate wieder mit 110 mM Na⁺ überspült bis [Mg²⁺]_i wieder den Ausgangswert erreichte.

Die Imipramin-Applikation bewirkte eine starke zellschädigende Wirkung, die sich entweder durch Membrandepolarisationen bis zum völligen Zusammenbruch des E_m oder durch irreversible Anstiege im Fura-2- und Mag-Fura-2-Signal zeigte, so dass eine Fortführung der Experimente teilweise unmöglich war.

In Abb. 23 sind alle mit Imipramin durchgeführten Messungen von E_m, [Ca²⁺]_i und [Mg²⁺]_i hinsichtlich der Überlebensrate der CA1-Pyramidenzellen zusammengefasst. Aus Abb. 23 geht hervor, dass die Überlebensrate der Zellen von der Imipramin-Konzentration abhängig war. Die CA1-Pyramidenzellen überlebten eine 10-minütige Applikation von 2 mM Imipramin nur in 1 von 18 Experimenten (entsprechend etwa 6 %) und eine Reduktion der Applikationszeit auf 5 min brachte keine Verbesserung. Die Überlebensrate bei Applikation von 1 mM Imipramin betrug 38 % und stieg bei Applikation von 0,5, 0,25 und 0,1 mM Imipramin auf 82 % an. Wenn die Zellen die Imipramin-Applikation überlebten und eine Auswertung möglich war, waren die Mg²⁺-Ausstromrate, [Ca²⁺]_i und die durch 30 mM Mg²⁺-Gabe induzierte Membrandepolarisation in Gegenwart von Imipramin unverändert. In Abb. 24 ist die einzige [Mg²⁺]_i-Messung zu sehen, bei der Imipramin in einer Konzentration von 2 mM appliziert werden konnte, ohne den Zelltod zu verursachen. In Gegenwart von Imipramin betrug die Mg²⁺-Ausstromrate 133 % der Rate in 110 mM Na⁺. Auch für alle übrigen verwendeten Imipramin-Konzentrationen ergab sich keine signifikante Veränderung der Mg²⁺-Ausstromrate (Tabelle 4).

Tabelle 4 : Wirkung von Imipramin auf die Mg^{2+} -Ausstromrate, $[Ca^{2+}]_i$ und die Amplitude der durch 30 mM Mg^{2+} induzierten Membrandepolarisation

[Imipramin] (mM)	$\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ (%)	$[Ca^{2+}]_i$-Änderung (nM)	E_m-Amplitude (mV)
2	133 n = 1	n.b.	n.b.
1	112 ± 76 n = 4	1 ± 3 n = 4	n.b.
0,5/0,25/1	107 ± 93 n = 4	n.b.	$6,7 \pm 3,1$ mV n = 5

Die Mg^{2+} -Ausstromraten in Gegenwart von Imipramin wurden auf die mittleren Mg^{2+} -Ausstromraten vor und nach der Imipramin-Applikation bezogen. n.b. = nicht bestimmt.

Die Kontrollmessungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt, allerdings wurde hier nur eine Imipramin-Konzentration von 1 mM verwendet. Abb. 25 zeigt ein typisches Registrierbeispiel einer $[Ca^{2+}]_i$ -Kontrollmessung. Das Registrierbeispiel sowie die Zusammenfassung der Experimente in Tabelle 4 verdeutlichen, dass Imipramin $[Ca^{2+}]_i$ nicht beeinflusste.

Die Zellsterblichkeit war in den Experimenten zur E_m -Bestimmung selbst bei 1 mM Imipramin so hoch, dass eine Auswertung unmöglich war. Die maximal verträgliche Imipramin-Konzentration betrug bei den E_m -Messungen 0,5 mM. Das Registrierbeispiel in Abb. 26 zeigt, dass die Applikation von 0,5 mM Imipramin E_m nicht beeinflusste und die durch 30 mM Mg^{2+} -Gabe induzierte Membrandepolarisation in Gegenwart von Imipramin unverändert war (vergl. auch Tabelle 4).

3.13 Versuche zur Bestimmung von $[Na^+]_i$ mit SBFI

Mit den Experimenten zur $[Na^+]_a$ -Abhängigkeit von $[Mg^{2+}]_i$ und der Mg^{2+} -Ausstromrate (Kapitel 3.6 und Kapitel 3.10) ergaben sich deutliche Hinweise auf das Vorkommen eines Na^+/Mg^{2+} -Austauschers in den CA1-Pyramidenzellen des Ratten-Hippokampus. Da wäh-

rend des Mg^{2+} -Auswärtstransportes Na^+ -Ionen in die Zelle hinein transportiert werden, sollte beim Absinken von $[Mg^{2+}]_i$ die freie, intrazelluläre Na^+ -Konzentration ($[Na^+]_i$) ansteigen. Die CA1-Pyramidenzellen sollten mit dem Na^+ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate; Minta & Tsien 1989) beladen werden, um diese Hypothese zu überprüfen.

SBFI wurde zunächst aus einer wässrigen Lösung (50 mM SBFI) iontophoretisch injiziert, jedoch nahm der Injektionsstrom bereits nach wenigen Sekunden ab und die Injektions-
elektrode verstopfte. In der Elektrodenspitze bildete sich unabhängig von der Größe des Injektionsstroms ein deutlich sichtbarer, bräunlicher Niederschlag. Um das Verstopfen der Elektrodenspitze durch Niederschlagsbildung zu verhindern, wurde der Injektionscocktail verändert. In einem Gemisch aus 200 mM KCl und 30 mM MOPS (3-(N-morpholino)propan-1-sulfonsäure) mit einem pH-Wert von 7,0 wurden 12 mM SBFI gelöst (pers. Mitteil. Th. Mittmann, Ruhr-Universität Bochum, Mittmann et al. 1997). Unter diesen Bedingungen konnte ein Injektionsstrom von -0,5 nA bis zu einer Dauer von 40 min aufrechterhalten werden und die Niederschlagsbildung blieb aus, doch war in den auf diese Weise behandelten Zellen kein Fluoreszenzsignal detektierbar.

Da eine Injektion des Farbstoffes SBFI fehlschlug, wurde die SBFI-Beladung der Zellen durch Inkubation mit der membranpermeablen Form SBFI/AM versucht. Hierfür sind kultivierte Neuronen am besten geeignet, Hirnschnittpräparate nur bedingt. Bei Messungen an Hirnschnittpräparaten sollten nur sehr junge Ratten (max. 14 Tage) verwendet werden, weil entsprechende Präparate von älteren Ratten den Farbstoff schlecht aufnehmen (pers. Mitteil. Ch. Rose, Ludwig-Maximilians-Universität München). Daher wurden Hirnschnittpräparate von 10 Tage alten Ratten verwendet.

Die Vorgehensweise zur Beladung der Zellen mittels SBFI/AM entsprach der Vorgehensweise zur Beladung der Zellen mit Mag-Fura-2/AM (Kapitel 3.3). Die Hirnschnittpräparate wurden mit 20 μ M SBFI für die Dauer von 60 min inkubiert. Erneut war kein Fluoreszenzsignal detektierbar, so dass keine Experimente zur Bestimmung von $[Na^+]_i$ durchgeführt werden konnten.

4. Diskussion

4.1 Qualität der Hirnschnittpräparate

Bei der Beurteilung der Qualität von Hirnschnittpräparaten steht an erster Stelle die visuelle Kontrolle. Intakte Hirnschnittpräparate des Hippokampus zeichnen sich durch glatte, deutlich sichtbare Ränder und eine feste Konsistenz aus (Alger et al. 1984). Präparate, deren Ränder unscharf und zerfließend erscheinen, sind in der Regel in ebenso schlechtem Zustand, wie solche, die stark lichtdurchlässig sind (Alger et al. 1984). Hirnschnittpräparate, die eines oder mehrere dieser Merkmale aufwiesen, wurden von vornherein verworfen. (Kapitel 2.1.3).

Die Ableitung von Feldpotentialen ermöglicht neben der visuellen Kontrolle eine weitergehende Aussage über den Zustand von Hirnschnittpräparaten des Hippokampus, weil mit dieser Methode die elektrophysiologischen Eigenschaften des Hirnschnittpräparates untersucht werden können. Verschiedene Parameter können als Qualitätsmaß dienen, z.B. die Amplitude des Feldpotentials oder die minimale Reizintensität zur Auslösung eines Feldpotentials (Alger et al. 1984). Die Reizfortleitung über die Schaffer-kollateralen, die synaptische Transmission zwischen Schaffer-kollateralen und Dendriten der CA1-Pyramidenzellen und auch der Zustand der CA1-Pyramidenzellen konnten durch die Positionierung der Reizelektrode im Bereich der Schaffer-kollateralen in der CA3-Region und der Ableit-elektrode im Bereich des Dendritenbaumes der CA1-Pyramidenzellen abgesichert werden. Ein Vergleich der abgeleiteten Feldpotentiale mit einer mittleren Amplitude ($A_{50\%}$) von 3,6 mV mit den Ergebnissen anderer Autoren zeigt, dass die Qualität der verwendeten Hirnschnittpräparate gut war. Krugers et al. (2000) beobachteten beispielsweise unter vergleichbaren Versuchsbedingungen eine mittlere $A_{50\%}$ von etwa 4,3 mV, und bei Sekhon et al. (1997) betrug $A_{50\%}$ etwa 3 mV.

Die Lebensdauer der Präparate war mit 9-12 Stunden gut (vergl. auch Kapitel 2.1.3). Die Angaben anderer Autoren hinsichtlich der Lebensdauer ihrer Hirnschnittpräparate schwanken zwischen 8 und 12 Stunden (Leschinger 1994, Richerson & Messer 1995).

4.2 $[Mg^{2+}]_i$ -Messungen nach Beladung der Zellen mit Hilfe von Mag-Fura-2/AM

Mit 10 μ M Mag-Fura-2/AM für die Dauer von 40 min inkubierte Hirnschnittpräparate zeigten bei Betrachtung unter UV-Licht ein großflächiges, über das gesamte Hirnschnittpräparat verteiltes Fluoreszenzsignal. Dies bedeutet einerseits, dass die Beladungstechnik funktionierte, denn der Farbstoff war von den Zellen offenbar gut aufgenommen worden, andererseits wurde dies als weiterer Hinweis auf den guten physiologischen Zustand der Hirnschnittpräparate gedeutet, da in ausreichendem Maß intrazelluläre Esteraseaktivität vorhanden war, um den Farbstoff in seine aktive Form zu überführen.

Bei Verwendung von Mag-Fura-2/AM entfällt die aufwendige Injektionsprozedur, dennoch wurde diese Beladungstechnik nicht für die Experimente herangezogen. Aufgrund der technischen Voraussetzungen war es unmöglich, das Signal nur einer einzelnen Zelle aufzuzeichnen. Damit blieb unklar, ob neben den CA1-Pyramidenzellen vielleicht auch andere Zellen einen Teil des Signals produzierten, beispielsweise Interneuronen oder Gliazellen. Wegen der hohen Intensität des Fluoreszenzsignals konnte nicht geklärt werden, aus welcher Tiefe des Hirnschnittpräparates das Signal stammte. Dies war jedoch im Hinblick auf die Zellen in den äußeren Schichten des Präparates, die beim Schneidevorgang verletzt oder zerstört wurden, sehr wichtig.

In den Experimenten konnte durch eine Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ auf 30 mM nur eine geringfügige Veränderung des Fluoreszenzsignals ausgelöst werden, während in Mag-Fura-2-injizierten Zellen ein deutlicher Anstieg zu sehen war (vergl. Kapitel 3.7). Mag-Fura-2/AM verbleibt nicht allein im Zytosol, sondern gelangt auch in intrazelluläre Speicher und wird dort in Mag-Fura-2 überführt (Churchill & Louis 1999, Hofer et al. 1995, 1998). Da Mag-Fura-2 neben Mg^{2+} auch Ca^{2+} bindet (Konishi et al. 1991, Raju et al. 1989, Sabatini & Regehr 1998), könnte ein großer Anteil des gemessenen Fluoreszenzsignals durch die hohen Mg^{2+} - bzw. Ca^{2+} -Konzentrationen in den intrazellulären Speichern verursacht worden sein, wodurch $[Mg^{2+}]_i$ überschätzt und $[Mg^{2+}]_i$ -Änderungen unterschätzt wurden. Denkbar ist auch eine Überladung der Zellen mit Mag-Fura-2, so dass ein Großteil des einströmenden Mg^{2+} durch Bindung an den Farbstoff gepuffert wurde und die Änderungen des Fluoreszenzsignals nur gering waren.

Mit Ausnahme einer möglichen Überladung mit Farbstoff und der möglichen Interferenz mit Ca^{2+} sind alle zuvor angeführten Fehlerquellen bei der Verwendung von Mag-Fura-2 ausgeschlossen und rechtfertigen die aufwendige und schwierige Injektionsprozedur. Für die Experimente wurden nur Zellen verwendet, deren Fluoreszenz nach der Injektion nicht mehr als 50-fach höher war als die Autofluoreszenz, um eine Farbstoff-Überladung zu vermeiden. Die Affinität zu Ca^{2+} wurde berücksichtigt, indem die Versuchsbedingungen so gewählt waren, dass $[\text{Ca}^{2+}]_i$ weitgehend konstant blieb. Zusätzlich wurden Kontrollmessungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.6).

4.3 Iontophoretische Injektion von Mag-Fura-2

Da Mg^{2+} -sensitive Glasmikroelektroden nicht zur Messung von $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in CA1-Pyramidenzellen im Hirnschnittpräparat des Ratten-Hippokampus verwendet werden konnten und die membrangängige Form des Mg^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Mag-Fura-2/AM zur Bestimmung von $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ungeeignet erschien, wurde $[\text{Mg}^{2+}]_i$ mit Hilfe von iontophoretisch injiziertem Mag-Fura-2 bestimmt. Alle konventionellen Glasmikroelektroden, die mit Vertikal-Elektrodenziehgeräten (Narishige PE-2 und David Kopf Instruments Modell 700 C) zur Farbstoffinjektion hergestellt worden waren, führten trotz Einstichhilfe und anschließender 20-minütiger Strominjektion bei $-0,5 \text{ nA}$ zum Zelltod. Der Spitzendurchmesser dieser Glasmikroelektroden war relativ groß und führte offenbar zu großen Verletzungen bei den kleinen Zellkörpern der CA1-Pyramidenzellen. Theta-Glasmikroelektroden waren zur Farbstoffbeladung ungeeignet, da ihre Spitzen schon nach 1-2 min Injektionszeit bei einem Injektionsstrom von $-0,5 \text{ nA}$ verstopften. Wahrscheinlich war aufgrund der Theta-Form des Elektrodenglases die Öffnung an der Spitze so gering, dass nur kleine Farbstoffmengen injiziert werden konnten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes schwach war.

Mit Mag-Fura-2 gefüllte Glasmikroelektroden, die mit dem Horizontal-Elektrodenziehgerät (Sutter, Modell P 97) hergestellt worden waren, konnten unter Verwendung der Einstichhilfe ohne erkennbare Verletzung der Zellmembran in die CA1-Pyramidenzellen eingestochen werden und lieferten E_m -Werte um -50 mV . Nach 20-minütiger Injektion von $-0,5 \text{ nA}$ lag das E_m bei etwa $-65,3 \text{ mV}$ und war durchaus mit den E_m -Werten vergleichbar, die mit 2 M KAc -gefüllten Glasmikroelektroden bestimmt wurden (Kapitel 3.6). Der

Spitzendurchmesser dieser Glasmikroelektroden war offenbar ausreichend klein, um eine gute Penetration der Zellmembran zu gewährleisten. In den mit Mag-Fura-2 bzw. Fura-2 beladenen Zellen war die gemessene Fluoreszenz etwa 10-50 mal so hoch wie die Autofluoreszenz. Die Öffnung im Bereich der Elektrodenspitze war somit ausreichend groß, um einen ungehinderten Farbstofffluss in die Zelle zu garantieren, eine Eigenschaft, die bei den Theta-Glasmikroelektroden nicht gegeben war. Die mit dem Horizontal-Elektrodenziehgerät hergestellten Glasmikroelektroden erfüllten alle notwendigen Kriterien, die zur Langzeitmessung des E_m und zur Farbstoffinjektion erforderlich waren.

4.4 Effekte der Farbstoffinjektion auf die CA1-Pyramidenzellen

Bei der iontophoretischen Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen kann es zu Verschiebungen verschiedener Parameter kommen, die eine langfristige Veränderung zellulärer Funktionen zur Folge haben können. Beispielsweise tritt während der Farbstoffinjektion eine Hyperpolarisation der Zellmembran auf, die elektrochemische Gradienten verändert. Zudem muss es durch das Einbringen des Fluoreszenzfarbstoffs zu einer Verstärkung der intrazellulären Pufferkapazität für Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} kommen (Dierkes 1998). Außerdem könnten Ionen komplexiert werden, die für die Zellfunktion von Bedeutung sind, z.B. binden Mag-Fura-2 und Fura-2 Zn^{2+} mit höherer Affinität als Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} (Übersicht in: Canzoniero et al. 1997).

Nach der Farbstoffinjektion war E_m im Mittel um einen Betrag von etwa 15 mV signifikant negativer als zuvor. Es wäre denkbar, dass es sich hierbei um ein Messartefakt durch die Ausbildung eines Diffusionspotentials handelt, wie von Dierkes (1994) bei Fura-2 gefüllten Injektionselektroden beobachtet. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Strominjektion zu einer Verschiebung des E_m unter die Öffnungsschwelle für bestimmte Ionenkanäle führt. Dadurch wird unter anderem der Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle nach dem Elektrodeneinstich reduziert und damit möglicherweise das Einheilen der Glasmikroelektrode erleichtert. Ein solches Einheilen wurde auch bei den elektrophysiologischen Untersuchungen beobachtet, wo vergleichbare Veränderungen des E_m auftraten. Insgesamt betrachtet, scheinen wichtige Zellfunktionen von der Farbstoffinjektion, wie sie in den Experimenten vorgenommen wurde, weitgehend unbeeinflusst zu sein. Hierfür sprechen die Aktionspotential-Auslösung, die hohe Lebensdauer der Zellen von bis zu 6 Stunden nach

der Injektion (Kapitel 3.4) und die $[Mg^{2+}]_i$ -Regulation nach Beladung der Zellen mit Mg^{2+} (Kapitel 3.10).

4.5 E_m unter Ruhebedingungen und in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$

Das in CA1-Pyramidenzellen in physiologischer Lösung ermittelte E_m von -68,2 mV (Tabelle 2, Abb. 9) lag in der gleichen Größenordnung wie die von anderen Autoren unter vergleichbaren Bedingungen mit konventionellen Einzelkanal-Glasmikroelektroden bestimmten Werte von -70 mV (Tanaka et al. 1999), -71 mV (Yamamoto et al. 1997) und -65,3 mV (Fukuda & Prince 1992). E_m war von $[Na^+]_a$ unabhängig (Tabelle 2, Abb. 9). Dieser Befund legt nahe, dass die Zellmembran der CA1-Pyramidenzellen eine eher geringe Leck-Leitfähigkeit für Na^+ aufweist.

4.6 $[Ca^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen und in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$

Die mittlere $[Ca^{2+}]_i$ betrug unter Ruhebedingungen 30 nM (Tabelle 2, Abb. 10) und war etwas niedriger als die in früheren Untersuchungen in CA1-Pyramidenzellen bestimmten Werte von 39 nM (Knöpfel & Gähwiler 1992) und 49,5 nM (Garaschuk et al. 1997).

Die CA1-Pyramidenzellen verfügen über einen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher in der Zellmembran, der unter physiologischen Bedingungen 3 Na^+ in die Zelle hinein transportiert und 1 Ca^{2+} aus der Zelle heraus. Das elektrochemische Gleichgewicht eines solchen Austauschers hängt von den Ionengradienten für Na^+ bzw. Ca^{2+} über der Zellmembran und vom E_m ab. Dies bedeutet, dass $[Ca^{2+}]_i$ mit sinkender $[Na^+]_a$ zunehmen sollte. Abb. 10 zeigt, dass dies tendenziell der Fall war, jedoch sind die Unterschiede der Mittelwerte nicht signifikant, so dass die Bildung eines $[Na^+]_a$ -unabhängigen Gesamtmittelwertes zu 35 nM gerechtfertigt erscheint. Offenbar ist der Einfluss des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers unter diesen Bedingungen gering und $[Ca^{2+}]_i$ wird durch $[Na^+]_a$ -unabhängige Mechanismen niedrig gehalten, möglicherweise durch Ca^{2+} -Pumpen.

Mag-Fura-2 ist nicht nur für Mg^{2+} sensitiv, sondern auch für andere zweiwertige Kationen, wie Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} (Haugland 1999). Mag-Fura-2 wird auch für $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen eingesetzt, wenn die zu erwartende $[Ca^{2+}]_i > 1 \mu M$ ist (Hofer et al. 1998, Hofer &

Machen 1993, Konishi et al. 1991, Neher & Zucker 1993, Odgen et al 1995, Raju et al. 1989). Die Dissoziationskonstante (K_d) für Ca-Mag-Fura-2 liegt bei 53 μM (Quamme & Rabkin 1990, Raju et al. 1989). Mit 35 nM liegt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ etwa um den Faktor 1000 unterhalb des K_d für Ca^{2+} und sollte unter diesen Bedingungen nicht mit Mag-Fura-2 interferieren.

4.7 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen und in Abhängigkeit von $[\text{Na}^+]_a$

Die $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in CA1-Pyramidenzellen des Rattengehirns wurde in dieser Arbeit erstmalig bestimmt. Die mittlere $[\text{Mg}^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen betrug 0,35 mM (Tabelle 2, Abb. 11). Bei kultivierten Neuronen des Vorderhirns von Ratten ermittelten Rajdev & Reynolds (1995) einen etwas höheren Wert von 0,52 mM. Möglicherweise ist dieser Wert leicht überschätzt, weil die Zellen mit Mag-Fura-2/AM beladen wurden, das sich in intrazellulären Speichern anreichern kann (Churchill & Louis 1999, Hofer et al. 1995, 1998; siehe auch Kapitel 4.2). Bei kultivierten Neuronen aus Dorsalwurzel-Ganglien der Ratte bestimmten Kato et al. (1997) eine $[\text{Mg}^{2+}]_i$ von 0,42 mM. Die Angaben der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ für Retzius-Neuronen des medizinischen Blutegels schwanken zwischen 0,22 mM (Roden 1998) und 0,46 mM (Günzel & Schlue 1996). In Neuronen von *Helix aspersa* beträgt die mittlere $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 0,66 mM (Alvarez-Leefmans et al. 1984) bzw. 0,62 mM (Kennedy 1998). In Skelett- und Herzmuskelzellen verschiedener Vertebraten liegt die mittlere $[\text{Mg}^{2+}]_i$ bei etwa 1 mM, und bei glatten Muskelzellen ist $[\text{Mg}^{2+}]_i$ wahrscheinlich etwas niedriger (Übersicht in McGuigan et al. 1991). In Pankreaszellen von Mäusen bestimmten Mooren et al. (2001) eine mittlere $[\text{Mg}^{2+}]_i$ von 0,58 mM.

Die Mittelwerte für $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in CA1-Pyramidenzellen stiegen mit sinkender $[\text{Na}^+]_a$ hoch signifikant an (Tabelle 2, Abb. 11). Dieser Anstieg könnte durch die Aktivität eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers erklärt werden, der unter Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten Na^+ in die Zelle hinein transportiert und Mg^{2+} aus der Zelle heraus transportiert. Mit sinkender $[\text{Na}^+]_a$ wird die in die Zelle gerichtete Triebkraft für Na^+ kleiner, so dass auch die Aktivität des Austauschers abnimmt und $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ansteigt. Bei Herzmuskelzellen von Frettchen und Meerschweinchen beobachtete Fry (1986) ebenfalls einen $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg nach Reduktion von $[\text{Na}^+]_a$. Bei glatten Muskelzellen des Meerschweinchens beobachteten Tashiro & Konishi (1997) als Folge einer $[\text{Na}^+]_a$ -Reduktion auf 0 mM bei konstanter $[\text{Mg}^{2+}]_a$ von 1,2 mM eine $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Erhöhung und führten diesen Befund auf einen

$\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher zurück. Kennedy (1998) machte bei Neuronen von *Helix aspersa* die gleiche Beobachtung. Handy et al. (1996) konnten in isolierten Herzmuskelzellen der Ratte durch alleinige $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung von 1 auf 5 mM keinen $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg beobachten. Wurde jedoch $[\text{Na}^+]_a$ gleichzeitig von 140 auf 0 mM reduziert, stieg $[\text{Mg}^{2+}]_i$ deutlich an. Brocard et al. (1993) zeigten, dass der Glutamat-induzierte $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg in kultivierten Neuronen des Rattengehirns in Na^+ -freier Lösung größer war als in Na^+ -haltiger Lösung ($\approx 140 \text{ mM Na}^+$) und vermuteten die Aktivierung eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers.

4.8 Beladung der CA1-Pyramidenzellen mit Mg^{2+}

Bei den CA1-Pyramidenzellen führte die Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM bei konstanter $[\text{Na}^+]_a$ von 110 bzw. 50 mM zu einem reversiblen $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 12, 15, 17, 19, 21, 24 und Kapitel 3.7). Dieser $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg ist hauptsächlich durch einen passiven Mg^{2+} -Einstrom entlang des elektrochemischen Gradienten verursacht. Ein im Umkehrmodus arbeitender $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher ist wahrscheinlich nicht oder nur gering beteiligt. Das thermodynamische Gleichgewicht eines solchen Austauschers wird mit abnehmender $[\text{Na}^+]_a$ in Richtung höherer $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Werte verschoben (Gleichung 12). Demzufolge müsste die Mg^{2+} -Einstromrate in Gegenwart von 50 mM Na^+ größer sein als in Gegenwart von 110 mM Na^+ . In beiden Fällen war die Rate jedoch etwa gleich groß (Kapitel 3.7). Dies spricht gegen eine signifikante Mitwirkung des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers am Mg^{2+} -Einstrom.

Die Untersuchung des Mg^{2+} -Einstroms in Gegenwart eines spezifischen Blockers würde eine genauere Aussage über die Beteiligung eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers am Mg^{2+} -Einstrom ermöglichen. Aufgrund der experimentellen Vorbedingungen war Imipramin die einzige anwendbare Substanz, die in der Literatur als Inhibitor des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers beschrieben ist (Féray & Garay 1988, Flatman & Smith 1990, Günther & Vormann 1995, Tashiro & Konishi 1997, 2000). Der Mg^{2+} -Einstrom blieb durch Imipramin unbeeinflusst, so dass die Beteiligung eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers am Mg^{2+} -Einstrom unwahrscheinlich ist. Da Imipramin den Na^+ -abhängigen Mg^{2+} -Ausstrom auch nicht beeinflusste, kann die Beteiligung des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers am Mg^{2+} -Einstrom nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Tashiro et al. (2000) zeigten, dass der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher des Rattengehirns neben Ca^{2+} auch Mg^{2+} transportieren kann, so dass dieser bei den CA1-Pyramiden-

zellen Mg^{2+} in die Zellen hineintransportieren könnte. Mit sinkender $[\text{Na}^+]_a$ verschiebt sich das Gleichgewicht dieses Austauschers, wie das Gleichgewicht eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers, in Richtung höherer $[\text{Mg}^{2+}]_i$. Da die Mg^{2+} -Einstromrate aber von $[\text{Na}^+]_a$ unabhängig war, erscheint eine Beteiligung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers am Mg^{2+} -Einstrom unwahrscheinlich. Die Berechnung des thermodynamischen Gleichgewichtes des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers mit Hilfe von Gleichung 12 unter der Voraussetzung, dass die Stöchiometrie von $3 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$ auf den Mg^{2+} -Transport übertragbar ist, zeigt, dass der Austauscher auch bei $[\text{Na}^+]_a = 50 \text{ mM}$ und $[\text{Mg}^{2+}]_a = 30 \text{ mM}$ immer noch Mg^{2+} aus der Zelle heraustransportieren sollte und daher nicht am Mg^{2+} -Einstrom beteiligt sein kann.

Auch bei anderen Präparaten führte die Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ zu einem Mg^{2+} -Einstrom, beispielsweise bei Herzmuskelzellen von Meerschweinchen und Frettchen (Fry 1986, Hall et al. 1992, Nakayama & Tomita 1991), bei Retzius-Neuronen des Blutegels (Günzel & Schlue 1996, 1997), bei Neuronen von *Helix aspersa* (Kennedy 1998), bei Muskelfasern von Seepocken (Montes et al. 1989) und bei Skelettmuskelzellen von Fröschen (Blatter 1990). Überwiegend wird der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg auf den passiven Mg^{2+} -Einstrom entlang des elektrochemischen Gradienten und die Umkehr des Mg^{2+} -Transportsystems zurückgeführt.

Bei etwa einem Drittel der hier durchgeführten Experimente wurde beobachtet, dass der durch 30 mM Mg^{2+} -Gabe induzierte $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstieg zweiphasig war, wobei die erste Phase deutlich langsamer war als die zweite (Kapitel 3.7, Abb. 19, Abb. 24). Zwei mögliche Erklärungen gibt es für diese Beobachtung. Einerseits könnte mit Beginn der zweiten, schnelleren Phase ein zusätzliches Mg^{2+} -Transportsystem in Form eines Austauschers oder Ionenkanals aktiviert werden und eine Steigerung der Mg^{2+} -Einstromrate herbeiführen. Andererseits könnte die Mg^{2+} -Einstromrate in der ersten, langsameren Phase durch intrazelluläre Pufferung und/oder Aufnahme in intrazelluläre Speicher maskiert sein. Mit der Sättigung des Puffers bzw. der Speicher würde die zweite, schnellere Phase beginnen und die Mg^{2+} -Einstromrate wäre ungedämpft.

Gleichzeitig mit der $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung und dem damit verbundenen Mg^{2+} -Einstrom depolarisierte die Zellmembran (Abb. 13). Diese Depolarisation könnte auf einen passiven Mg^{2+} -Einstrom in die Zelle zurückgehen, bei dem mit jedem Mg^{2+} zwei positive Nettoladungen in die Zelle gelangen. Denkbar wäre auch, dass Mg^{2+} K^+ -Kanäle hemmt

(Matsuda et al. 1987) und zu einer Verschiebung des E_m in positive Richtung beiträgt. Die Beteiligung eines umgekehrten elektrogenen $1 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Mg}^{2+}$ -Austauschers an der Membrandepolarisation erscheint eher unwahrscheinlich, da thermodynamische Berechnungen zeigten, dass die Existenz eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers mit dieser Stöchiometrie auszuschließen ist (Kapitel 4.14).

Mit großer Sicherheit beruhen die mit Mag-Fura-2 gemessenen $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstiege nicht auf einer Interferenz von Ca^{2+} -Ionen mit Mag-Fura-2. Kontrollmessungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2 ergaben variable Ergebnisse. In einigen Experimenten stieg $[\text{Ca}^{2+}]_i$ infolge der $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung an, jedoch waren die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege gering (Abb. 14) und traten nur in 10 % aller Experimente auf. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege müssen nicht zwingend auf einströmendes Ca^{2+} zurückgehen, sondern könnten auch durch die Verdrängung von Ca^{2+} von intrazellulären Bindestellen durch einströmendes Mg^{2+} verursacht sein. In den 40 % der Experimente, bei denen eine geringfügige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abnahme beobachtet wurde, könnte es durch die erhöhte $[\text{Mg}^{2+}]_a$ zu einer Hemmung erregender synaptischer Verbindungen zu den CA1-Pyramidenzellen und damit des Ca^{2+} -Einstroms in die postsynaptischen Endigungen gekommen sein (Amler et al. 1987). In der überwiegenden Anzahl der Experimente beeinflusste die $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht (Abb. 14).

In allen Kontrollexperimenten blieb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ immer um mindestens eine Größenordnung kleiner als der für Mag-Fura-2 kritische Wert von $1 \mu\text{M}$, so dass die mit Mag-Fura-2 gemessenen $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Anstiege nicht auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderungen zurückgehen können.

4.9 Wirkung von Co^{2+} und Ni^{2+} auf $[\text{Mg}^{2+}]_i$ und den Mg^{2+} -Einstrom

Neben Mg^{2+} und Ca^{2+} können auch andere zweiwertige Kationen von Mag-Fura-2 gebunden werden, so dass es zu einer artifiziellen Änderung des Fluoreszenzsignals kommt, die nicht auf einer Änderung der Mg^{2+} -Konzentration beruht. Beispielsweise führt die Bindung von Co^{2+} und Ni^{2+} an Mag-Fura-2 zu einer Auslöschung der Mag-Fura-2-Fluoreszenz (Haugland 1999). Dies bedeutet, dass eine unverfälschte $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Messung mit Mag-Fura-2 in Gegenwart von Co^{2+} oder Ni^{2+} nur möglich ist, wenn diese Ionen nicht in die Zellen eindringen. Andererseits kann die Reaktion von Mag-Fura-2 auf Applikation von Co^{2+} oder Ni^{2+} genutzt werden, um den Einstrom dieser Ionen in die Zellen nachzuweisen.

Die Gegenwart von 5 mM Co^{2+} in der extrazellulären Flüssigkeit führte zu keiner zusätzlichen Veränderung des Fluoreszenzsignals von Mag-Fura-2 (Abb. 15). Dies bedeutet zum einen, dass Co^{2+} nicht in die CA1-Pyramidenzellen eindrang, zum anderen, dass Co^{2+} $[\text{Mg}^{2+}]_i$ nicht beeinflusste. Der durch $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung auf 30 mM induzierte Mg^{2+} -Einstrom war in Gegenwart von 5 mM Co^{2+} auf 3,8 % reduziert (Abb. 16). Co^{2+} blockiert bei CA1-Pyramidenzellen u. a. spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des T-Typs (Takahashi & Akaike 1991, Takahashi et al. 1989). Möglicherweise vermitteln diese Ca^{2+} -Kanäle den Mg^{2+} -Einstrom in die CA1-Pyramidenzellen, zumal die Öffnungsschwelle der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle bei etwa -60 mV liegt (Takahashi & Akaike 1991, Takahashi et al. 1989), dem E_m von CA1-Pyramidenzellen in Gegenwart von 30 mM $[\text{Mg}^{2+}]_a$ entsprechend (siehe auch Abb. 13).

Vermutlich drang Ni^{2+} im Gegensatz zu Co^{2+} in die CA1-Pyramidenzellen ein. Der Zusammenbruch der beiden Mag-Fura-2-Signale (Mg^{2+} -beladene und Mg^{2+} -freie Form) in Gegenwart von 5 mM Ni^{2+} (Abb. 18) lässt sich nur durch einen direkten Kontakt von Ni^{2+} mit Mag-Fura-2 und somit nur durch einen Ni^{2+} -Einstrom in die Zellen erklären. Das Signal der Mg^{2+} -beladenen und der Mg^{2+} -freien Form von Mag-Fura-2 sollte bei Bindung von Ni^{2+} gleichermaßen abfallen, was in den Experimenten auch tatsächlich auftrat.

4.10 Abhängigkeit des Mg^{2+} -Auswärtstransportes von $[\text{Na}^+]_a$

Die $[\text{Na}^+]_a$ -Abhängigkeit der $[\text{Mg}^{2+}]_i$ lieferte bereits einen ersten Hinweis auf das Vorkommen eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers in der Zellmembran der CA1-Pyramidenzellen (Kapitel 3.6, Tabelle 2, Abb. 11). Diese Vorstellung wurde durch die Untersuchung des Mg^{2+} -Ausstroms aus Mg^{2+} -beladenden Neuronen erhärtet. In den Experimenten wies die Mg^{2+} -Ausstromrate deutliche $[\text{Na}^+]_a$ -Abhängigkeit auf, wie sie für einen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher zu erwarten war (Kapitel 3.10, Tabelle 3, Abb. 19, Abb. 20). Mit sinkender $[\text{Na}^+]_a$ wird der Na^+ -Gradient und damit die elektromotorische Triebkraft für den Mg^{2+} -Auswärtstransport kleiner, und dementsprechend sollte die Mg^{2+} -Ausstromrate abnehmen. In Badlösungen mit sehr niedrigen Na^+ -Konzentrationen sollte sich die Transportweise des Austauschers sogar umkehren. Dies war in den Experimenten der Fall: die Reduktion von $[\text{Na}^+]_a$ von 150 auf 50 mM führte zu einer hoch signifikanten Verlangsamung der Mg^{2+} -Ausstromrate. Die weitere $[\text{Na}^+]_a$ -Reduktion auf 15 mM führte zu einem Mg^{2+} -Einstrom

(Abb. 20), so dass der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher bei CA1-Pyramidenzellen der einzige Mechanismus zur Regulation von $[\text{Mg}^{2+}]_i$ sein sollte. Wenn weitere Mechanismen am Mg^{2+} -Auswärtstransport beteiligt wären, sollte die Reduktion von $[\text{Na}^+]_a$ allein nicht ausreichen, um eine vollständige Hemmung des Mg^{2+} -Ausstroms zu erzielen.

Auch bei anderen Präparaten wurde eine $[\text{Na}^+]_a$ -Abhängigkeit des Mg^{2+} -Auswärtstransportes nachgewiesen, die auf einen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher hindeutete, beispielsweise bei Neuronen des Blutegels (Günzel & Schlue 1996, Hintz 1999), bei Erythrozyten (Übersicht in: Flatman & Smith 1991), Herzmuskelzellen (Handy et al. 1996) und glatten Muskelzellen von Ratten (Tashiro & Konishi 1997).

4.11 Einfluss der Osmolarität auf den Mg^{2+} - Auswärtstransport

Die Mg^{2+} -Ausstromrate war in Badlösungen mit 194 mM Na^+ gegenüber ACSF mit 150 mM Na^+ verlangsamt (Abb. 20). Dieser Befund lässt sich nicht durch einen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher erklären, da dieser seine Aktivität in hoher $[\text{Na}^+]_a$ sogar verstärken sollte. Die Verringerung der Mg^{2+} -Ausstromrate könnte auf einen osmotischen Effekt zurückgehen, wie die in Kapitel 3.11 dargestellten Experimente zeigen. Die Applikation einer Versuchslösung, deren Na^+ -Gehalt 150 mM betrug, deren Osmolarität aber durch Zusatz von 86 mM Sorbitol der 194 mM Na^+ -Lösung entsprach, führte zu einer signifikanten Verringerung der Mg^{2+} -Ausstromrate (Abb. 21, Abb. 22). Vermutlich kam es durch die erhöhte Osmolarität in der extrazellulären Flüssigkeit zum Ausstrom von Wasser und die Zellen schrumpften, wodurch sich die intrazellulären Ionenkonzentrationen erhöhten (Lang et al 1998). Wird die Mg^{2+} -Ausstromrate in Gegenwart von 194 mM $[\text{Na}^+]_a$ um den osmotischen Effekt korrigiert, ergibt sich eine Rate, die in der Nähe der Mg^{2+} -Ausstromrate in ACSF liegt. Dies spricht dafür, dass der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher ab einer $[\text{Na}^+]_a$ von etwa 150 mM bereits mit maximaler Aktivität arbeitet, so dass durch eine weitere $[\text{Na}^+]_a$ -Erhöhung die Aktivität des Austauschers nicht gesteigert werden kann.

4.12 Imipramin-Sensitivität des Mg^{2+} -Auswärtstransportes

Das trizyklische Antidepressivum Imipramin gilt als wirksamer Inhibitor des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers und wurde bei vielen Vertebraten-Präparaten erfolgreich verwendet, beispielsweise bei Erythrozyten von Menschen, Frettchen und Ratten (Féray & Garay 1988, Flatman & Smith 1990, Günther & Vormann 1995), bei Herzmuskelzellen (Handy et al. 1996), Milzlymphozyten (Wolf et al. 1997) und Leberzellen von Ratten (Cefaratti et al. 1998) sowie bei kultivierten Magenepithelzellen von Schafen (Schweigel et al. 2000). Amilorid und Quinidin sind teilweise wirksam (Féray & Garay 1988, Flatman & Smith 1990, Günther et al. 1989, 1990, Nakayama & Nomura 1995, Wolf et al. 1994), doch konnten diese Substanzen bei den hier durchgeführten $[Mg^{2+}]_i$ -Messungen mit Mag-Fura-2 leider nicht verwendet werden, da sie im gleichen Wellenlängenbereich wie Mag-Fura-2 UV-Licht absorbieren. Die pharmakologischen Experimente zur Hemmbarkeit des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers mussten daher auf die Verwendung von Imipramin beschränkt werden.

In Abb. 23 wird gezeigt, dass Imipramin dosisabhängig auf die CA1-Pyramidenzellen zellschädigend wirkte. Féray & Garay (1988) beschrieben die Substanz erstmalig als Inhibitor des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers in menschlichen Erythrozyten, der andere Transporter unbeeinflusst ließ und keine toxischen Effekte auf die Membranleitfähigkeit für mono- und divalente Kationen ausübte. Spätere Publikationen anderer Autoren zeigten jedoch, dass die Wirkung von Imipramin weit vielfältiger ist. Beispielsweise hemmt Imipramin die Phosphorylierung der Ca^{2+} -ATPase (De Meis 1991), die Acetylcholinesterase (Molnar et al. 1993) und NMDA-Rezeptoren (Sills & Loo 1989, Tohda et al. 1995). Die zellschädigende Wirkung bei Verwendung hoher Imipramin-Konzentrationen ($> 0,5$ mM) ist wahrscheinlich auf einen oder mehrere der vielen Effekte zurückzuführen, die Imipramin neben der Hemmung des Na^+/Mg^{2+} -Austauschers auslöst. In der vorliegenden Arbeit blieb bei CA1-Pyramidenzellen der Mg^{2+} -Auswärtstransport von der Imipramin-Gabe unbeeinflusst, ebenso $[Ca^{2+}]_i$ und die durch 30 mM Mg^{2+} -Gabe induzierte Membrandepolarisation (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26, Tabelle 4). Diese Befunde könnten darauf beruhen, dass der Mg^{2+} -Auswärtstransport wie bei Tashiro et al. (2000) postuliert, nicht durch einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher bewirkt wird, sondern durch die Aktivität des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers, der auch Mg^{2+} transportiert. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit waren bei

Tashiro et al. (2000) die $[Ca^{2+}]_i$ -Ruhewerte und der Mg^{2+} -Einstrom stark vom Na^+ -Gradienten über der Zellmembran abhängig, der Mg^{2+} -Auström dagegen nicht, so dass bei CA1-Pyramidenzellen ein Mg^{2+} -Transport durch einen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher unwahrscheinlich ist. Der Mg^{2+} -Transport könnte durch einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher erfolgen, der durch Imipramin nicht gehemmt wird und somit eine pharmakologische Besonderheit darstellt. Diese Vorstellung würde zu früheren Ergebnissen an Retzius-Neuronen des medizinischen Blutegeles passen, die keinen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher besitzen (Hochstrate et al. 1995, Hochstrate & Schlue 2001), aber über einen $[Na^+]_a$ -abhängigen Mg^{2+} -Ausstrom verfügen (Günzel & Schlue 1996).

4.13 Versuche zur Bestimmung von $[Na^+]_i$ mit SBFI

Alle durchgeführten Versuche zur Bestimmung von $[Na^+]_i$ der CA1-Pyramidenzellen mit Hilfe des Na^+ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes SBFI scheiterten an der Beladung der Zellen mit dem Farbstoff. Waren die Injektionselektroden mit 50 mM wässriger SBFI-Lösung gefüllt, nahm der Injektionsstrom bereits nach wenigen Sekunden ab und die Injektionselektrode verstopfte. Es bildete sich ein bräunlicher Niederschlag, der vermutlich auf einem Ausfällen von SBFI beruhte. Auch in früheren Arbeiten am Düsseldorfer Institut für Neurobiologie erwies sich die Injektion von SBFI als schwierig. Die Injektion dieses Farbstoffs in Neuronen des medizinischen Blutegeles war ohne Verstopfung der Injektionselektroden nur mit stumpfen Glasmikroelektroden möglich und gelang nur selten bei kleineren Neuronen (Dierkes 1998, Schoppe 2000). Diese Neuronen waren jedoch immer noch größer als CA1-Pyramidenzellen. Durch die Veränderung des Injektionscocktails nach Mittmann et al. (1997) (Reduktion der SBFI-Konzentration auf 12 mM, Zusatz von 200 mM KCl, 30 mM MOPS bei pH 7,0) konnte zwar der Injektionsstrom aufrechterhalten und die Niederschlagsbildung unterdrückt werden, jedoch wurde der Injektionsstrom nun weniger durch den Fluoreszenzfarbstoff getragen als vielmehr durch die übrigen Bestandteile des Injektionscocktails, da in den behandelten Zellen kein Fluoreszenzsignal messbar war.

Die Beladung der Zellen mit SBFI durch Inkubation mit der membranpermeablen Form des Farbstoffs, SBFI/AM, scheiterte ebenfalls. Die Fähigkeit von neuronalen Zellen, SBFI/AM aufzunehmen, nimmt mit dem Alter der Ratten ab (pers. Mitteil. Ch. Rose,

Ludwig-Maximilians-Universität München). Möglicherweise war das Alter der Ratten mit 10 Tagen zu hoch. Fehlende Aktivität unspezifischer Esterasen zur Umsetzung des Farbstoffs in die aktive Form kann als Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da diese Aktivität bei der Beladung mit Mag-Fura-2/AM vorhanden war (Kapitel 3.3).

4.14 Berechnungen zur Stöchiometrie des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers

Bisher wurden an Säugetierzellen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher mit drei verschiedenen Stöchiometrien beschrieben: 1 Na^+ /1 Mg^{2+} (Buri & McGuigan 1990, Flatman & Smith 1990, Frenkel et al. 1989, Lüdi & Schatzmann 1987), 2 Na^+ /1 Mg^{2+} (Blatter 1990, 1991, Günther et al. 1995, Günther & Vormann 1990) und 3 Na^+ /1 Mg^{2+} (Féray & Garay 1988, Tashiro & Konishi 1997). Eine Möglichkeit, die Stöchiometrie eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers zu bestimmen, ist die Untersuchung des Einflusses von E_m auf die Mg^{2+} -Ausstromrate, z.B. mit Hilfe von Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden zur simultanen Bestimmung von E_m und $[\text{Mg}^{2+}]_i$, in Kombination mit einer zweiten Glasmikroelektrode zur Klemmung des E_m . Eine weitere Möglichkeit ist die $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Bestimmung mit Hilfe von Mag-Fura-2 bei gleichzeitiger Klemmung des E_m mit einer Glasmikroelektrode. Da unter den experimentellen Vorbedingungen beide Messverfahren nicht anwendbar waren, wurden thermodynamische Berechnungen angestellt, anhand derer die wahrscheinlichste Stöchiometrie abgeschätzt werden sollte.

Die $[\text{Mg}^{2+}]_i$, die im thermodynamischen Gleichgewicht durch einen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher, der x Na^+ gegen 1 Mg^{2+} austauscht, eingestellt wird ($[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$), kann mit Hilfe von Gleichung 12 berechnet werden (Flatman & Smith 1990, Günzel & Schlue 1994, 1996):

$$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}} = [\text{Mg}^{2+}]_a * \left(\frac{[\text{Na}^+]_i}{[\text{Na}^+]_a} \right)^x * 10^{\frac{E_m}{58\text{mV}} * (x-2)} \quad (12)$$

Die in die Berechnung eingehenden Werte für $[\text{Na}^+]_a$ und $[\text{Mg}^{2+}]_a$ sind durch die Zusammensetzung der Versuchslösungen gegeben. Der experimentell ermittelte Wert von -68,4 mV wurde für E_m verwendet (Kapitel 3.6). Der an kultivierten Hippokampus-Neuronen von Ratten bestimmte $[\text{Na}^+]_i$ -Wert von 8,9 mM wurde aus der Literatur übernommen

(Rose & Ransom 1997). Hiermit wurde $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ für verschiedene Stöchiometrien (x) und $[\text{Na}^+]_{\text{a}}$ -Werte berechnet (Tabelle 5, Abb. 27).

Tabelle 5 : $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ in Abhängigkeit von $[\text{Na}^+]_{\text{a}}$ für verschiedene Stöchiometrien x im Vergleich zu den experimentell ermittelten $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{i}}$

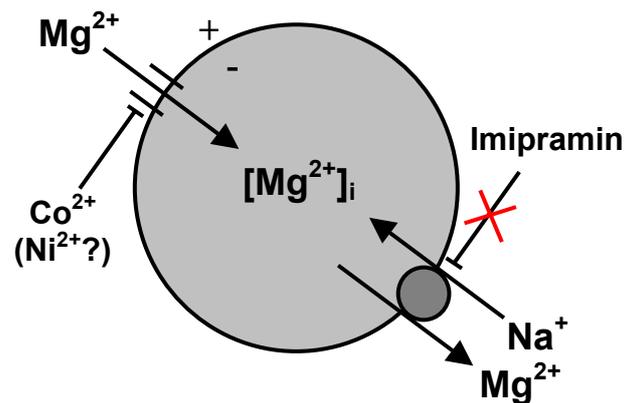
$[\text{Na}^+]_{\text{a}}$ (mM)	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{i}}$ (mM)	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ (mM) für			
		$x = 0$	$x = 1$	$x = 2$	$x = 3$
150	0,35	227	1,031	0,005	$2 * 10^{-5}$
110	0,39	227	1,407	0,009	$5 * 10^{-5}$
50	0,48	227	3,094	0,042	$6 * 10^{-4}$
15	0,56	227	10,31	0,468	0,021

Für $x = 0$ ergibt sich die Nernst-Gleichung, entsprechend einer passiven Verteilung von Mg^{2+} über der Zellmembran. x gibt die Anzahl der Na^+ -Ionen an, die pro Mg^{2+} -Ion transportiert werden.

Die Berechnungen zeigen, dass eine passive Verteilung von Mg^{2+} über der Zellmembran thermodynamisch ebenso wenig mit den experimentellen Befunden vereinbar ist, wie die $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{i}}$ -Regulation durch einen 1 Na^+ /1 Mg^{2+} -Austauscher. Die berechneten $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ liegen jeweils weit über den experimentell bestimmten $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{i}}$ -Werten. In Frage kommt demnach nur ein Austauscher, der pro Mg^{2+} mindestens 2 Na^+ transportiert. Die berechneten $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ -Werte liegen für einen solchen Mechanismus immer unterhalb der experimentell ermittelten $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{i}}$.

4.15 Schlussbetrachtung

Bisher lagen weder *in vitro* noch *in vivo* Befunde zur Regulation von $[Mg^{2+}]_i$ in CA1-Pyramidenzellen des Ratten-Hippokampus vor. Die vorliegende Arbeit liefert die ersten Erkenntnisse bezüglich der bei diesen Neuronen an der $[Mg^{2+}]_i$ -Regulation beteiligten Mechanismen. Insgesamt lassen sich die gewonnenen Ergebnisse zu folgendem Schema zusammenfassen:



Höchstwahrscheinlich erfolgt der Mg^{2+} -Einstrom in die CA1-Pyramidenzellen überwiegend passiv. Der Mg^{2+} -Einstrom ist durch Co^{2+} -hemmbar, jedoch lassen die durchgeführten Experimente über eine Hemmung durch Ni^{2+} keine sichere Aussage zu. $[Mg^{2+}]_i$ unter Ruhebedingungen ist mit 0,35 mM fast drei Größenordnungen niedriger als für eine passive Verteilung von Mg^{2+} über der Zellmembran zu erwarten wäre (227 mM). Folglich muss mindestens ein Mechanismus vorkommen, der einen aktiven Auswärtstransport von Mg^{2+} bewirkt. Die $[Na^+]_a$ -Abhängigkeit des $[Mg^{2+}]_i$ -Wertes und des Mg^{2+} -Auswärtstransportes weisen auf einen Na^+/Mg^{2+} -Austauscher hin, der unter physiologischen Bedingungen den Na^+ -Gradienten als Triebkraft nutzt, um Mg^{2+} aus der Zelle herauszutransportieren. Der Na^+/Mg^{2+} -Austauscher der CA1-Pyramidenzellen stellt eine pharmakologische Besonderheit dar, weil er durch Imipramin nicht blockierbar ist. Aufgrund thermodynamischer Berechnungen ist davon auszugehen, dass die Stöchiometrie des Austauschers mindestens 2 Na^+ zu 1 Mg^{2+} ist.

5. Zusammenfassung

1.) Über die Regulation der freien, intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration ($[Mg^{2+}]_i$) in CA1-Pyramidenzellen des Ratten-Hippokampus lagen bisher weder *in vitro* noch *in vivo* Kenntnisse vor, obwohl Mg^{2+} im Zentralnervensystem eine wichtige funktionelle Rolle spielt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten erstmals die Mechanismen der $[Mg^{2+}]_i$ -Regulation bei CA1-Pyramidenzellen untersucht werden.

2.) Die Methode zur Herstellung von Hirnschnittpräparaten des Ratten-Hippokampus musste am Institut für Neurobiologie etabliert werden. Um die Qualität der Hirnschnittpräparate zu überprüfen, wurde im Bereich der Schaffer-Kollaterale der CA3-Region elektrisch stimuliert und im Bereich der Dendriten der CA1-Pyramidenzellen die ausgelösten Feldpotentiale abgeleitet. Die halbmaximale Amplitude von durchschnittlich $3,6 \pm 1,6$ mV ($n = 18$) und die Lebensdauer der Präparate von 9-12 Stunden entsprach den Angaben in der Literatur.

3.) Der Mg^{2+} -Einstrom und der Mg^{2+} -Ausstrom wurden mit Hilfe des Mg^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Mag-Fura-2 untersucht. Die freie, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde mit Hilfe von Fura-2 bestimmt, und das Membranpotential (E_m) wurde mit konventionellen Einzelkanal-Glasmikroelektroden ermittelt. Die Methode ionensensitiver Glasmikroelektroden erwies sich wegen des geringen Durchmessers der Zellkörper der CA1-Pyramidenzellen als ungeeignet.

4.) Die Messungen von $[Mg^{2+}]_i$, E_m und $[Ca^{2+}]_i$ bei Überspülung mit artifizieller Cerebrospinal-Flüssigkeit (ACSF) ergaben folgende Mittelwerte: $[Mg^{2+}]_i$: $0,35 \pm 0,18$ mM ($n = 95$), E_m : $-68,2 \pm 10,3$ mV ($n = 88$), $[Ca^{2+}]_i$: $30 \pm 16,9$ nM ($n = 23$). Somit lag $[Mg^{2+}]_i$ um etwa 3 Größenordnungen unterhalb des $[Mg^{2+}]_i$ -Wertes, der sich für eine passive Verteilung von Mg^{2+} über der Zellmembran berechnen lässt. Folglich muss es Mechanismen geben, die Mg^{2+} aktiv aus der Zelle heraus transportieren. $[Ca^{2+}]_i$ lag etwa um den Faktor 1000 unterhalb des K_d -Wertes für die Bindung von Ca^{2+} an Mag-Fura-2 und sollte die $[Mg^{2+}]_i$ -Messung mit Hilfe von Mag-Fura-2 nicht beeinflussen.

5.) Die Reduktion der Na^+ -Konzentration in der Badlösung ($[\text{Na}^+]_a$) beeinflusste weder E_m noch $[\text{Ca}^{2+}]_i$, demgegenüber erhöhten sich die $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Werte signifikant. Die folgenden Mittelwerte wurden unter diesen Versuchsbedingungen bestimmt: $[\text{Na}^+]_a = 110 \text{ mM}$: $0,39 \pm 0,21 \text{ mM}$ ($n = 73$), $[\text{Na}^+]_a = 50 \text{ mM}$: $0,48 \pm 0,26 \text{ mM}$ ($n = 25$), $[\text{Na}^+]_a = 15 \text{ mM}$: $0,56 \pm 0,28 \text{ mM}$ ($n = 5$). Da mit sinkender $[\text{Na}^+]_a$ die elektromotorische Triebkraft für den Mg^{2+} -Auswärtstransport kleiner wurde und $[\text{Mg}^{2+}]_i$ stieg, könnten diese Ergebnisse mit dem Vorkommen eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers in der Zellmembran der CA1-Pyramidenzellen erklärt werden.

6.) Die Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM für 15-30 min führte zu einem reversiblen Anstieg von $[\text{Mg}^{2+}]_i$, zu einer geringen Membrandepolarisation und zu variablen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderungen. Diese Effekte waren von $[\text{Na}^+]_a$ unabhängig und wahrscheinlich nicht durch den $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher verursacht.

7.) In Gegenwart von 5 mM Co^{2+} war der Mg^{2+} -Einstrom auf $3,8 \pm 6,6 \%$ ($n = 3$) reduziert. Möglicherweise erfolgte der Mg^{2+} -Einstrom passiv, z. B. über spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle, die durch Co^{2+} gehemmt werden.

8.) Der Effekt von 5 mM Ni^{2+} auf den Mg^{2+} -Einstrom bleibt unklar. Die durchgeführten Experimente ließen keine sicheren Aussagen hierüber zu, weil Ni^{2+} vermutlich in die Zellen eindrang und zu einer Löschung der Mag-Fura-2-Fluoreszenz führte.

9.) Die Mg^{2+} -Ausstromraten in $[\text{Na}^+]_a$ -reduzierten Lösungen waren hochsignifikant geringer als die Mg^{2+} -Ausstromraten in ACSF. Die folgenden Mittelwerte wurden bestimmt: $[\text{Na}^+]_a = 150 \text{ mM}$: $-43,3 \pm 26,7 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n = 11$), $[\text{Na}^+]_a = 110 \text{ mM}$: $-43,9 \pm 47,0 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n = 51$), $[\text{Na}^+]_a = 50 \text{ mM}$: $-21,6 \pm 10,6 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n = 19$), $[\text{Na}^+]_a = 15 \text{ mM}$: $+2,3 \pm 16,0 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n = 13$). Diese $[\text{Na}^+]_a$ -Abhängigkeit des Mg^{2+} -Auswärtstransports wäre durch das Vorkommen eines $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers erklärbar.

10.) Die Erhöhung von $[\text{Na}^+]_a$ von 150 mM (ACSF) auf 194 mM ging mit einer Veränderung der Osmolarität der Versuchslösung einher. In dieser Versuchslösung mit erhöhter $[\text{Na}^+]_a$ betrug die Mg^{2+} -Ausstromrate $-19,2 \pm 21,4 \mu\text{M}/\text{min}$ ($n = 4$).

11.) Die Applikation einer Versuchslösung, deren Na^+ -Gehalt der ACSF entsprach, deren Osmolarität jedoch durch Zusatz von 86 mM Sorbitol erhöht worden war, führte zu einer signifikanten Verringerung der Mg^{2+} -Ausstromrate auf $49 \pm 20 \%$ ($n = 3$). Dieser Befund könnte auf einer Zellschrumpfung und der damit verbundenen Erhöhung intrazellulärer Ionenkonzentrationen beruhen. Die Verlangsamung der Mg^{2+} -Ausstromrate in Gegenwart von 194 mM $[\text{Na}^+]_a$ ist demnach durch osmotische Effekte erklärbar und lässt den Schluss zu, dass der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher ab einer $[\text{Na}^+]_a$ von ca. 150 mM mit maximaler Aktivität arbeitet.

12.) Imipramin ist als Inhibitor von $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschern beschrieben. In CA1-Pyramidenzellen hatte Imipramin allerdings neben einer starken, dosisabhängigen, zellschädigenden Wirkung keinen Effekt auf die Mg^{2+} -Ausstromrate, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die 30 mM Mg^{2+} -induzierte Membrandepolarisation.

13.) Thermodynamische Berechnungen zur Stöchiometrie eines möglichen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers zeigen, dass Mg^{2+} nicht passiv über der Zellmembran verteilt ist und dass der Mg^{2+} -Auswärtstransport durch einen Austauscher erfolgen muss, der pro Mg^{2+} mindestens 2 Na^+ transportiert.

14.) Insgesamt lassen die Ergebnisse folgende Schlüsse zu:

- Mg^{2+} gelangt passiv in die CA1-Pyramidenzellen hinein. Hierfür könnten u. a. spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle verantwortlich sein. Die Umkehr des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers ist am Mg^{2+} -Einstrom weitgehend unbeteiligt.
- Mg^{2+} wird aktiv durch einen $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher aus der Zelle heraus transportiert, der mindestens 2 Na^+ gegen 1 Mg^{2+} austauscht.
- Der Mg^{2+} -Ausstrom war in Gegenwart von 15 mM $[\text{Na}^+]_a$ vollständig blockierbar, so dass ein Hinweis auf einen Na^+ -unabhängigen Mechanismus für den Mg^{2+} -Ausstrom fehlt.

6. Literaturverzeichnis

Albitz, R., Magyar, J. & Nilius, B. (1990): Block of single cardiac sodium channels by intracellular magnesium. *Eur. Biophys. J.*, **19**, 19-23

Alger, B.E., Dhanjal, S.S., Dingleline, R., Garthwaite, J., Henderson, G., Lipton, P., North, A., Schwartzkroin, P.A., Sears, T.A., Segal, M., Whittingham, T.S. & Williams, J. (1984): Brain slice methods. In: Dingleline, R. (Ed.): *Brain Slices*, 381-437, *Plenum Press, New York & London*

Allen, S.H. & Wong, K.-P. (1986): The role of magnesium and potassium ions in the molecular mechanism of ribosome assembly: hydrodynamic, conformational, and thermal stability of 16 S RNA from *Escherichia coli* ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**, 137-147

Altschuld, R.A., Jung, D.W., Phillips, R.M., Narayan, P., Castillo, L.C., Whitaker, T.E., Hensley, J., Hohl, C.M. & Brierley, G.P. (1994): Evidence against norepinephrine-stimulated efflux of mitochondrial Mg^{2+} from intact cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, **266**, H 1103-H 1111

Altura, B.M., Altura, B.T. & Gupta, R.K. (1991): Alcohol intoxication results in rapid loss in free magnesium in brain and disturbances in brain bioenergetics: relation to cerebrovasospasm, alcohol-induced strokes, and barbiturate anaesthesia-induced deaths. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 122-135

Alvarez-Leefmans, F.J., Gamiño, S.M. & Rink, T.J. (1984): Intracellular free magnesium in neurones of *Helix aspersa* measured with ion-selective microelectrodes. *J. Physiol. (Lond.)*, **354**, 303-317

Alvarez-Leefmans, F.J., Giraldez, F. & Gamiño, S.M. (1987): Intracellular free magnesium in excitable cells: its measurement and its biologic significance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 915-925

- Amaral, D.G. & Witter, M.P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neurosci.*, **31**, 571-591
- Amler, E. Teisinger, J. & Svoboda, P. (1987): Mg²⁺-induced changes of lipid order and conformation of (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, **905**, 376-382
- Ammann, D. (1986): Ion-Selective Microelectrodes. *Springer Verlag, Berlin*
- Ananth, J. & Yassa, R. (1979): Magnesium in mental illness. *Compr. Psychiatry*, **20**, 475-482
- Askari, A., Huang, W.-H. & McCormick, P.W. (1983): (Na⁺+K⁺)-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **258**, 3453-3460
- Berridge, M.J. & Schlue, W.-R. (1978): Ion-selective electrode studies on the effects of 5-hydroxytryptamine on the intracellular level of potassium in an insect salivary gland. *J. Exp. Biol.*, **72**, 203-216
- Beyenbach, K.W. (1990): Transport of magnesium across biological membranes. *Magnes. Trace Elem.*, **9**, 233-254
- Bijvelds, M.J.C., Flik, G. & Kolar, Z.I. (1998): Cellular magnesium transport in the vertebrate intestine. *Magnes. Res.*, **11**, 315-322
- Bijvelds, M.J.C., Kolar, Z.I., Wendelaar Bonga, S.E. & Flik, G. (1996): Magnesium transport across the basolateral membrane of the fish enterocyte. *J. Membr. Biol.*, **154**, 217-225
- Blanchard, B.J., Konopka, G., Russell, M. & Ingram, V.M. (1997): Mechanism and prevention of neurotoxicity caused by β -amyloid peptides: relation to Alzheimer's disease. *Brain Res.*, **776**, 40-50

Blatter, L.A. (1990): Intracellular free magnesium in frog muscle studied with a new type of magnesium-selective microelectrode: interactions between magnesium and sodium in the regulation of $[Mg^{2+}]_i$. *Pflügers Arch.*, **416**, 238-246

Blatter, L.A. (1991): Estimation of intracellular free magnesium using ion-selective microelectrodes: evidence for a Na/Mg exchange mechanism in skeletal muscle. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 67-79

Bogucka, K. & Woitczak, L. (1971): Intramitochondrial distribution of magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1330-1337

Bogucka, K. & Woitczak, L. (1976): Binding of magnesium by proteins of the mitochondrial intermembrane compartment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 161-167

Bonting, S.L., Swarts, H.P.G., Peters, W.H.M., Schurmans Steckhoven, F.M.A.H. & De Pont, J.J.H.M. (1983): Magnesium induced conformational changes in Na, K-ATPase. *Curr. Top. Membr. Transp.*, **19**, 403-424

Brocard, B.B., Rajdev, S. & Reynolds, I.J. (1993): Glutamate-induced increases in intracellular free Mg^{2+} in cultured cortical neurons. *Neuron*, **11**, 751-757

Brown, K.T. & Flaming, D.G. (1986): Advanced micropipette techniques for cell physiology. In: Smith, A.D. (Ed.): *IBRO Handbook Series 9: Methods in the Neuroscience*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore

Buri, A. & McGuigan, J.A.S. (1990): Intracellular free magnesium and its regulation, studies in isolated ferret ventricular muscle with ion-selective microelectrodes. *Exp. Physiol.*, **75**, 751-761

Buri, A. & McGuigan, J.A.S. (1991): Intracellular free magnesium concentration in ferret heart muscle: Its measurement and its regulation. In: Lasserre B. & Durlach J (Eds.): *Magnesium- A relevant Ion*, 201-204, John Libbey

- Burnashev, N., Monyer, P.H. & Sakman, B. (1992): Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, **8**, 189-198
- Canzoniero, L.M.T., Sensi, S.L. & Choi, D.W. (1997): Measurement of free zinc in living neurones. *Neurobiol. Dis.*, **4**, 275-279
- Cech, S.Y., Broaddus, W.C. & Maguire, M.E. (1980): Adenylate cyclase: the role of magnesium and other divalent cations. *Mol. Cell. Biochem.*, **33**, 67-92
- Cefaratti, C., Romani, A. & Scarpa, A. (1998): Characterisation of two Mg²⁺ transporters in sealed plasma membrane vesicles from rat liver. *Am. J. Physiol.*, **275**, C995-1008
- Cernak, I., Savic, V.J., Kotur, J., Prokic, V., Veljovic, M. & Grbovic, D. (2000): Characterization of plasma magnesium concentration and oxidative stress following graded traumatic brain injury in humans. *J. Neurotrauma*, **17**, 53-68
- Chuang, H., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1997): Regulation of IRK3 inward rectifier K⁺ channel by m1 acetylcholine receptor and intracellular magnesium. *Cell*, **89**, 1121-1132
- Churchill, G.C. & Louis, C.F. (1999): Imaging of intracellular calcium stores in single permeabilized lens cells. *Am. J. Physiol.*, **276**, C426-C434
- Cobbold, P.H. & Rink, T.J. (1987) Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.*, **248**, 313-328
- Cohen, S.M. & Burt, C.T. (1977): ³¹P nuclear magnetic relaxation studies of phosphocreatine in intact muscle: determination of intracellular free magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4271-4275
- Collingridge, G.L. & Singer, W. (1990): Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 290-297

Cox, R.A. & Hirst, W. (1976): A study of the influence of magnesium ions on the conformation of ribosomal ribonucleic acid and on the stability of the large subribosomal particle of rabbit reticulocytes. *Biochem. J.*, **160**, 505-519

Cukierman, S. & Krueger, B.K. (1990): Modulation of sodium channel gating by external divalent cations: differential effects on opening and closing rates. *Eur. Biophys. J.*, **416**, 360-367

De Meis, L. (1991): Fast efflux of Ca^{2+} by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5736-5742

De Weer, P. (1976): Axoplasmatic free magnesium levels and magnesium extrusion from squid giant axons. *J. Gen. Physiol.*, **68**, 159-178

Dhalla, N.S. & Zhao, D. (1988): Cell membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **52**, 1-37

Dierkes, P.W. (1994): Mikrofluorimetrische Untersuchungen zu Verteilung von Glutamat-Rezeptoren in Segmentalganglien des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dierkes, P.W. (1998): Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen des Ca^{2+} -Einstroms durch Ca^{2+} -Kanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren in Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dipolo, R. & Beaugé, L. (1988): An ATP-dependent $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ countertransport is the only mechanism for Mg^{2+} extrusion in squid axons. *Biochim. Biophys. Acta*, **946**, 424-428

Donaldson, B. & Kerrick, G. (1975): Characterization of the effects of Mg^{2+} - and Sr^{2+} -activated tension generation of skinned skeletal muscle fibres. *J. Gen. Physiol.*, **66**, 427-444

- Dunham, E.T. & Glynn, I.M. (1961): Adenosine-triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J. Physiol. (Lond.)*, **156**, 274-293
- Ebel, H. & Günther, T. (1980): Magnesium metabolism: a review. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **18**, 257-270
- Eisenman, G. (1962): Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.*, **2** Supl., 259-323
- Engelender, S. & De Meis, L. (1996): Pharmacological differentiation between intracellular calcium pump isoforms. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 1243-1252
- England, P.J., Denton, R.M. & Randle, P.J. (1967): The influence of magnesium ions and other bivalent metal ions on the aconitase equilibrium and its bearing on magnesium ions by citrate in rat heart. *Biochem. J.*, **105**, 32C-33C
- Fabiato, A. & Fabiato, F. (1975): Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **249**, 497-517
- Féray, J.C. & Garay, R. (1986): A Na⁺-stimulated Mg²⁺ transport system in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **856**, 76-84
- Féray, J.C. & Garay, R. (1987): A one-to-one Mg²⁺:Mn²⁺ exchange in rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5763-5768
- Féray, J.C. & Garay, R. (1988): Demonstration of a Na⁺:Mg²⁺ exchange in human red blood cells by its sensitivity to tricyclic antidepressant drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **338**, 332-337
- Ferguson, W.B. (1991): Competitive Mg²⁺ block of a large-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel in rat skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, **98**, 163-181

- Flatman, P.W. (1981): The magnesium dependence of sodium-pump-mediated sodium-potassium and sodium-sodium exchange in intact human red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **315**, 421-446
- Flatman, P.W. (1991): Mechanisms of magnesium transport. *Annu. Rev. Physiol.*, **53**, 259-271
- Flatman, P.W. & Smith, L.M. (1990): Magnesium transport in ferret red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **431**, 11-25
- Flatman, P.W. & Smith, L.M. (1991): Sodium-dependent magnesium uptake by ferret red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **443**, 217-230
- Focher, F., Verri, A., Maga, G., Spadari, S. & Hübscher, U. (1990): Effect of divalent and monovalent cations of calf thymus PCNA-independent DNA polymerase δ and its 3'→5'exonuclease. *FEBS Letters*, **259**, 349-352
- Frenkel, E.J., Granziani, M. & Schatzmann, H.J. (1989): ATP requirement of the sodium-dependent magnesium extrusion from human red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **414**, 385-397
- Freudenrich, C.C., Murphy, E., Levy, L.A., London, R.E. & Lieberman, M. (1992): Intracellular pH modulates cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells. *Am. J. Physiol.*, **262**, C1024-C1030
- Freund, T.F. & Buzsáki, G. (1996): Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347-470
- Friederich, M.W. & Hagerman, P.J. (1997): The angle between the anticodon and aminoacyl acceptor stems of yeast tRNA^{Phe} is strongly modulated by magnesium ions. *Biochem.*, **36**, 6090-6099

- Fry, C.H. (1986): Measurement and control of intracellular magnesium ion concentration in guinea pig and ferret ventricular myocardium. *Magnes.*, **5**, 306-316
- Fukuda, A. & Prince, D.A. (1992): Excessive intracellular Ca^{2+} inhibits glutamate-induced Na^+ - K^+ pump activation in rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, **68**, 28-35
- Garaschuk, O., Yaari, Y. & Konnerth, A. (1997): Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, **502**, 13-30
- Gloveli, T., Albrecht, D. & Heinemann, U. (1995): Properties of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Dev. Brain Res.*, **87**, 145-152
- Gotoh, H., Kajikawa, M., Kato, H. & Suto, K. (1999): Intracellular Mg^{2+} surge Ca^{2+} increase during depolarisation in cultured neurons. *Brain Res.*, **828**, 163-168
- Gow, I.F., Latham, T., Ellis, D. & Flatman, P.W. (1995): Measurement of intracellular magnesium concentration in myocytes isolated from the septomarginal band of sheep hearts. *Magnes. Res.*, **8**, 223-232
- Graschopf, A., Stadler, J.A., Hoellerer, M.K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S.D. & Schweyen, R.J. (2001): The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg^{2+} homeostasis and is subject to Mg^{2+} -dependent control of its synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16216-16222
- Grubbs, D., Beltz, P.A. & Koss, K.L. (1991): Practical considerations for using mag-fura-2 to measure cytosolic free magnesium. *Magnes. Trace Elem.* **10**, 142-150
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450
- Günther, T. (1981): Biochemistry and pathobiochemistry of magnesium. *Magnes. Bull.*, **1a**, 91-101

- Günther, T. & Vormann, J. (1985): Mg²⁺ efflux is accomplished by an amiloride-sensitive Na⁺/Mg²⁺ antiport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 540-545
- Günther, T. & Vormann, J. (1988): Amiloride-sensitive ²⁸Mg transport into thymocytes. *Magnes. Bull.*, **10**, 91-94
- Günther, T. & Vormann, J. (1990): Characterization of Na⁺-independent Mg²⁺ efflux from erythrocytes. *FEBS Letters*, **271**, 149-151
- Günther, T. & Vormann, J. (1992): Activation of Na⁺/Mg²⁺ antiport in thymocytes by cAMP. *FEBS Letters*, **297**, 132-134
- Günther, T. & Vormann, J. (1995): Reversibility of Na⁺/Mg²⁺ antiport in rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 105-110
- Günther, T., Vormann, J. & Förster, R. (1984a): Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnes. Bull.*, **2**, 77-81
- Günther, T., Vormann, J. & Förster, R. (1984b): Regulation of intracellular magnesium by Mg efflux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 124-131
- Günther, T., Vormann, J. & Averdunk, R. (1986): Characterization of furosemide-sensitive Mg²⁺ influx in Yoshida ascites tumor cells. *FEBS Lett.*, **197**, 197-300
- Günther, T., Vormann, J., Cragoe, E.J., Jr. & Höllriegl, V. (1989): Characterization of Na⁺-dependent and Na⁺-independent Mg²⁺ efflux from erythrocytes by amiloride derivatives. *Magnes. Bull.* **11**, 103-107
- Günther, T., Vormann, J., & Höllriegel, V. (1990): Characterization of Na⁺-dependent Mg²⁺ efflux from Mg²⁺ loaded rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 455-461

- Günther, T., Vormann, J., McGuigan, J.A.S., Lüthi, D. & Gerber, D. (1995): Interaction of polyamines with Mg^{2+} -sensitive macroelectrodes and Mg^{2+} buffers. *Biochem. Molec. Biol. Int.*, **36**, 51-57
- Günzel, D. & Galler, S. (1991): Intracellular Mg^{2+} concentration in skeletal muscle fibres of frog and crayfish. *Pflügers Arch.*, **417**, 446-453
- Günzel, D. & Schlue, W.-R. (1994): Magnesium/sodium exchange in leech Retzius neurones. *Pflügers Arch.*, **426**, R 32
- Günzel, D. & Schlue, W.-R. (1996): Sodium/Magnesium antiport in Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J. Physiol. (Lond.)*, **491**, 595-608
- Günzel, D. & Schlue, W.-R. (1997): Intracellular Mg^{2+} is regulated by 1 Na^+ /1 Mg^{2+} antiport in neurones of an invertebrate central nervous system. *Electrochim. Acta*, **42**, 3207-3215
- Günzel, D. & Schlue, W.-R. (2000): Mechanisms of Mg^{2+} influx, efflux and intracellular „muffling“ in leech neurones and glial cells. *Magnes. Res.*, **13**, 123-128
- Günzel, D., Hintz, K., Durry, S. & Schlue, W.-R. (2002): Organic anion-dependent Mg^{2+} extrusion from leech neurones. *Pflügers Arch.*, **443**, S 240
- Gupta, R.K., Benovic, J.L. & Rose, Z.B. (1978): The determination of the free magnesium level in the human red blood cell by ^{31}P NMR. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6172-6176
- Hall, S.K., Fry, C.H., Buri, A. & McGuigan, J.A.S. (1992): Use of ion-sensitive microelectrodes to study intracellular free magnesium concentration and its regulation in mammalian cardiac muscle. *Magnes. Trace Elem.*, **10**, 80-89
- Handy, R.D., Gow, I.F., Ellis, D. & Flatman, P.W. (1996): Na^+ -dependent regulation of intracellular free magnesium concentration in isolated rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **28**, 1641-1651

Harris, E.J. (1972): Transport and Accumulation in Biological Systems. *Butterworths, London*

Haugland, R.P. (1999): Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 7th Edition, *Molecular Probes, Inc., Eugene, Or, USA*

Heinemann, U., Lux, H.D. & Gutnick, M.J. (1977): Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res.*, **27**, 237-243

Hintz, K. (1999): Elektrophysiologische Charakterisierung der Mg²⁺-Regulation bei identifizierten Neuronen und Neuropil-Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hochstrate, P. & Schlue, W.-R. (2001): The ouabain-induced [Ca²⁺]_i increase in leech Retzius neurones is mediated by voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Brain Res.*, **892**, 248-254

Hochstrate, P., Piel, C. & Schlue, W.-R. (1995): Effect of extracellular K⁺ on the intracellular free Ca²⁺ concentration in leech glial cells and Retzius neurones. *Brain Res.*, **696**, 231-241

Hofer, A.M. & Machen, T.E. (1993): Technique for *in situ* measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator magfura-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2598-2602

Hofer, A.M., Schlue, W.-R., Curci, S. & Machen, T.E. (1995): Spatial distribution and quantitation of free luminal [Ca] within the InsP₃-sensitive internal store of individual BHK-21 cells: ion dependence of InsP₃-induced Ca release and reloading. *FASEB J.*, **9**, 788-798

- Hofer, A.M., Landolfi, B., Debellis, L., Pozzan, T. & Curci, S. (1998): Free $[Ca^{2+}]$ dynamics measured in agonist-sensitive stores of single living intact cells: a new look at the refilling process. *EMBO J.*, **17**, 1986-1995
- Horie, M. & Irisawa, H. (1989): Dual effects of intracellular magnesium on muscarinic potassium channel current in single guinea-pig atrial cell. *J. Physiol. (Lond.)*, **408**, 313-332
- Horie, M., Irisawa, H. & Noma, A. (1987): Voltage-dependent magnesium block of adenosine-trisphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **387**, 251-272
- Horlitz, M. & Klaff, P. (2000): Gene-specific trans-regulatory functions of magnesium for chloroplast mRNA stability in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35638-35645
- Hou, T.T. & Johnson, J.A. (1989): Mg^{2+} and Ca^{2+} dissociation rates from parvalbumin at 0°C: implications for the role of parvalbumin in skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, **418**, 120
- Irving, M., Moylie, J., Sizto, N.L. & Chandler, W.K. (1987): Simultaneous monitoring of changes in magnesium and calcium concentration in frog cut twitch fibres containing anti-pyrylazo II. *J. Gen. Physiol.*, **93**, 585-608
- Isaacson, R.L. (1987): Hippocampus. In: *Encyclopaedia of Neuroscience*, 492-495. *Birkhäuser, Basel*
- Kato H., Gotho, H., Kajikawa, M. & Suto, K. (1997): Depolarization triggers intracellular magnesium surge in cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.*, **779**, 329-333
- Kennedy, H.J. (1998): Intracellular Mg^{2+} regulation in voltage-clamped *Helix aspersa* neurones measured with mag-fura-2 and Mg^{2+} -sensitive microelectrodes. *Exp. Physiol.*, **83**, 449-460

- Kerrick, W.L.G. & Donaldson, B. (1972): The effects of Mg^{2+} on submaximum Ca^{2+} -activated tension in skinned fibres of frog skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 117-122
- Kirov, G.K. & Tsachev, K.N. (1990): Magnesium, schizophrenia and manic-depressive disease. *Neuropsychobiol.*, **23**, 79-81
- Kirschenlohr, H.L., Metcalfe, J.C., Morris, P.G., Rodrigo, G.C. & Smith, G.A. (1988): Ca^{2+} transient, Mg^{2+} , and pH measurements in the cardiac cycle by ^{19}F -NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9017-9021
- Knöpfel, T. & Gähwiler, B.H. (1992): Activity-induced elevations of intracellular calcium concentration in pyramidal and nonpyramidal cells of the CA3 region of rat hippocampal slice cultures. *J. Neurophysiol.*, **68**, 961-963
- Konishi, M., Hollingworth, S., Harkins, A.B. & Baylor, S.M. (1991): Myoplasmic calcium transients in intact frog skeletal muscle fibres monitored with the fluorescent indicator fura-2. *J. Gen. Physiol.*, **97**, 271-301
- Koss, K.L., Putman, R.W. & Grubbs, R.D. (1993): Mg^{2+} buffering in cultured chick ventricular myocytes: quantitation and modulation. *Am. J. Physiol.*, **264**, C1259-C1269
- Krugers, H.J., Maslam, S., Korf, J. & Joels, M. (2000): The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. *Stroke*, **31**, 1162-1172
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. & Häussinger, D. (1998): Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247-306
- Leonard-Marek, S., Gabel, G. & Martens, H. (1998): Effects of short chain fatty acids and carbon dioxide on magnesium transport across sheep rumen epithelium. *Exp. Physiol.*, **83**, 155-164

- Leschinger, A. (1994): Elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften der Hoch-K⁺-Epilepsie im Hippokampus der Ratte. Dissertation, Universität Köln
- Lin, F., Conti, F. & Moran, O. (1991): Competitive blockage of sodium channel by intracellular magnesium ions in central mammalian neurones. *Eur. Biophys. J.*, **19**, 109-118
- Lüdi, H. & Schatzmann, H.J. (1987): Some properties of a system for sodium-dependent outward movement of magnesium from metabolizing human red blood cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **390**, 367-382
- Lux, H.D. & Neher, E. (1973): The equilibration time course of [K⁺]_o in cat cortex. *Exp. Brain Res.*, **17**, 190-205
- Maguire, M.E. (1984): Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.*, **5**, 73-77
- Maguire, M.E. (1987): Hormonal regulation of magnesium uptake: Differential coupling of membrane receptors to magnesium uptake. *Magnes.*, **6**, 180-191
- Maguire, M.E. (1990): Magnesium: A regulated and a regulatory cation. In: Sigel, H. & Sigel, A. (Eds.): *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. **26**, 135-153, Marcel Dekker Inc. New York, Basel
- Matsuda, H., Saigusa, A. & Irisawa, H. (1987): Ohmic conductance through the inwardly rectifying K⁺ channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature*, **325**, 156-159
- McLean, R.M. (1994): Magnesium and its therapeutic use: a review. *Am. J. Med.*, **96**, 63-76
- McGuigan, J.A.S., Blatter, L.A. & Buri, A. (1991): Use of ion selective microelectrodes to measure intracellular free Mg²⁺. In: Strada, P., Carbone, E. (Eds.): *Mg²⁺ and Excitable Membranes.*, 1-19, Springer Verlag, Berlin

- Memon, Z.I., Altura, B.T., Benjamin, J.L., Cracco, R.Q. & Altura, B.M. (1995): Predictive value of serum ionised but not total magnesium levels in head injuries. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **55**, 671-677
- Minta, A. & Tsien, R.Y. (1989): Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19449-19457
- Mittmann, T., Linton, S., Schwindt, P. & Crill, W. (1997): Evidence for persistent Na⁺ current in apical dendrites of rat neocortical neurons from imaging of Na⁺-sensitive dye. *J. Neurophysiol.*, **78**, 1188-1192
- Mody, I., Lambert, J.D.C. & Heinemann, U. (1987): Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, **57**, 869-888
- Molnar, J., Sohar, I., Kovacs, J., Rakonczay, Z. & Rausch, H. (1993): Effects of tricyclic compounds on membrane binding of bivalent cations, activities of acetylcholinesterase and some tissue proteases. *In Vivo*, **7**, 431-434
- Montes, J.G., Sjodin, R.A., Yergey, A.L. & Vieira, N.E. (1989): Simultaneous bi-directional ion flux measurements in barnacle muscle fibres by mass spectrometry. *Biophys. J.*, **56**, 437-446
- Montes, J.G., Sjodin, R.A., Wu, Y.K., Chen, J.S., Yergey, A.L. & Vieira, N.E. (1990): Regulation of potassium and magnesium effluxes by external magnesium in barnacle muscle fibres. *Magnes. Res.*, **3**, 239-248
- Mooren, F.C., Turi, S., Günzel, D., Schlue, W.-R., Domschke, W., Singh, J. & Lerch, M.M. (2001): Calcium-magnesium interactions in pancreatic acinar cells. *FASEB J.*, **15**, 659-672
- Muir, K.W. (2001): Magnesium for neuroprotection in ischaemic stroke: rationale for use and evidence of effectiveness. *CNS Drugs*, **15**, 921-930

- Müller, A. (2000): Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung der Wirkung glutamaterger Stimulation auf Mg^{2+} -Einstrom und Mg^{2+} -Regulation in Retzius-Neuronen des Bluteigel-Zentralnervensystems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Mullins, P.G.M. & Vink, R. (1995): Chronic alcohol exposure decreases brain intracellular free magnesium concentration in rats. *NeuroReport*, **6**, 1633-1636
- Murphy, E. (2000): Mysteries of magnesium homeostasis. *Circ. Res.*, **86**, 245-248
- Nakatani, K. & Yau, K.W. (1988): Calcium und magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *J. Physiol. (Lond.)*, **395**, 695-729
- Nakayama, S. & Nomura, H. (1995): Mechanisms of intracellular Mg^{2+} regulation affected by amiloride and ouabain in the guinea-pig taenia caeci. *J. Physiol. (Lond.)*, **488**, 1-12
- Nakayama, S. & Tomita, T. (1991): Regulation of intracellular free magnesium concentration in the taenia of guinea-pig caecum. *J. Physiol. (Lond.)*, **435**, 559-572
- Nanninga, L.B. (1961): Calculation of free magnesium, calcium and potassium in muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 338-344
- Neher, E. & Zucker, R.S. (1993): Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, **10**, 21-30
- Nishimura, H., Matsubara, T., Ikoma, Y., Nakayama, S. & Sakamoto, N. (1993): Effects of prolonged application of isoprenaline on intracellular free magnesium concentration in isolated heart of rat. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 443-448

- Odgen, D., Khodakhah, K., Carter, T., Thomas, M. & Capiod, T. (1995): Analogue computation of transient changes of intracellular free Ca^{2+} concentration with the low affinity Ca^{2+} indicator fura-2 during whole-cell patch-clamp recording. *Pflügers Arch.*, **429**, 587-591
- Ödholm, M.P. & Handy, R.D. (1999): A novel DIDS-sensitive, anion-dependent Mg^{2+} efflux pathway in rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 334-337
- Parker, J.C., Gitelman, H.J. & McManus, T.J. (1989): Role of magnesium in the activation of Na-H exchange in dog red cells. *Am. J. Physiol.*, **257**, C1038-C1041
- Pearson, H.A. & Dolphin, A.C. (1993): Inhibition of ω -conotoxin-sensitive Ca^{2+} -channel currents by internal Mg^{2+} in cultured rat cerebral granule neurons. *Eur. Biophys. J.*, **425**, 518-527
- Prescott, A.R., Comerford, J.G., Magrath, R., Lamb, N.J.C. & Warn, R.M. (1988): Effects of ligated intracellular magnesium on cytoskeletal integrity. *J. Cell Sci.*, **89**, 321-329
- Preston, R.R. (1990): A magnesium current in *Paramecium*. *Science*, **250**, 285-288
- Quamme, G.A. & Dai, L.-J. (1990): Presence of a novel Mg^{2+} influx pathway in MDCK cells. *Am. J. Physiol.*, **259**, C521-C525
- Quamme, G.A. & Rabkin, S.W. (1990): Cytosolic free magnesium in cardiac myocytes: identification of a Mg^{2+} influx pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 1406-1412
- Rajdev, S. & Reynolds, I.J. (1995): Calcium influx but not pH or ATP level mediates glutamate-induced changes in intracellular magnesium in cortical neurons. *J. Neurophysiol.*, **3**, 942-949

- Raju, B., Murphy, E., Louis, A.L., Hall, R.D. & London, R.E. (1989): A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Am. J. Physiol.*, **256**, C540-C548
- Rasgado-Flores, H. & Gonzales-Serratos, H. (1990): Evidence for Na⁺/K⁺/Mg exchange in squid giant axons. *Biophys. J.*, **57**, 187a
- Reid, S.S. & Cowan, J.A. (1990): Biostructural chemistry of magnesium ion: characterization of the weak binding sites on tRNA^{Phe} (yeast). Implications for conformational change and activity. *Biochem.*, **29**, 6025-6032
- Richerson, G.B. & Messer, C. (1995): Effect of composition of experimental solutions on neuronal survival during brain slicing. *Exp. Neurol.*, **131**, 133-143
- Robbins, J., Cloues, R. & Brown, D.A. (1992): Intracellular Mg²⁺ inhibits IP₃-activated I_{K(Ca)} in Ng108-15 cells. [Why intracellular citrate can be useful for recording I_{K(Ca)}]. *Eur. Biophys. J.*, **420**, 347-353
- Roden, K. (1998): Untersuchung der Membranpotential-Abhängigkeit des Mg²⁺-Einstroms in Retzius-Neuronen des Blutegels *Hirudo medicinalis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Romani, A. & Scarpa, A. (1990): Hormonal control of Mg²⁺ transport in the heart. *Nature*, **364**, 841-844
- Romani, A. & Scarpa, A. (1992): cAMP control of Mg²⁺ homeostasis in heart and liver cells. *Magnes. Res.*, **5**, 131-137
- Romani, A., Dowell, E. & Scarpa, A. (1991): Cyclic AMP-induced Mg²⁺ release from rat liver hepatocytes, permeabilized hepatocytes, and isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24376-24384
- Romani, A., Marfella, C. & Scarpa, A. (1993): Hormonal stimulation of Mg²⁺ uptake in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15489-15495

- Rose, C.R. & Ransom, B.R. (1997): Regulation of intracellular sodium in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.(Lond.)*, **499**, 573-587
- Sabatini, B.L. & Regehr, W.G. (1998): Optical measurement of presynaptic calcium currents. *Biophys. J.*, **74**, 1549-1563
- Sachs, J.R. (1988): Interaction of magnesium with the sodium pump of the human red cell. *J. Physiol. (Lond.)*, **400**, 575-591
- Sachs, L. (1992): Angewandte Statistik. *Springer Verlag, Berlin*
- Sanui, H. & Rubin, H. (1982): Atomic absorption measurements of cations in cultured cells. In: Boynton, A.L. (Ed.): *Ions, Cell Proliferation and Cancer*, 41-52, *Acad. Press, New York*
- Sasaki, N., Oshima, T., Yoshimura, M., Yashika, M., Higashi, Y., Ishioka, N., Nakano, Y., Kojima, R., Kambe, M. & Kajiyama, G. (1997): Lack of effect of transmembrane gradient of magnesium and sodium on regulation of cytosolic magnesium concentration in rat lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1329**, 169-173
- Scarpa, A. (1974): Indicators of free magnesium in biological systems. *Biochem.*, **13**, 2789-2794
- Scharrer, E. & Lutz, T. (1990): Effects of short chain fatty acids and K on absorption of Mg and other cations by the colon and caecum. *Z. Ernährungswiss.*, **29**, 162-168
- Schoppe, J. (2000): Funktionelle Eigenschaften und Verteilungsmuster Koffein-sensitiver Ionenkanäle in den Segmentalganglien des medizinischen Blutegels. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schulte, P. (1997): Elektrophysiologische Charakterisierung des Mg²⁺-Einstroms in Retzius-Neuronen des Blutegels *Hirudo medicinalis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Schweigel, M., Vormann, J. & Martens, H. (2000): Mechanisms of Mg^{2+} transport in cultured ruminal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **278**, G400-G408
- Seelig, M.S. & Elin, R.J. (1996): Is there a place for magnesium in the treatment of acute myocardial infarction? *Am. Heart J.*, **132**, Supl., 471-477
- Sekhon, M.B., Spence, I., Morgan, M.K. & Weber, N.C. (1997): Chronic cerebral hypoperfusion inhibits calcium-induced long-term potentiation in rats. *Stroke*, **28**, 1043-1048
- Seki, G., Coppola, S. & Frömter, E. (1993): The Na^+ - HCO_3^- cotransporter operates with a coupling ratio of 2 HCO_3^- to 1 Na^+ in isolated rabbit renal proximal tubule. *Pflügers Arch.*, **425**, 409-416
- Shaul, O., Hilgemann, D.W., de-Almeida, J., van Montagu, M., Inzé, D. & Galili, G. (1999): Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^+ exchanger. *EMBO J.*, **18**, 3973-3980
- Sills, M.A. & Loo, P.S. (1989): Tricyclic antidepressants and dextromethophan bind with higher affinity to the phencyclidine receptor in the absence of magnesium and L-glutamate. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 60-65
- Skou, J. (1957): The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394-401
- Skou, J. (1960): Further investigations on a $(Mg^{2+}+Na^+)$ -activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 6-23
- Smetana, R. (1997): Cardiovascular medicine – the importance of magnesium in coronary artery disease and acute myocardial infarction. In: Smetana, R. (Ed.): *Advances in Magnesium Research.*, 5-11, John Libbey, London

- Smith, R.L. & Maguire, M.E. (1998): Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Molec. Microbiol.*, **28**, 217-226
- Somlyo, A.V., Gonzales-Serratos, H., Shuman, H., McClellan, G. & Somlyo, A.P. (1981): Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron-probe study. *J. Cell. Biol.*, **90**, 577-594
- Somlyo, A.V., McClellan, G., Gonzales-Serratos, H. & Somlyo, A.P. (1985): Electron probe x-ray microanalysis of post-tetanic Ca^{2+} and Mg^{2+} movements across the sarcoplasmic reticulum *in situ*. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6801-6807
- Spichiger, U.E. & Fakler, A. (1997): Potentiometric microelectrodes as sensors and detectors. Magnesium-selective electrodes as detectors for histamine in capillary electrophoresis. *Electrochim. Acta*, **42**, 3137-3145
- Spremulli, L. & Kraus, B.L. (1987): Bovine mitochondrial ribosomes: effects of cations and heterologous dissociation factors on subunit interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1077-1081
- Stout, A.K., Li-Smerin, Y., Johnson, J.W. & Reynolds, J. (1996): Mechanisms of glutamate-stimulated Mg^{2+} influx and subsequent Mg^{2+} efflux in rat forebrain neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)*, **492**, 641-657
- Takahashi, K. & Akaike, N. (1991): Calcium antagonists effects on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1-pyramidal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 169-175
- Takahashi, K., Wakamori, M. & Akaike, N. (1989): Hippocampal CA1-pyramidal cells of rats have four voltage-dependent calcium conductances. *Neurosci. Lett.*, **104**, 229-234
- Tanaka, E., Yamamoto, S., Inokuchi, H., Isagai, T. & Higashi, H. (1999): Membrane dysfunction induced by *in vitro* ischemia in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **81**, 1872-1880

- Tashiro, M. & Konishi, M. (1997): Na⁺ gradient-dependent Mg²⁺ transport in smooth muscle cells of guinea pig taenia caecum. *Biophys. J.*, **73**, 3371-3384
- Tashiro, M. & Konishi, M. (2000): Sodium gradient-dependent transport of magnesium in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **279**, C1955-C1962
- Tashiro, M., Konishi, M., Iwamoto, T., Shigekawa, M. & Kurihara, S. (2000): Transport of magnesium by two isoforms of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger expressed in CCL39 fibroblasts. *Pflügers Arch.*, **440**, 819-828
- Tohda, M., Urushihara, H. & Nomura, Y. (1995): Inhibitory effects of antidepressants on NMDA-induced currents in *Xenopus* oocytes injected with rat brain RNA. *Neurochem. Int.*, **26**, 53-58
- Tongyai, S., Rayssiguier, Y., Motta, C., Gueux, E., Maurois, P. & Heaton, F.W. (1989): Mechanism of increased erythrocyte membrane fluidity during magnesium deficiency in weanling rats. *Am. J. Physiol.*, **257**, C270-C276
- Triebel, H., Mickwitz, C.U.V., Bär, H. & Burckhardt, G. (1988): Mg²⁺-induced transition to strongly co-operative binding of histone H 1 to linear DNA. *Int. J. Biol. Macromolec.*, **10**, 322-328
- Tsien, R.Y. (1989): Fluorescent probes of cell signalling. *Ann. Rev. Neurosci.*, **12**, 227-253
- Vink, R. & Cernak, I. (2000): Regulation of intracellular free magnesium in central nervous system injury. *Biosci.*, **5**, d656-d665
- Vink, R., McIntosh, T.K., Demediuk, P. & Faden, A.I. (1987): Decrease in total and free magnesium concentration following traumatic brain injury in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 594-599
- Wacker, W.E.C. (1980): Magnesium and Man. *Harvard University Press, Cambridge, MA*

- Walker G.M. (1986): Magnesium and cell cycle control: an update. *Magnes.*, **5**, 9-23
- Walker, G.M. & Duffus, J.H. (1980): Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. *J. Cell Sci.*, **42**, 329-356
- Walser, M. (1967): Magnesium metabolism. *Ergebn. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.*, **59**, 85-296
- Welch, K.M.A. & Ramadan, N.M. (1995): Mitochondria, magnesium and migraine. *J. Neurol. Sci.*, **134**, 9-14
- White, R.E. & Hartzell, H.C. (1989): Magnesium ions in cardiac function. Regulator of ion channels and second messengers. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 859-867
- Whittington, M.A., Traub, R.D. & Jefferys, J.G.R. (1995): Erosion of inhibition contributes to the progression of low magnesium bursts in rat hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond.)*, **486**, 723-734
- Widmer, J., Bovier, P., Karege, F., Raffin, Y., Hilleret, H., Gaillard, J.-M. & Tissot, R. (1992): Evolution of blood magnesium, sodium and potassium in depressed patients followed for three month. *Neuropsychobiol.*, **26**, 173-179
- Wolf, F.I., Di Francesco, A., & Cittadini (1994): Characterization of magnesium efflux from Ehrlich ascites tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 335-341
- Wolf, F.I., Di Francesco, A., Covacci, V., Corda, D. & Cittadini, A. (1996): Regulation of intracellular magnesium in ascites cells: involvement of different regulatory pathways. *Arch. Biochem. Biophys.*, **331**, 194-200
- Wolf, F.I., Di Francesco, A., Covacci, V. & Cittadini (1997): Regulation of magnesium efflux from rat spleen lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **344**, 397-403

Wu, J.Y. & Lipsius, S.L. (1990): Effects of extracellular Mg^{2+} on T- and L-type Ca^{2+} currents in single atrial myocytes. *Am. J. Physiol.*, **259**, H1842-H1850

Wu, S.T., Pieper, G.M., Salhani, J.M. & Eliot, R.S. (1981): Measurement of free magnesium in perfused and ischemic arrested heart muscle. A quantitative phosphorus-31 nuclear magnetic resonance and multiequilibria analysis. *Biochem.*, **20**, 7399-7403

Yamamoto, S., Tanaka, E., Shoji, Y., Kudo, Y., Inokuchi, H. & Higashi, H. (1997): Factors that reverse the persistent depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, **78**, 903-911

Zsurka, G., Gregaň, J. & Schweyen, R.J. (2001): The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter. *Genomics*, **72**, 158-16

7. Abbildungen

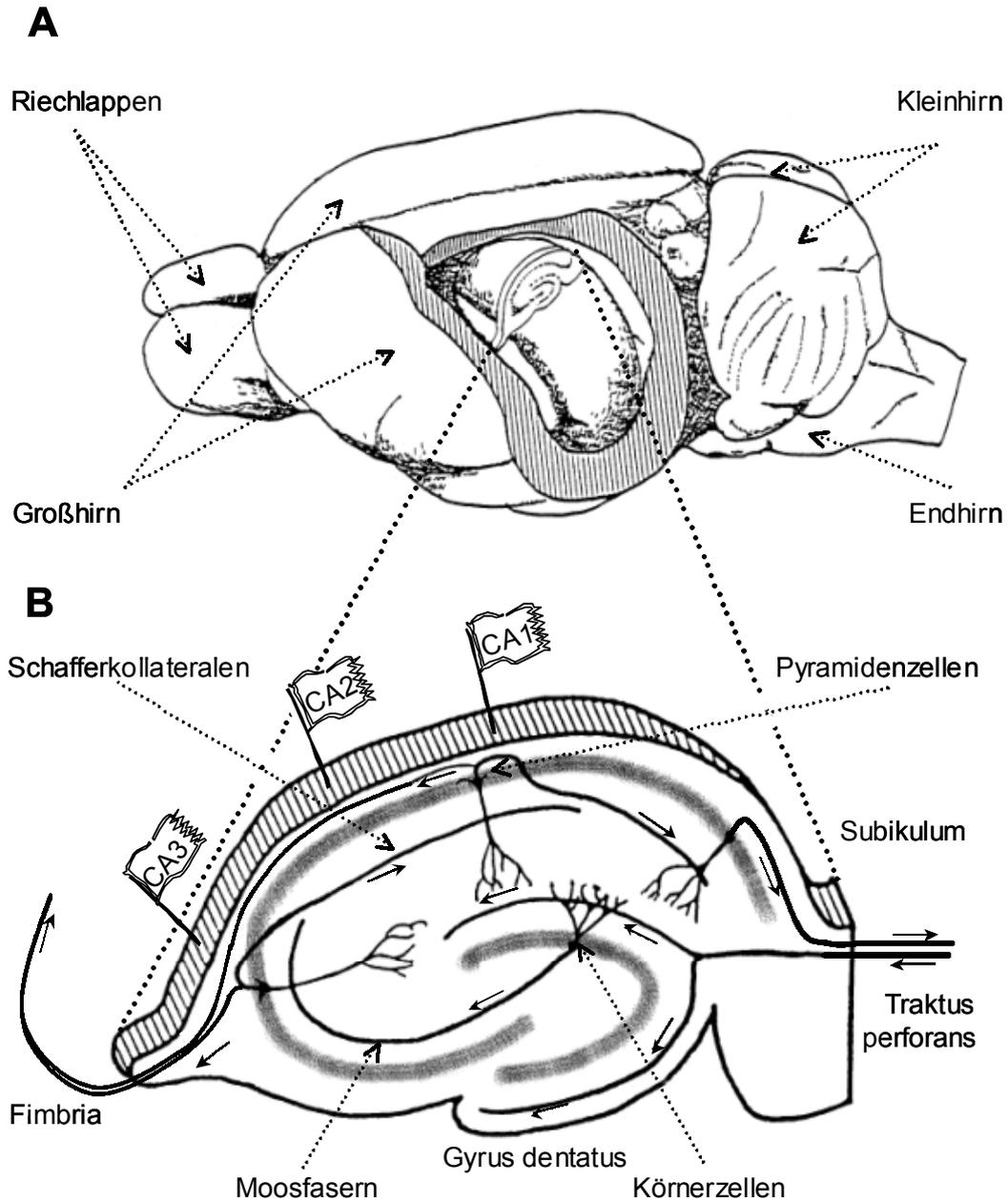


Abb. 1: Schematische Darstellung der Außenansicht eines Rattengehirnes (A) und eines Schnittpräparates des Rattenhippocampus (B).

A) Die Oberfläche der Großhirnhemisphären ist glatt und zeigt nicht die für höhere Säugetiere typischen Furchen und Windungen. Die linke Großhirnhemisphäre ist eröffnet und gibt den Blick auf den Hippocampus frei. Im vorderen Bereich sind die Riechlappen, im hinteren Bereich das Kleinhirn zu sehen. Unterhalb des Kleinhirns schließt das in das Rückenmark übergehende Endhirn an. **B)** Die hippocampale Formation umfasst Subikulum, Gyrus dentatus und Hippocampus (Cornu ammonis). Der Hippocampus wird aufgrund histologischer Eigenschaften in die Regionen CA1, CA2 und CA3 unterteilt. Die wichtigsten Neuronentypen und Faserbahnen sind eingezeichnet. Die Richtung des Erregungsflusses ist durch Pfeile angedeutet (verändert nach Amaral & Witter 1989).

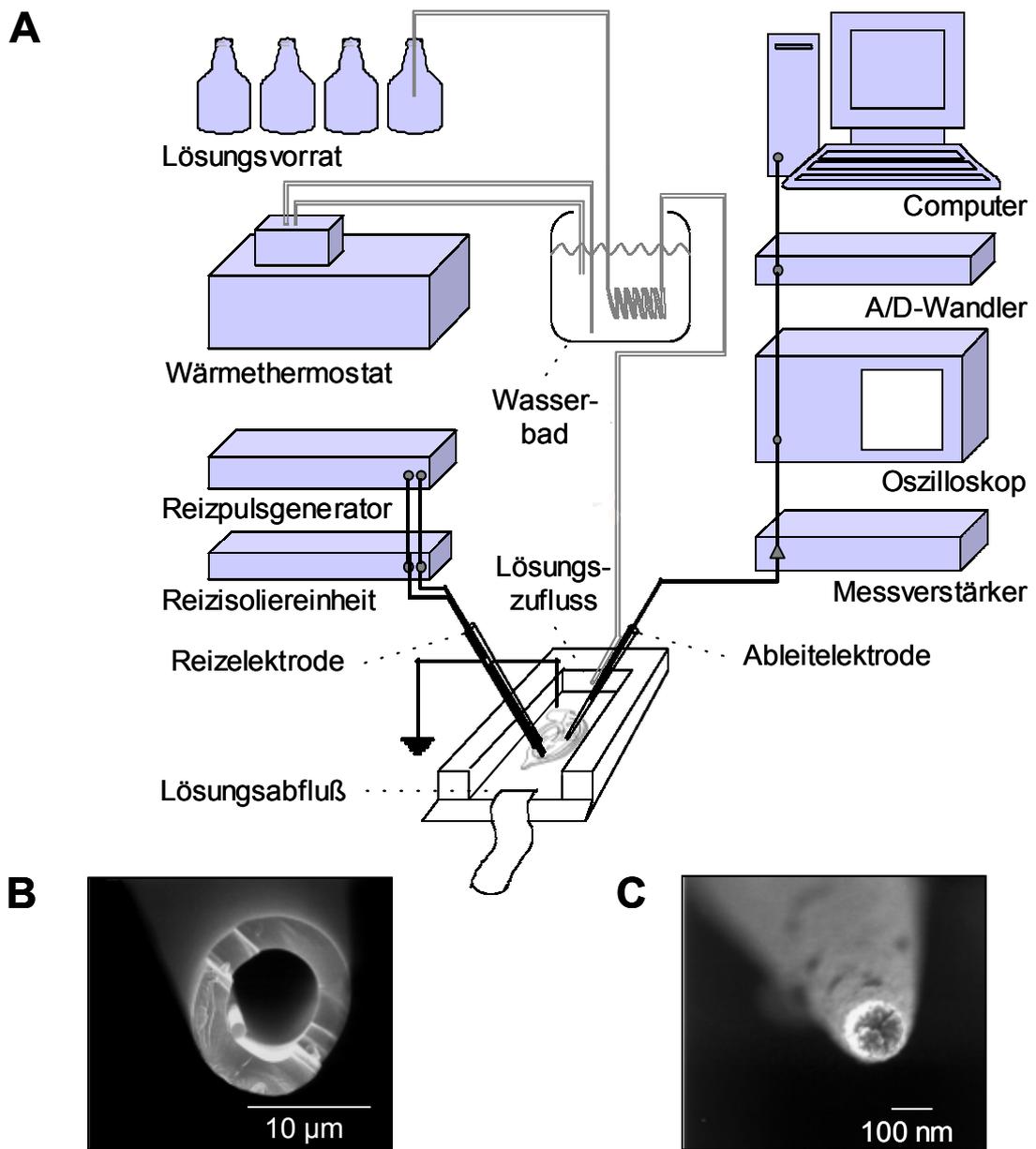


Abb. 2: Versuchsaufbau zur Ableitung von Feldpotentialen und von E_m sowie zur iontophoretischen Farbstoffinjektion.

A) Die Reizelektrode war über eine Reizisoliereinheit mit einem Reizpuls-generator verbunden. Das Signal der Ableitelektrode wurde über einen Messverstärker einem Oszilloskop und nach Analog-Digital-Wandlung einem Computer zugeleitet. Bei der intrazellulären Ableitung von E_m und der iontophoretischen Farbstoffinjektion wurde die extrazelluläre Reizanordnung nicht verwendet. B) Spitze einer abgebrochenen Glasmikroelektrode, \varnothing : etwa 7 μm . C) Spitze einer konventionellen Glasmikroelektrode, \varnothing : < 0,1 μm . Da für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Goldbeschichtung der Elektrodenspitzen notwendig war, ist die Spitzenöffnung in C nicht zu sehen.

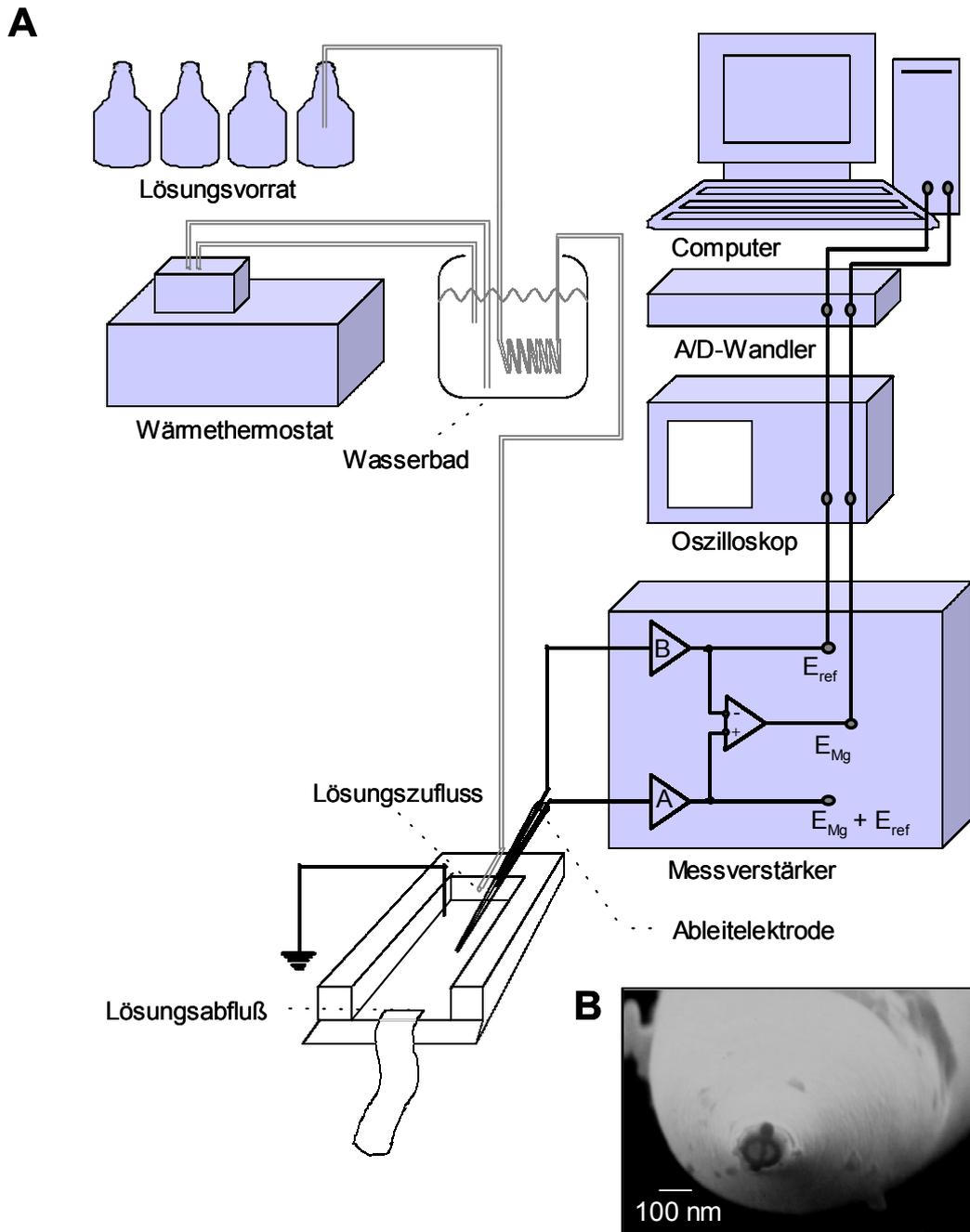


Abb. 3: Versuchsaufbau für Experimente mit Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektroden.

A) Der Mg^{2+} -sensitive Kanal der Ableitelektrode registrierte die Summe aus Mg^{2+} -Potential (E_{Mg}) und Referenzpotential (E_{ref}) und war mit dem hochohmigen Eingang A des Differenzverstärkers verbunden, während der Referenzkanal zur Messung von E_{ref} mit dem niederohmigen Eingang B verschaltet war. Wurde E_{ref} durch Differenzverstärkung vom Summenpotential subtrahiert, ergab sich E_{Mg} . **B)** Die Aufsicht auf die Spitze der Theta-Glasmikroelektrode zeigt zwei getrennte Kanäle, zur separaten Ableitung der Messparameter.

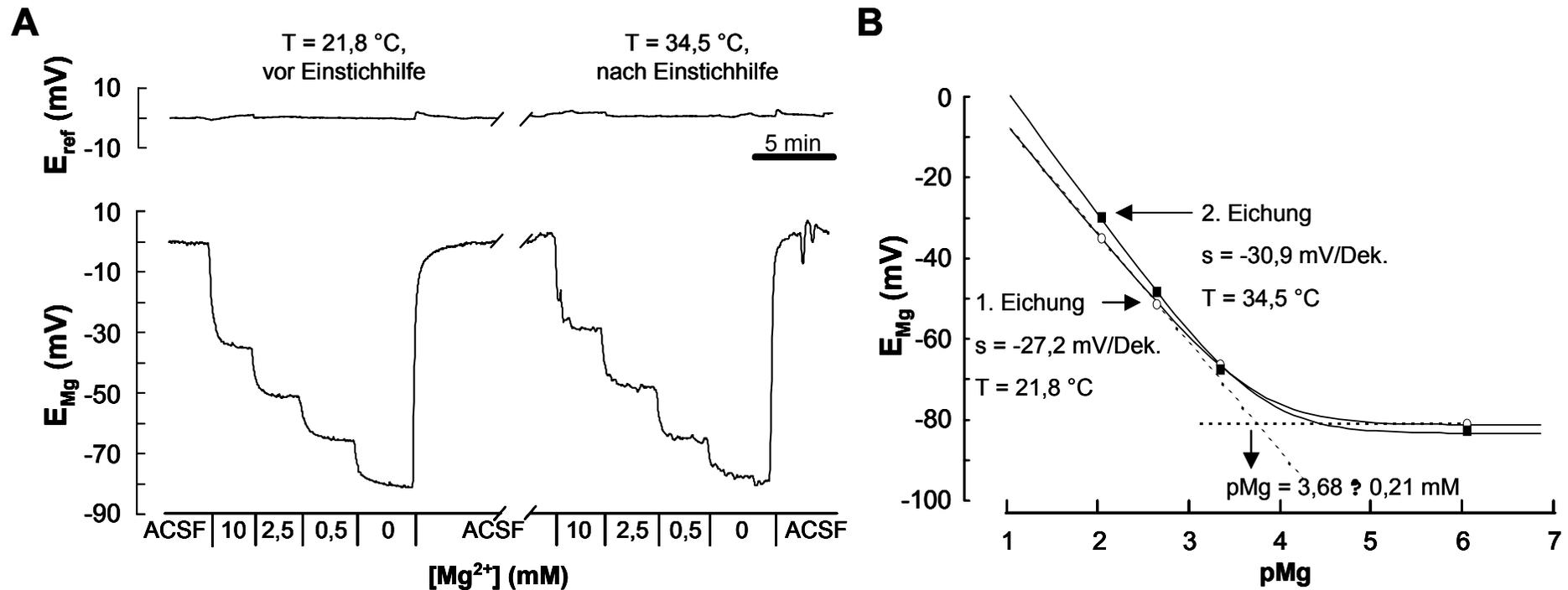


Abb. 4: Registrierbeispiel der Eichung einer Mg^{2+} -sensitiven Glasmikroelektrode (A) und resultierende Eichkurven (B).

A) Die oberen Spuren zeigen das Potential des Referenzkanals, die unteren Spuren das Potential des Mg^{2+} -sensitiven Kanals nach Subtraktion des Referenzpotentials. Nach der 1. Eichung bei Raumtemperatur (21,8 °C), wurde die elektrische Einstichhilfe mehrfach für etwa 2 s aktiviert. Danach wurde die Glasmikroelektrode erneut geeicht, diesmal bei einer Temperatur von 34,5 °C. Der Thermostat führte leider zu erheblichen elektrischen Störungen am hochohmigen Eingang des Messverstärkers. **B)** Die in der 1. Eichung (offene Kreise) und 2. Eichung (gefüllte Quadrate) bestimmten Ionenpotentiale (E_{Mg}) wurden gegen den negativen dekadischen Logarithmus der Mg^{2+} -Konzentration der Eichlösungen (pMg) aufgetragen. Die durchgezogenen Kurven stellen die Anpassung der Messdaten mit der Nicolsky-Eisenman-Gleichung dar. Das Detektionslimit ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Asymptoten der Eichkurve (nur für die 1. Eichung als unterbrochene Linien eingezeichnet) und lag bei 0,21 mM (1. Eichung) bzw. 0,20 mM (2. Eichung). Die maximalen Steigungen s der Eichkurven betrugen -27,2 mV/Dekade (1. Eichung) und -30,9 mV/Dekade (2. Eichung).

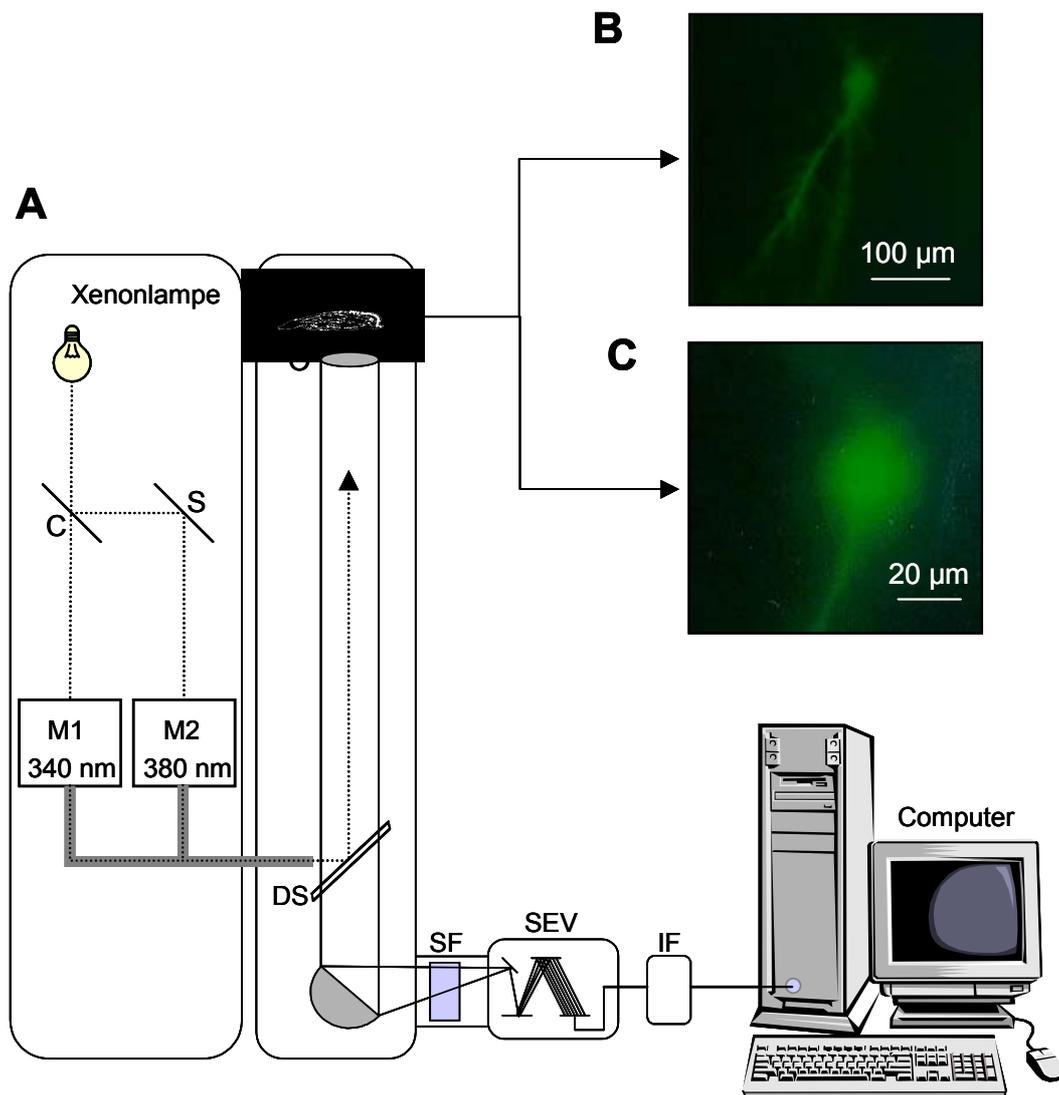


Abb. 5: Versuchsaufbau zur mikrofluorimetrischen Bestimmung $[Mg^{2+}]_i$ bzw. $[Ca^{2+}]_i$.

A) Das Licht der Xenonlampe wurde mittels des Choppers (C) und eines Spiegels (S) alternierend den beiden Monochromatoren (M1, M2) zugeführt. Das aus den Monochromatoren austretende Anregungslicht (gestrichelte Linien) gelangte über einen Quarzlichtleiter ins Mikroskop, wo es über einen dichroitischen Spiegel (DS) und ein Objektiv (O) zum Präparat geleitet wurde. Das vom Präparat ausgestrahlte Fluoreszenzlicht (durchgezogene Linien) wurde vom Objektiv gesammelt und über den dichroitischen Spiegel und ein Sperrfilter (SF; BA 510/540 nm) zum Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) geleitet. Das SEV-Signal wurde über ein Interface (IF) einem Computer zugeleitet. **B)** Fluoreszierende CA1-Pyramidenzelle bei 100-facher Vergrößerung. Zellkörper und Dendritenbaum sind deutlich zu erkennen (Fluoreszenzanregung mit Blaulicht (BG12+BG3), Sperrfilter BA510/540). **C)** Dasselbe Neuron bei 400-facher Vergrößerung und Fokussierung auf den Zellkörper.

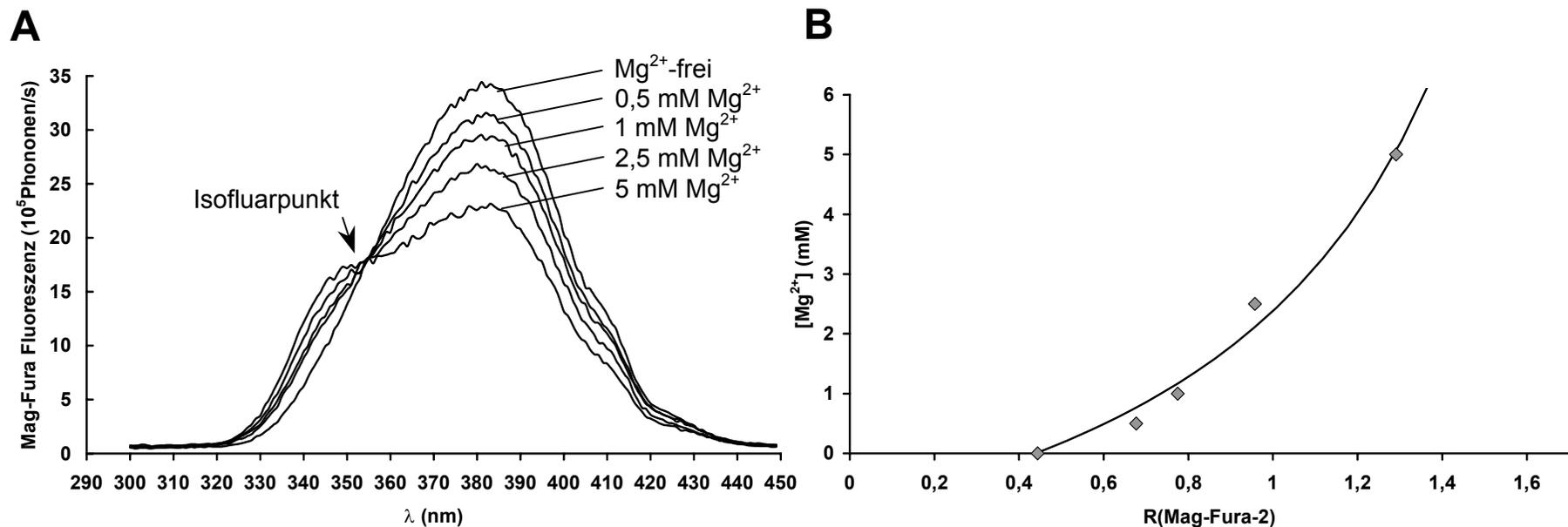


Abb. 6: Eichung von Mag-Fura-2.

A) *In vitro*-Anregungsspektren von Mag-Fura-2 in Anwesenheit verschiedener Mg²⁺-Konzentrationen, aufgenommen mit demselben Mikrofluorimeter, mit dem auch [Mg²⁺]_i bestimmt wurde (siehe Abb. 5). Die Fluoreszenzemission wurde zwischen 510 nm und 540 nm gemessen. Die Eichlösungen enthielten 100 μ M Mag-Fura-2 in 125 mM KCl und 10 mM HEPES (pH 7,0) sowie die angegebenen Mg²⁺-Konzentrationen. Die Mg²⁺-freie Lösung enthielt zusätzlich 10 mM EGTA. Die Bindung von Mg²⁺ an Mag-Fura-2 führte zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums zu kürzeren Wellenlängen. Der Isofluarpunkt lag bei 354 nm (Pfeil). Die Messung von [Mg²⁺]_i erfolgte bei alternierender Anregung mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm. **B)** Die Eichkurve nach der Ratio-Methode stellt den Zusammenhang zwischen der freien Mg²⁺-Konzentration dem Verhältnis der durch 340 nm bzw. 380 nm induzierten Fluoreszenzen (R(Mag-Fura-2)) dar. Für diese Eichung wurden die *in vitro* ermittelten Werte für R_{min}, S_{f2} und S_{b2} eingesetzt und ein K_d von 1,5 mM aus der Literatur übernommen (Raju et al. 1989). R_{max} wurde durch Anpassung der Eichwerte mit Hilfe von Gleichung 10 berechnet. Die Anregungsspektren wurden nur mit einem der beiden Monochromatoren erzeugt (M1; Abb.5A). Für die Messung von [Mg²⁺]_i wurden beide Monochromatoren alternierend verwendet (M1, M2; Abb.5A). Die Intensität des Anregungslichtes von M1 war um den Faktor 2,4 kleiner als die von M2, was dazu führte, dass R um den Faktor 2,4 größer war als anhand der Spektren bestimmt. Daher wurden R_{min} und R_{max} zur Erstellung der Eichkurve durch Multiplikation mit diesem Faktor korrigiert.

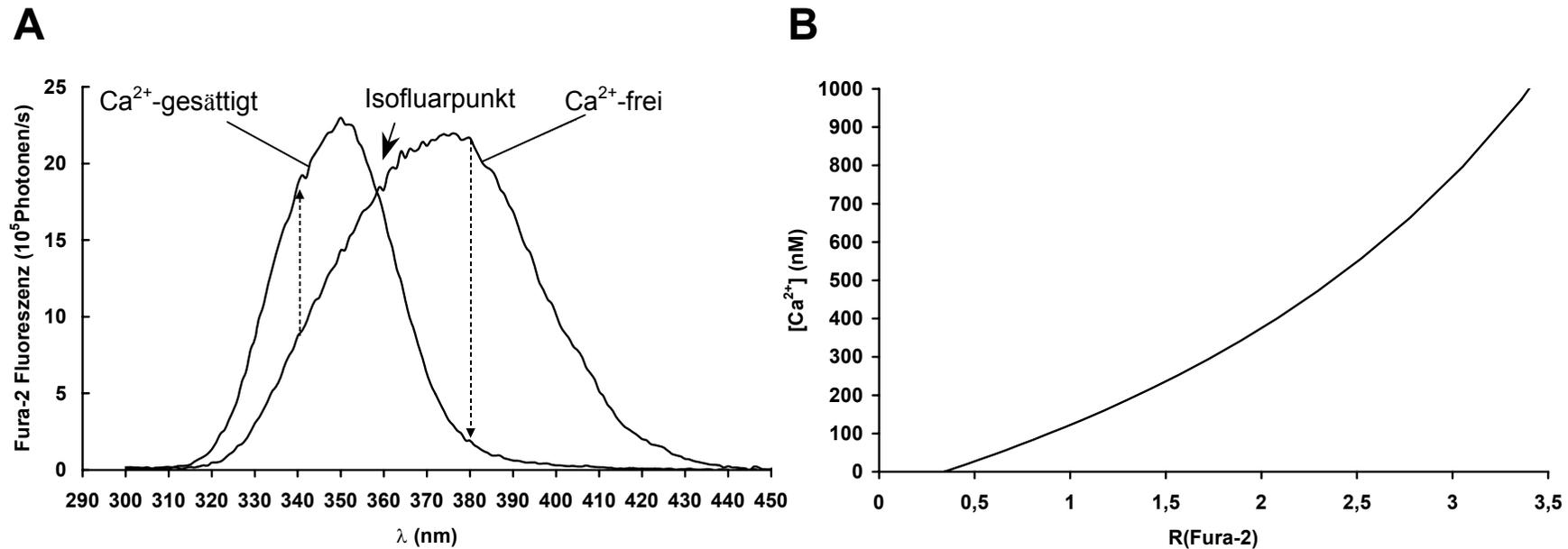


Abb. 7: Eichung von Fura-2.

A) Anregungsspektren der Ca²⁺-freien und der Ca²⁺-gesättigten Form von Fura-2. Die Fluoreszenzemission wurde zwischen 510 nm und 540 nm gemessen. Die Eichlösungen enthielten 100 μM Fura-2, 100 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7,4. Die Ca²⁺-gesättigte Lösung enthielt zusätzlich 10 mM Ca²⁺, die Ca²⁺-freie Lösung 10 mM EGTA. Die Bindung von Ca²⁺ an Fura-2 führte zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums zu kürzeren Wellenlängen. Der Isofluarpunkt lag bei 360 nm (Pfeil). Zur Messung von [Ca²⁺]_i wurde die Fura-2-Fluoreszenz alternierend mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt. Die Änderungen der Fluoreszenzemission sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. **B)** Die Eichkurve nach der Ratio-Methode stellt den Zusammenhang zwischen der freien Ca²⁺-Konzentration und dem Verhältnis der durch 340 nm bzw. 380 nm induzierten Fluoreszenzen (R (Fura-2)) dar. Für diese Eichung wurden die *in vitro* ermittelten Werte für R_{min}, R_{max}, S_{f2} und S_{b2} eingesetzt und ein K_d von 135 nM aus der Literatur übernommen (Grynkiewicz et al. 1985). Die Anregungsspektren wurden nur mit einem der beiden Monochromatoren erzeugt (M1; Abb.5A). Für die Messung von [Ca²⁺]_i wurden beide Monochromatoren alternierend verwendet (M1, M2; Abb.5A). Die Intensität des Anregungslichtes von M1 war um den Faktor 2,4 kleiner als von M2, was dazu führte, dass R um den Faktor 2,4 größer war als anhand der Spektren bestimmt. Daher wurden R_{min} und R_{max} zur Erstellung der Eichkurve durch Multiplikation mit diesem Faktor korrigiert.

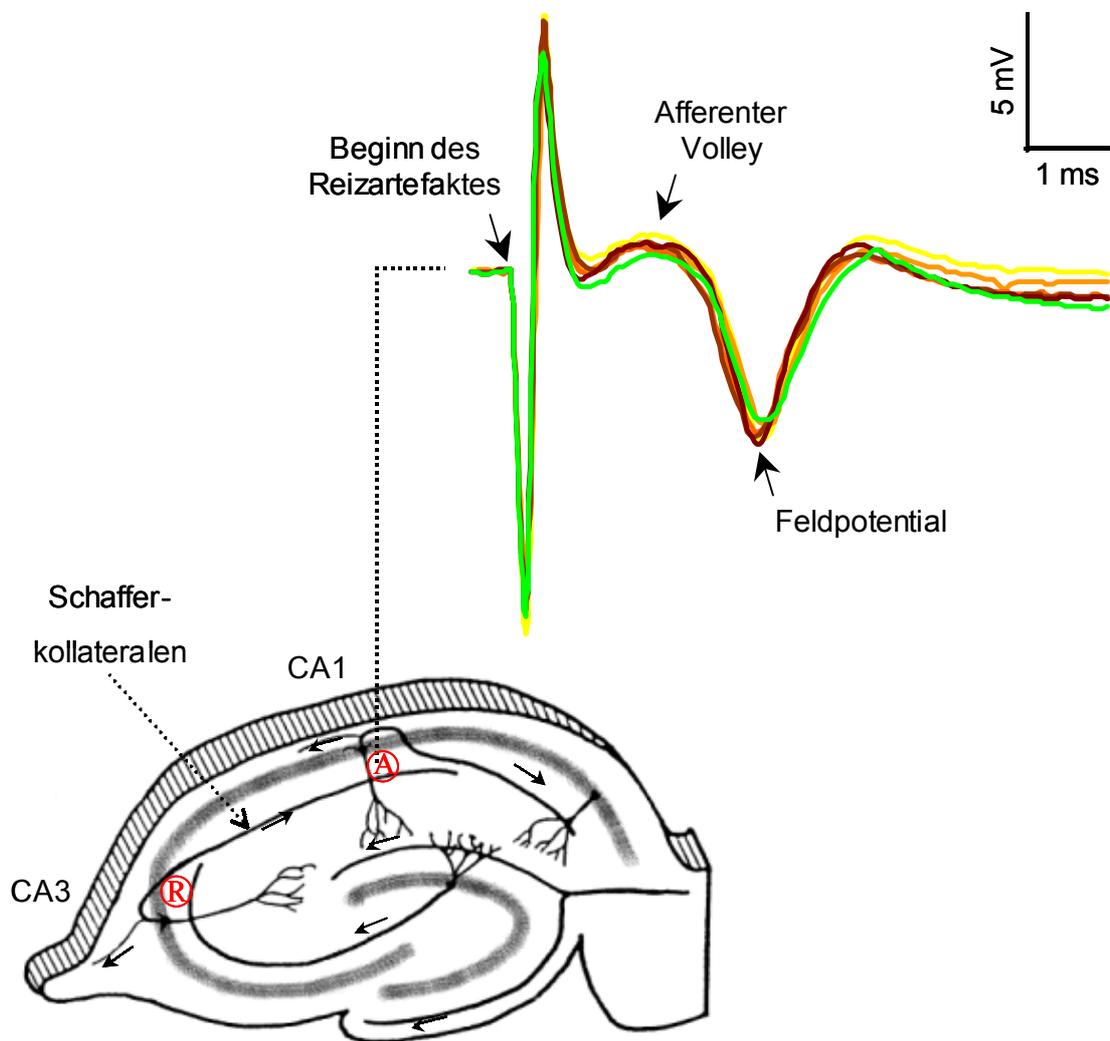


Abb. 8: Extrazelluläre Ableitung von Feldpotentialen.

Die Schaffer-kollateralen wurden in der CA3-Region mit Hilfe einer bipolaren Reizelektrode (R) mit einer Reizspannung von 6 V extrazellulär gereizt. Die Reizantwort im Bereich der apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in der CA1-Region wurde mit einer stumpfen ACSF-gefüllten Glasmikroelektrode (A) abgeleitet. Die gelbe Spur zeigt eine Ableitung 2 h nach der Präparation. Bei überschwelliger Reizung trat zunächst ein afferenter Volley auf, gefolgt von einem negativen Feldpotential. Im Stundentakt (3, 4, 5 und 6 Stunden nach der Präparation, dunkler werdende Linien) wurden weitere Feldpotentiale bei konstanter Reizspannung abgeleitet. Die Form und die Amplitude der Feldpotentiale blieben weitgehend konstant. Auch 9 Stunden nach der Präparation (hellgrüne Linie) war das Feldpotential nahezu unverändert. Die Zeitspanne zwischen Beginn des Reizartefaktes und Erreichen der maximalen Amplitude betrug ca. 4 ms.

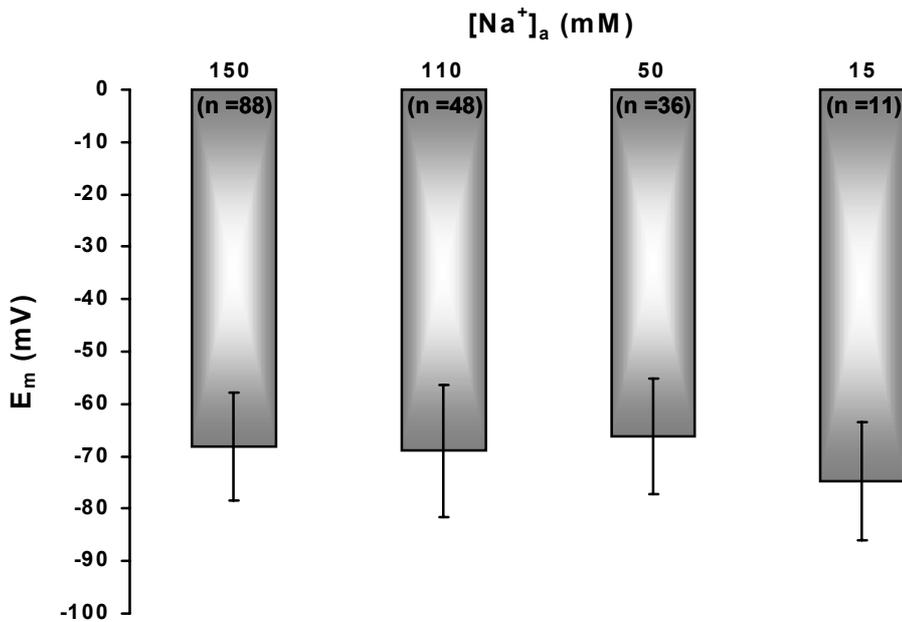


Abb. 9: E_m-Mittelwerte in Abhängigkeit von [Na⁺]_a.

Jede Säule gibt Mittelwert und Standardabweichung der E_m-Werte bei den angegebenen [Na⁺]_a-Werten wieder. E_m war unabhängig von [Na⁺]_a (ANOVA), so dass alle Werte zu einem mittleren E_m-Wert von $-68,4 \pm 11,2$ mV (n = 183) zusammengefasst werden konnten.

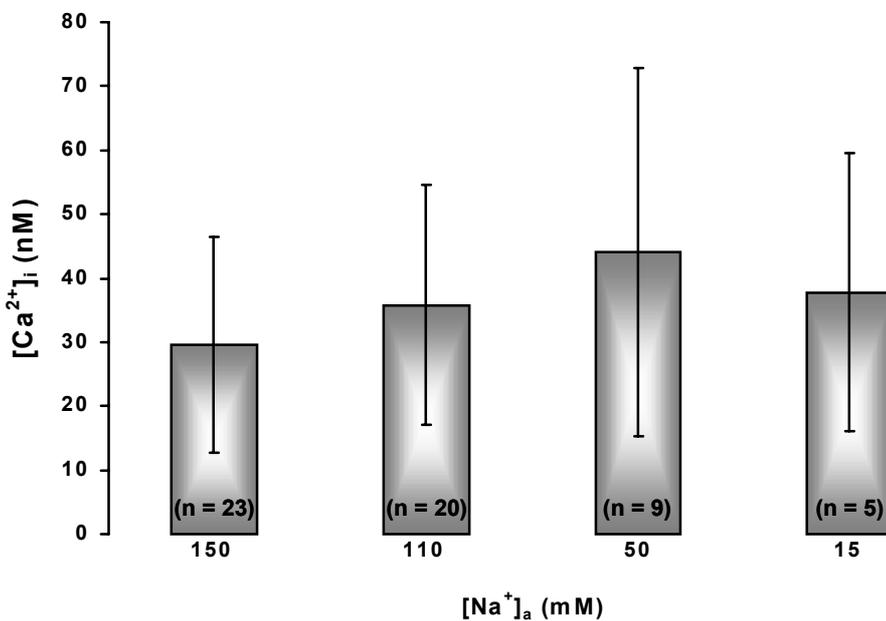


Abb. 10: [Ca²⁺]_i-Mittelwerte in Abhängigkeit von [Na⁺]_a.

Jede Säule gibt Mittelwert und Standardabweichung der [Ca²⁺]_i-Werte bei den angegebenen [Na⁺]_a-Werten wieder. [Ca²⁺]_i war von [Na⁺]_a unabhängig (ANOVA), so dass alle Werte zu einem mittleren [Ca²⁺]_i-Wert von 35 ± 20 nM (n = 57) zusammengefasst werden konnten. [Ca²⁺]_i lag immer weit unterhalb des für [Mg²⁺]_i-Mag-Fura-2 kritischen Wertes von 1 μM.

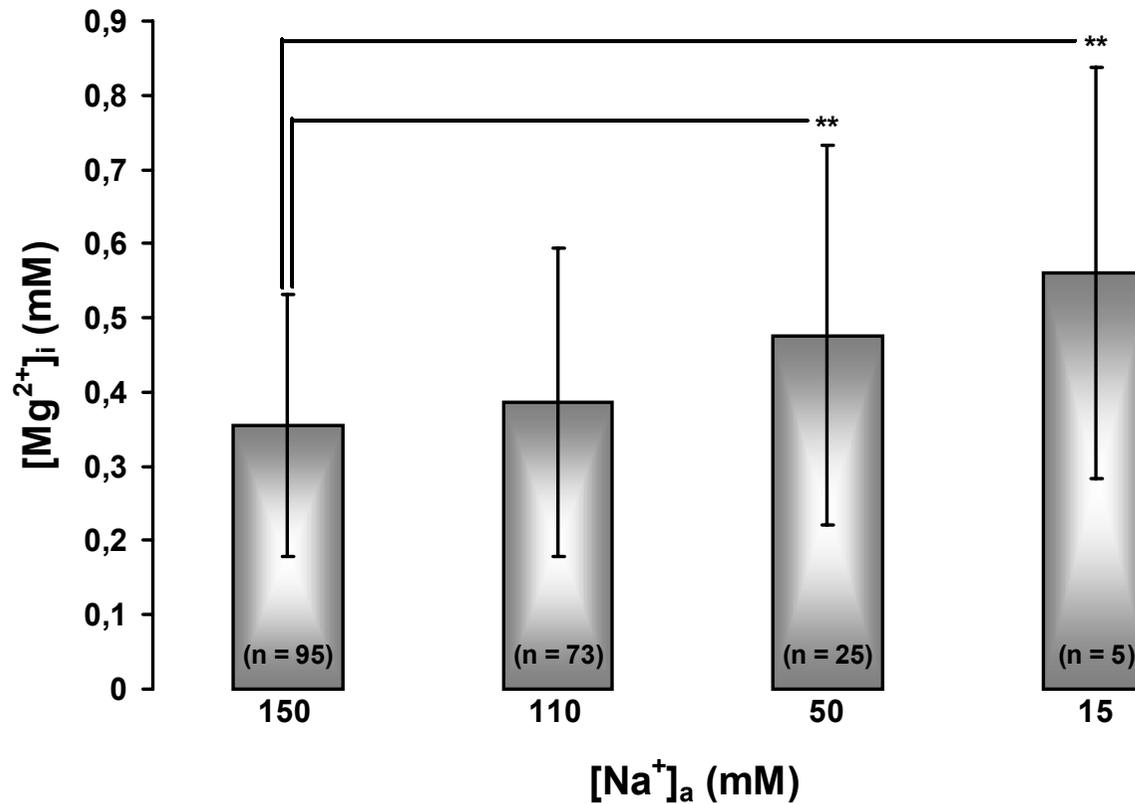


Abb. 11: $[Mg^{2+}]_i$ -Mittelwerte in Abhängigkeit von $[Na^+]_a$.

Jede Säule gibt die Mittelwert und die Standardabweichung der $[Mg^{2+}]_i$ -Werte bei den angegebenen $[Na^+]_a$ -Werten wieder. Mit abnehmender $[Na^+]_a$ wurde $[Mg^{2+}]_i$ größer. Die Werte für $[Na^+]_a = 50$ mM und $[Na^+]_a = 15$ mM waren hoch signifikant verschieden von den Werten, die in ACSF ($[Na^+]_a = 150$ mM) bestimmt wurden (ungepaarter Student's t-Test).

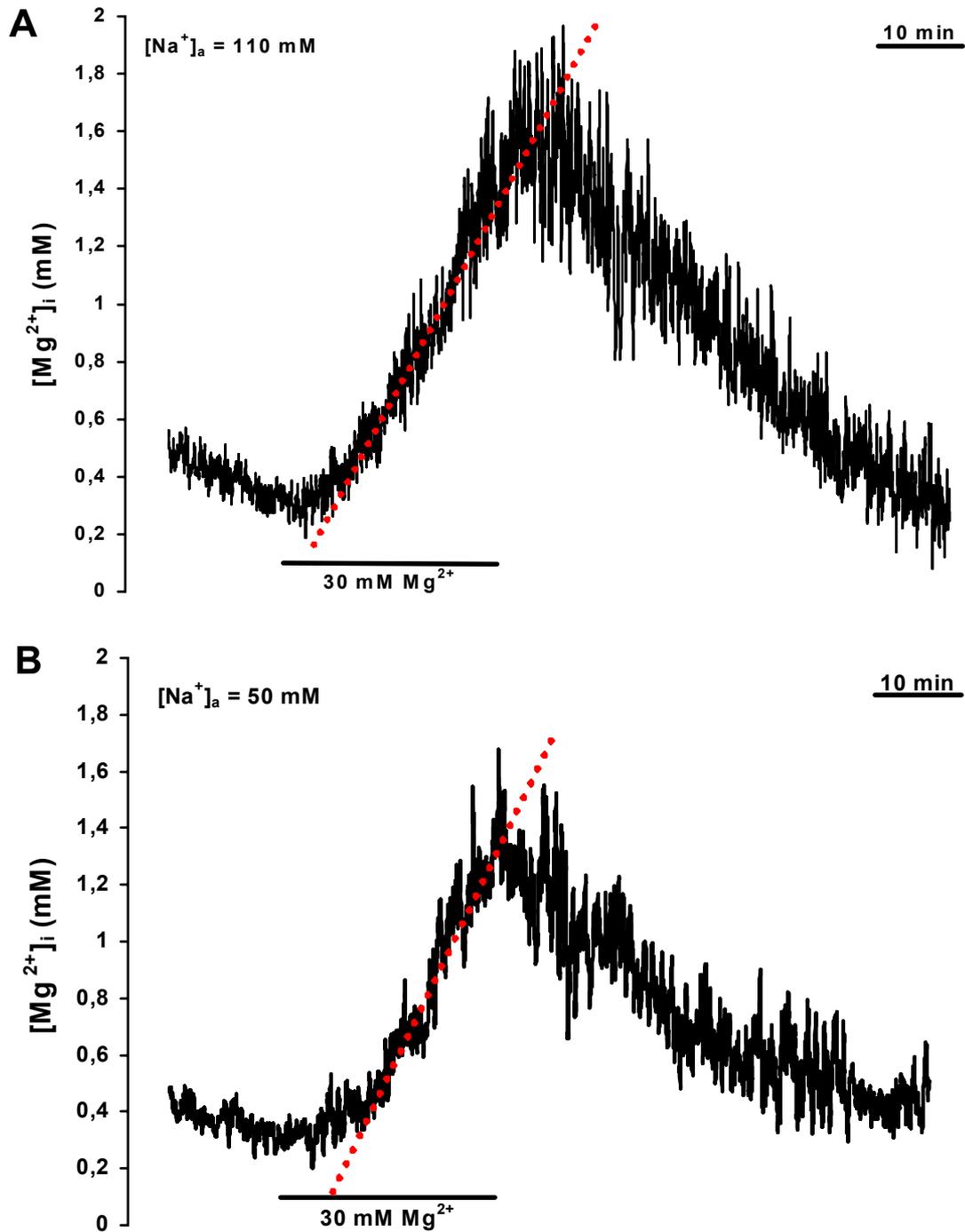


Abb. 12: Unabhängigkeit des Mg^{2+} -Einstroms von $[Na^+]_a$.

Sowohl bei einer $[Na^+]_a = 110 \text{ mM}$ (**A**) als auch bei $[Na^+]_a = 50 \text{ mM}$ (**B**) führte die $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung von 1,3 auf 30 mM zu $[Mg^{2+}]_i$ -Anstiegen, deren Amplitude und Geschwindigkeit nicht signifikant verschieden und damit nicht von $[Na^+]_a$ abhängig waren (Student's t-Test). Die linearen Regressionen, mit deren Hilfe die Mg^{2+} -Einstromraten als $\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ bestimmt wurden, sind als punktierte rote Linien eingezeichnet.

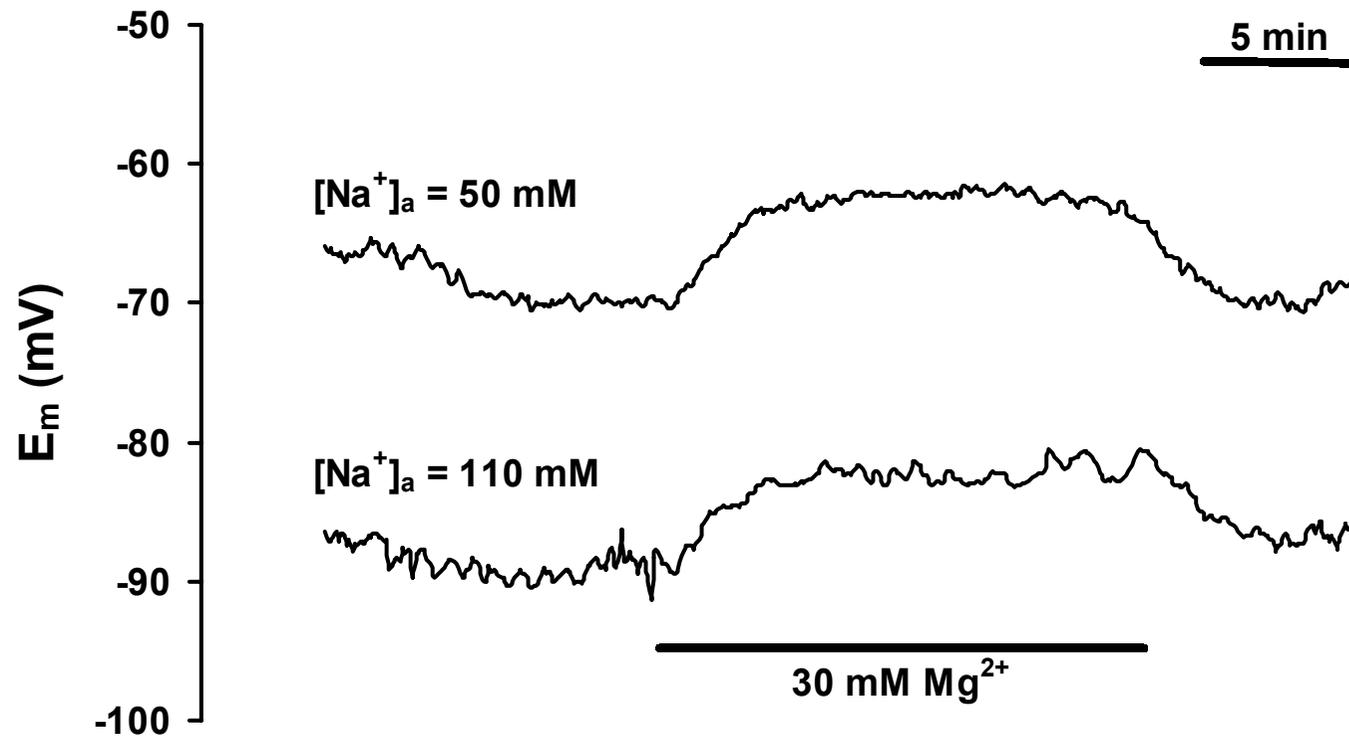


Abb. 13: Registrierbeispiele des Effektes der $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung auf E_m bei verschiedenen $[Na^+]_a$.

Gleichzeitig mit der $[Mg^{2+}]_a$ -Erhöhung von 1,3 auf 30 mM depolarisierte die Membran reversibel, sowohl in Gegenwart von 50 mM Na^+ (obere Messspur) als auch in Gegenwart von 110 mM Na^+ (untere Messspur).

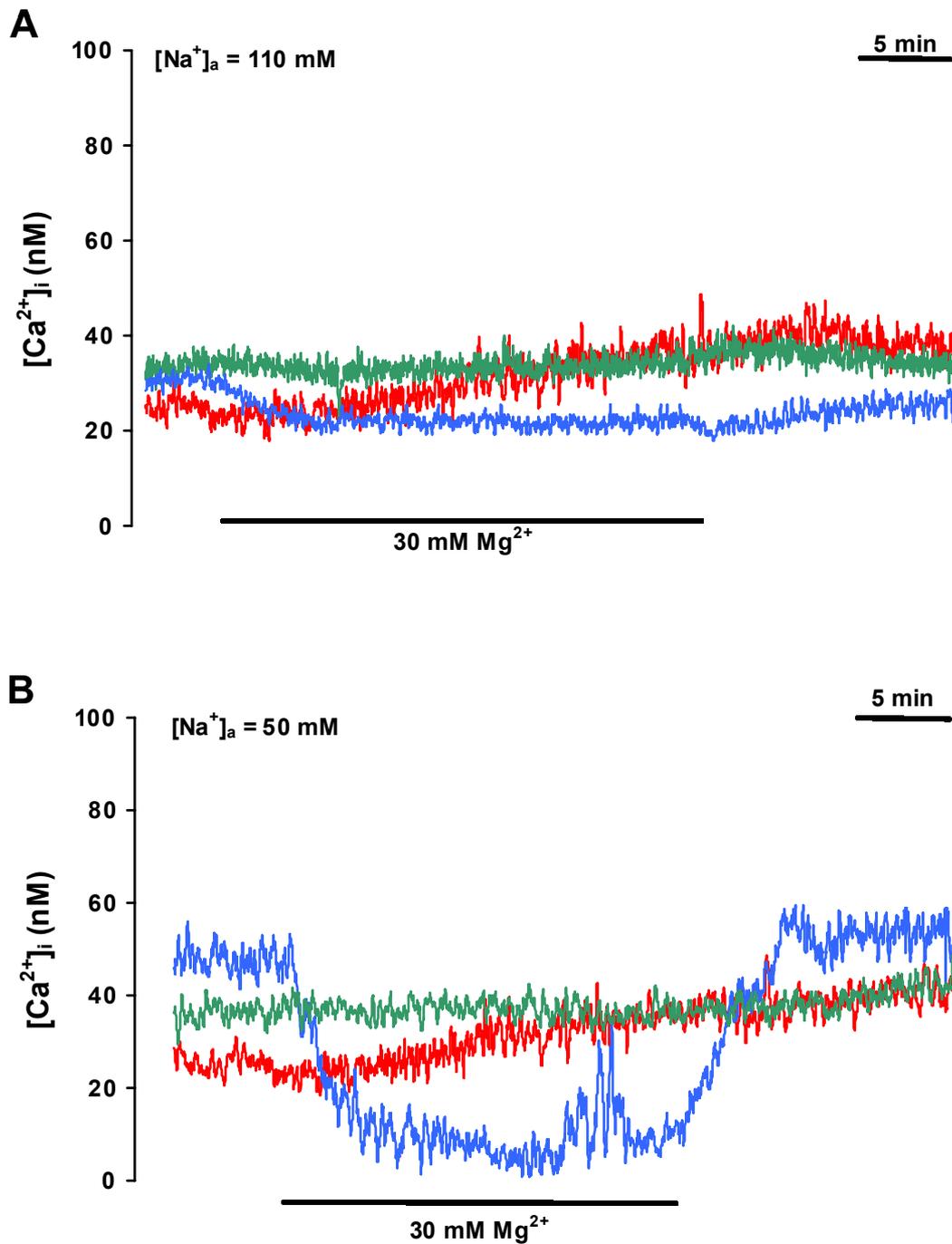


Abb. 14: Registrierbeispiele des Effektes der $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Der Effekt einer Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war sowohl in Gegenwart von 110 mM $[\text{Na}^+]_a$ (**A**) als auch in Gegenwart von 50 mM $[\text{Na}^+]_a$ (**B**) variabel. Entweder war eine geringfügige Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (rote Messspuren) oder ein Absinken von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (blaue Messspuren) oder gar keine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung zu beobachten (grüne Messspuren). Die Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waren von $[\text{Na}^+]_a$ unabhängig (ANOVA).

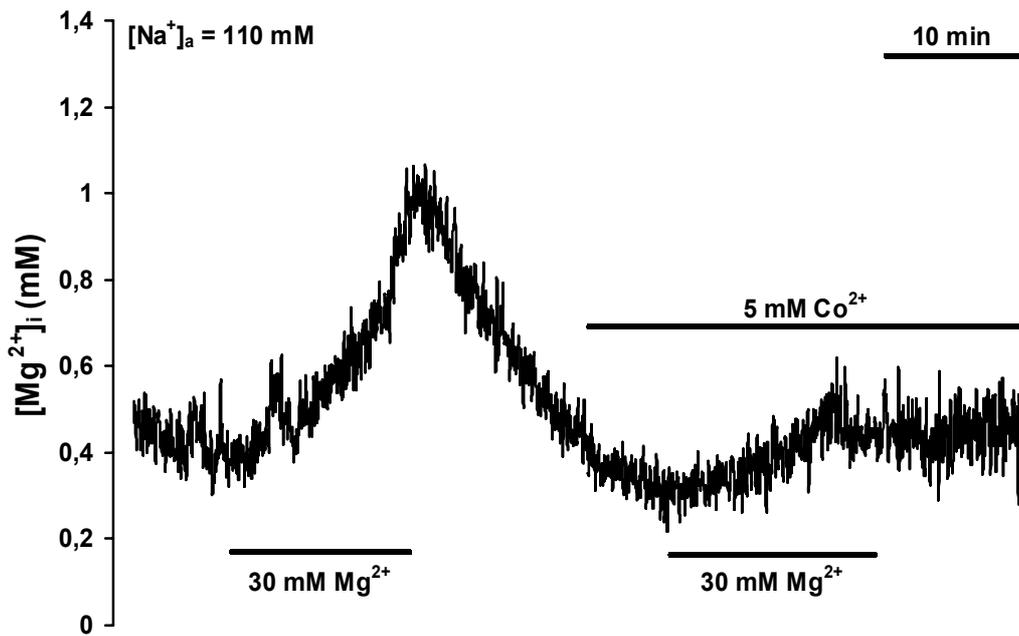


Abb. 15: Registrierbeispiel der Wirkung von 5 mM Co^{2+} auf $[\text{Mg}^{2+}]_i$ und den Mg^{2+} -Einstrom.

Die Erhöhung von $[\text{Mg}^{2+}]_a$ auf 30 mM führte zu einem deutlichen, reversiblen Anstieg von $[\text{Mg}^{2+}]_i$. In diesem Experiment beeinflusste die Gegenwart von 5 mM Co^{2+} die Mg^{2+} -Austrorrate nicht, jedoch war die Mg^{2+} -Einstromrate gegenüber der Vorkontrolle um 89 % reduziert.

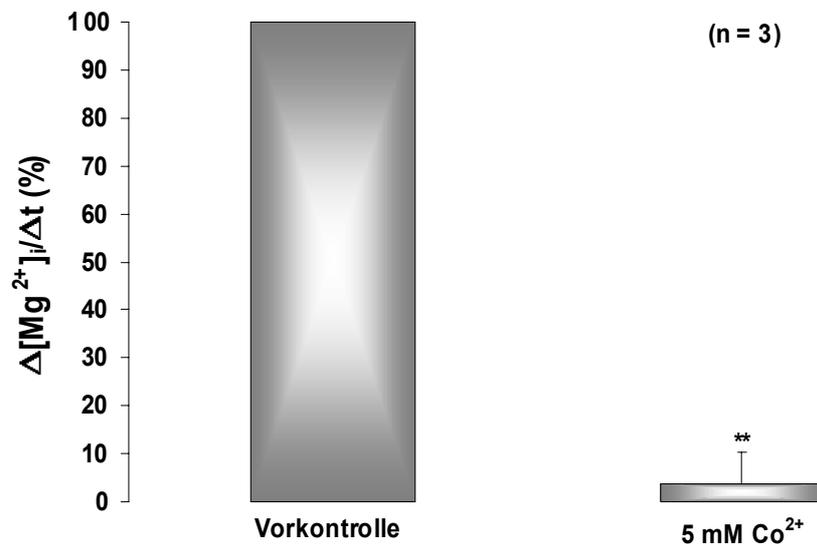


Abb. 16: Wirkung von 5 mM Co^{2+} auf den Mg^{2+} -Einstrom.

In Gegenwart von 5 mM Co^{2+} war die Mg^{2+} -Einstromrate auf $3,8 \pm 6,6$ % reduziert ($n = 3$).

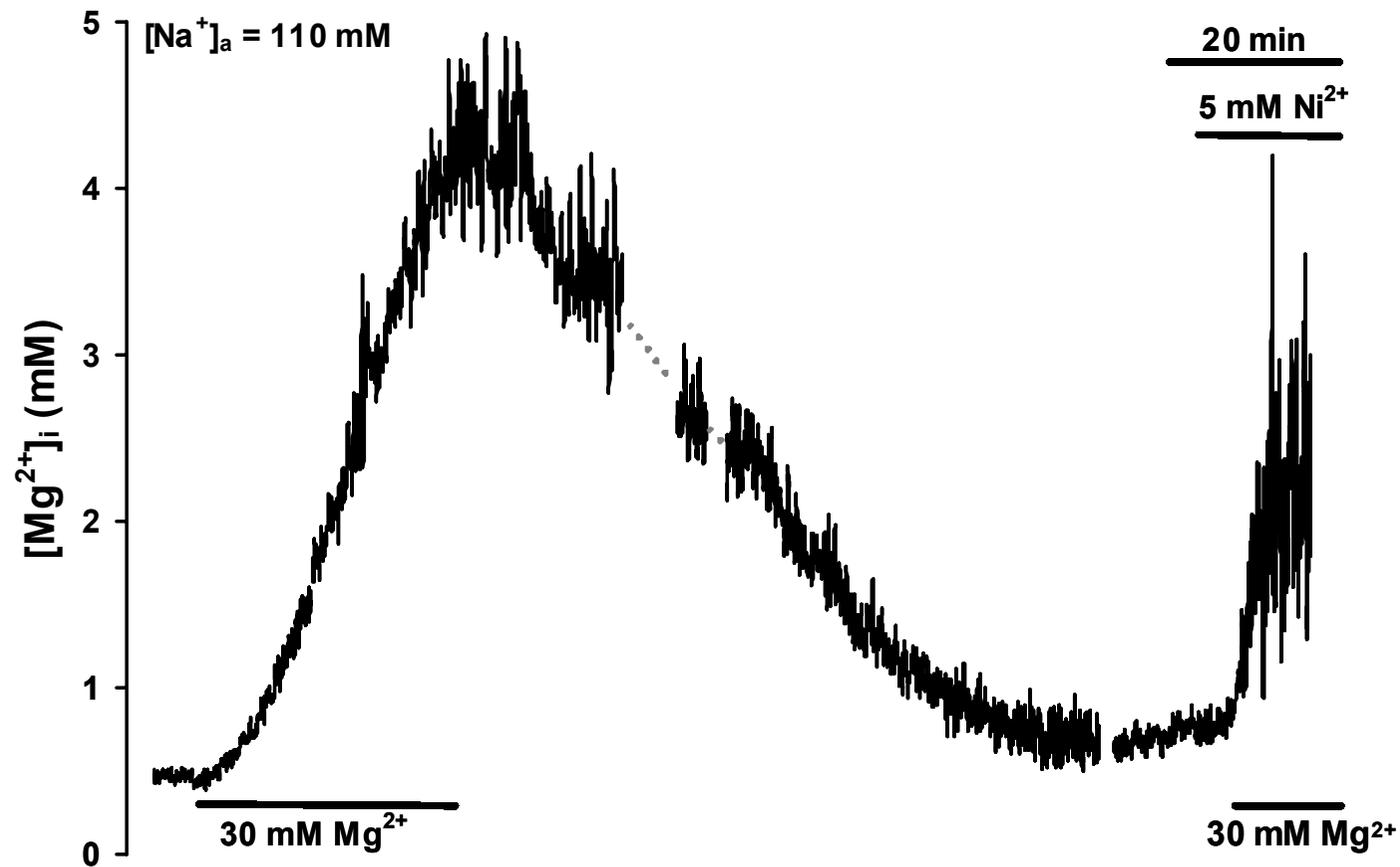


Abb. 17: Registrierbeispiel der Wirkung von Ni^{2+} auf den Mg^{2+} -Einstrom.

Als Vorkontrolle wurde durch $[\text{Mg}^{2+}]_a$ -Erhöhung ein reversibler Mg^{2+} -Einstrom ausgelöst. Die Applikation von 5 mM Ni^{2+} führte zu unregelmäßigen Veränderungen des $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -Signals (Rauschen), die wahrscheinlich auf Fluoreszenzauslöschung beruhen. Die Messspur ist technisch bedingt an einigen Stellen unterbrochen und der Spurverlauf wurde von Hand extrapoliert (graue Punkte).

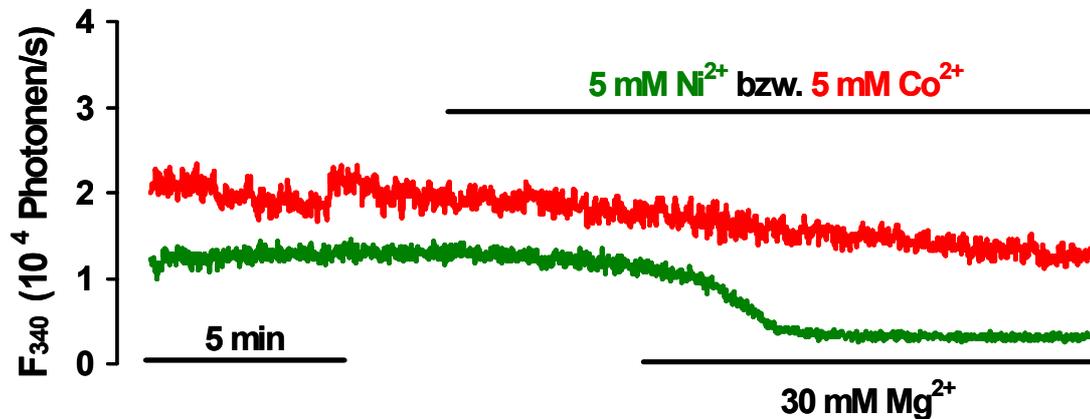
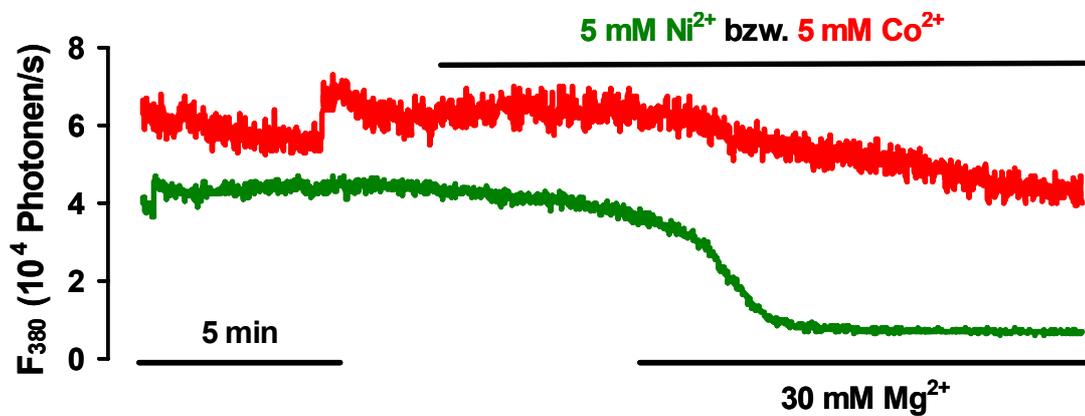
A**B**

Abb. 18: Rohdaten zu den in Abb. 15 und Abb. 17 gezeigten Registrierbeispielen.

Fluoreszenzsignale der Mg^{2+} -beladenen Form (F_{340} , **A**) und der Mg^{2+} -freien Form (F_{380} , **B**) von Mag-Fura-2 in Gegenwart von 5 mM Ni^{2+} bzw. Co^{2+} . Die Darstellung beschränkt sich auf den Zeitraum der Ni^{2+} - bzw. Co^{2+} -Applikation. Im Gegensatz zur Applikation von Co^{2+} (rote Spuren) führte Ni^{2+} (grüne Spuren) zu einem Absinken von F_{340} und F_{380} auf die Autofluoreszenz. In Gegenwart von Co^{2+} war ebenfalls eine geringe Abnahme des F_{380} -Signals zu beobachten (rote Spuren, B), die vermutlich auf der unvollständigen Blockierung des Mg^{2+} -Einstroms beruhte (Abb. 15).

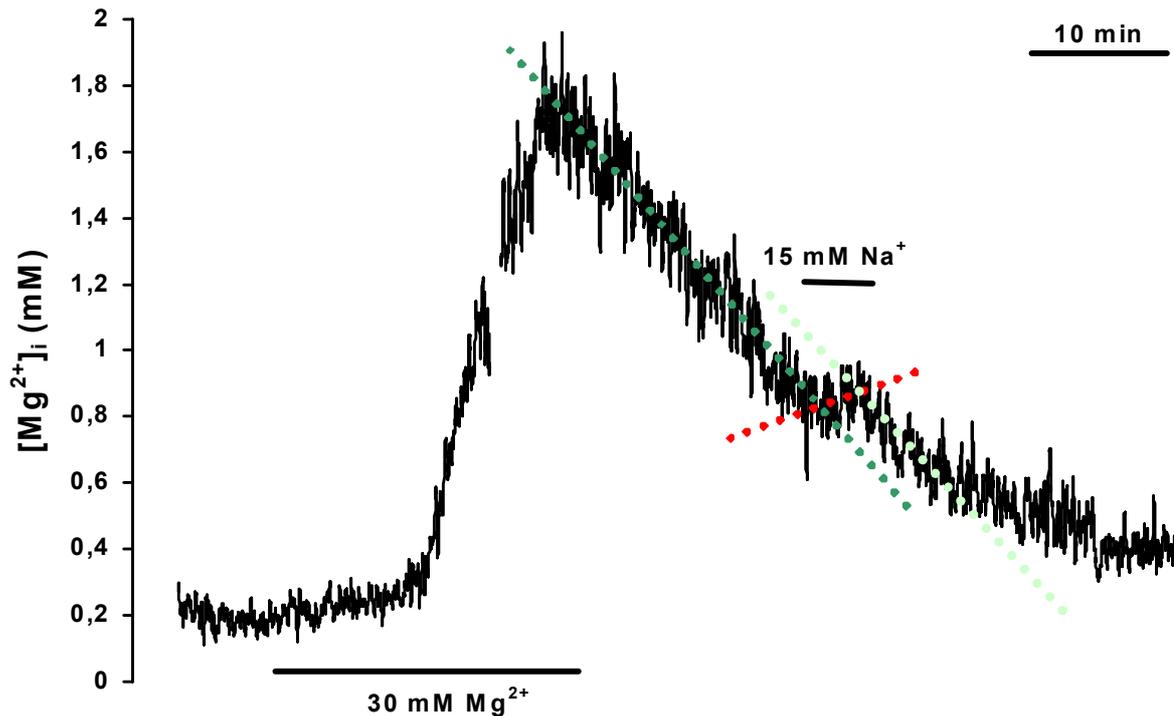


Abb. 19: Registrierbeispiel zur Abhängigkeit des Mg^{2+} -Auswärtstransportes von $[Na^+]_a$.

Die Zellen wurden mit Mg^{2+} beladen, indem $[Mg^{2+}]_a$ von 1,3 auf 30 mM erhöht wurde. Nachdem $[Mg^{2+}]_a$ wieder auf 1,3 mM reduziert worden war, sank $[Mg^{2+}]_i$ ab. Die Mg^{2+} -Ausstromraten wurden analog zu den Einstromraten als Steigung des linearen Kurvenabschnitts $\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ ($\mu M/min$) durch lineare Regression bestimmt. Nachdem in Gegenwart von 110 mM $[Na^+]_a$ die maximale Mg^{2+} -Ausstromrate von $-56 \mu M/min$ erreicht war (unterbrochene dunkelgrüne Linie), wurde $[Na^+]_a$ für 5 min auf 15 mM reduziert. Für diesen Kurvenabschnitt betrug $\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ $4 \mu M/min$ (unterbrochene rote Linie), d.h., unter diesen Bedingungen fand kein Mg^{2+} -Ausstrom statt, sondern ein geringer Einstrom. Im Anschluss wurde $[Na^+]_a$ wieder auf 110 mM erhöht und $[Mg^{2+}]_i$ begann mit einer Rate von $-54 \mu M/min$ in Richtung des Ausgangswertes zu sinken (unterbrochene hellgrüne Linie).

Die Registrierung zeigt außerdem ein typisches Beispiel für einen zweiphasigen $[Mg^{2+}]_i$ -Anstieg, der bei Erhöhung von $[Mg^{2+}]_a$ auf 30 mM in etwa 30 % der Experimente auftrat. Innerhalb der ersten, langsameren Phase betrug er in diesem Experiment $7 \mu M/min$, in der zweiten, schnelleren Phase $164 \mu M/min$.

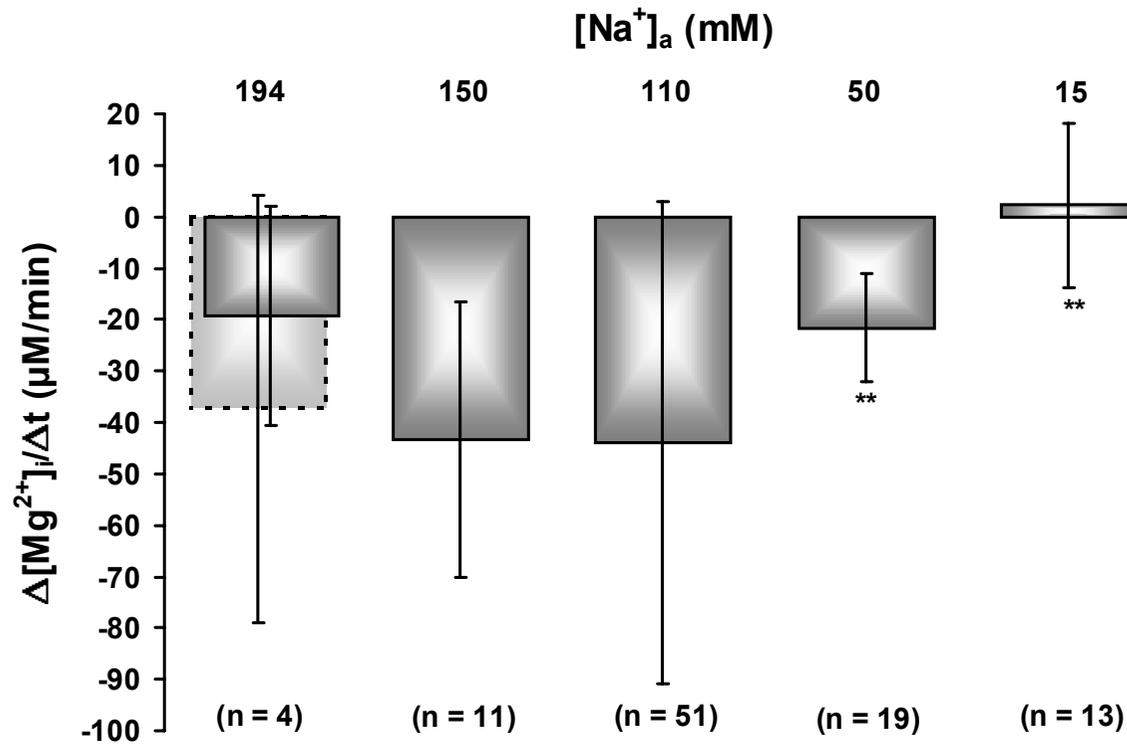


Abb. 20: Abhängigkeit der Mg²⁺-Ausstromrate von [Na⁺]_a.

In diesem Diagramm sind die mittleren Mg²⁺-Ausstromraten mit Standardabweichungen für die angegebenen [Na⁺]_a-Werte zusammengefasst. Die Mg²⁺-Ausstromrate wurde mit abnehmender [Na⁺]_a kleiner. Die Werte für [Na⁺]_a = 50 mM und [Na⁺]_a = 15 mM waren hoch signifikant verschieden von den Werten in ACSF ($p \ll 0,01$, Student's t-Test). Das Absinken der Mg²⁺-Ausstromrate in 194 M [Na⁺]_a lässt sich durch die erhöhte Osmolarität dieser Lösung erklären. Wird die osmotisch bedingte Verlangsamung der Mg²⁺-Ausstromrate berücksichtigt (Kapitel 3.11 Abb. 21, 22) ergibt sich in Gegenwart von 194 mM [Na⁺]_a ein größere Mg²⁺-Ausstromrate. Diese ist im Hintergrund als hellgraue Säule mit gestrichelter Umrandung dargestellt.

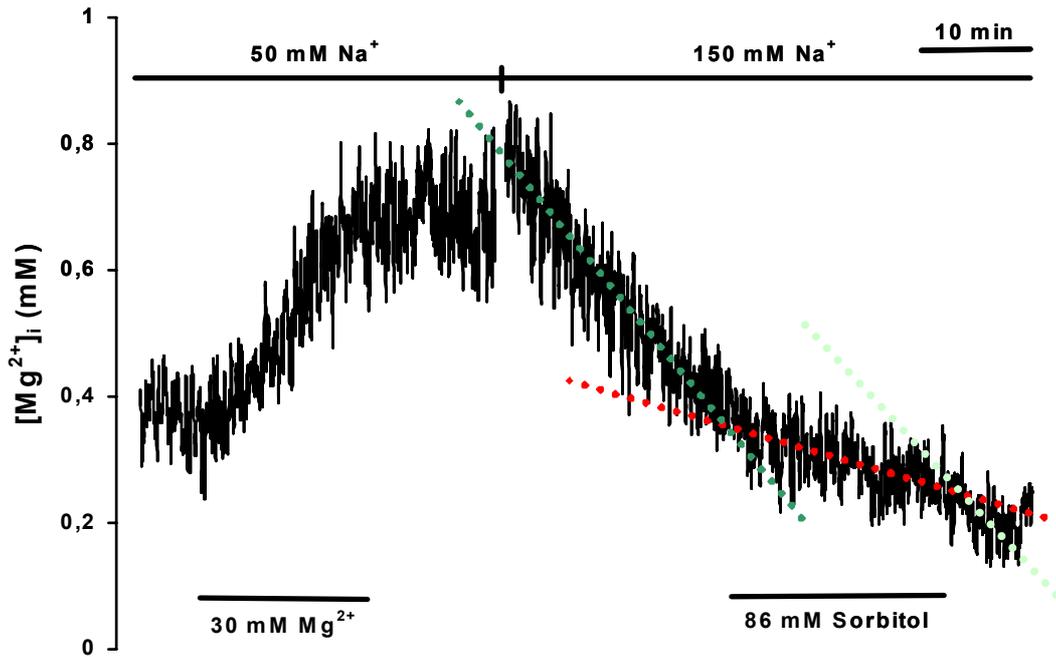


Abb. 21: Registrierbeispiel des Effektes der Osmolarität auf die Mg^{2+} -Ausstromrate.

Die Applikation einer Lösung, deren Osmolarität durch Zusatz von 86 mM Sorbitol bei konstanter $[Na^+]_a$ von 150 mM erhöht war, führte zu einer Verlangsamung der Mg^{2+} -Ausstromrate (rote unterbrochene Linie). Die Mg^{2+} -Ausstromraten in Gegenwart von ACSF sind als grüne unterbrochene Linien eingezeichnet.

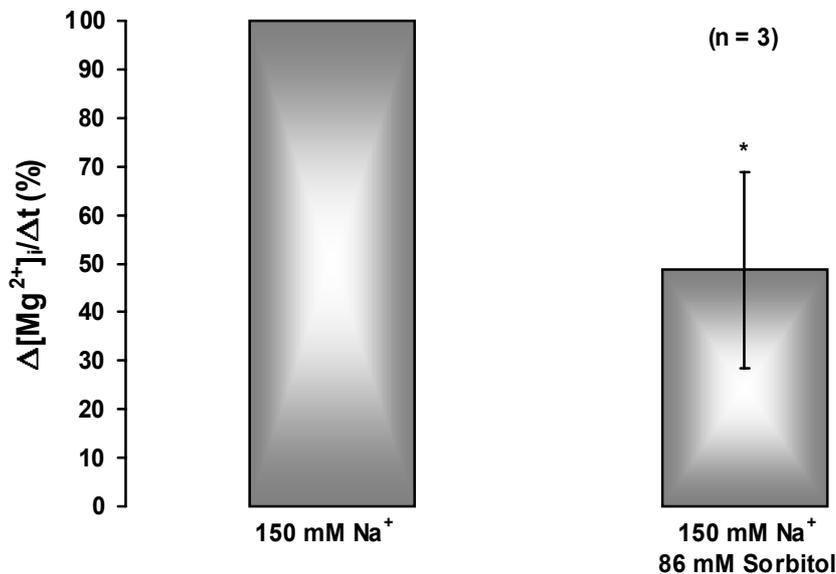


Abb. 22: Effekt der Osmolarität auf die Mg^{2+} -Ausstromrate.

In Gegenwart von 86 mM Sorbitol war die Mg^{2+} -Ausstromrate signifikant auf $49 \pm 20\%$ ($n = 3$) der Mg^{2+} -Ausstromrate in ACSF verringert ($p < 0,05$, Student's t-Test).

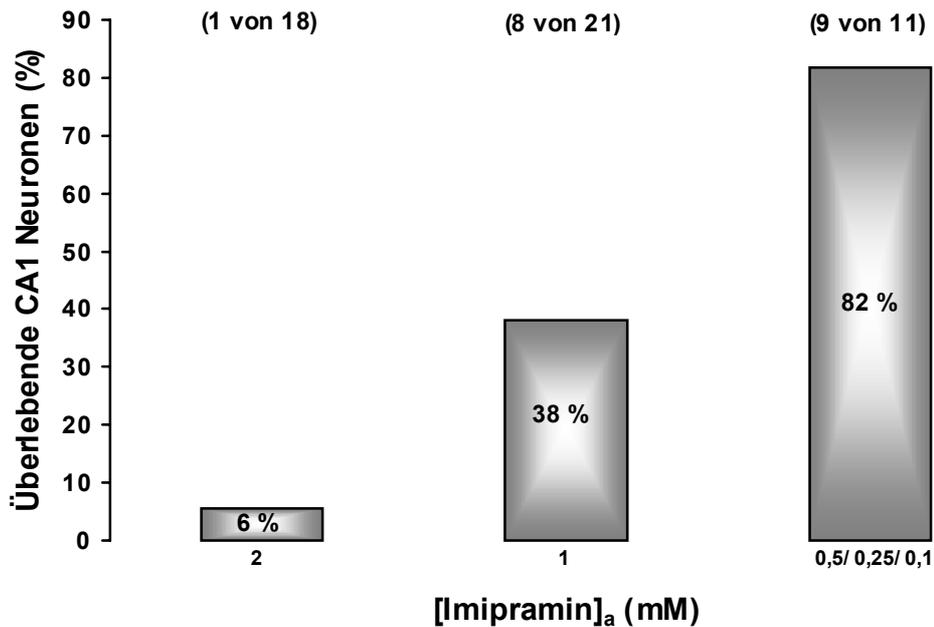


Abb. 23: Effekt von Imipramin auf das Überleben der CA1-Pyramidenzellen.

Das Überleben der CA1-Pyramidenzellen war von der Imipramindosis abhängig. Je kleiner die Imipramin-Konzentration in der Versuchslösung war, um so höher war die Anzahl an überlebenden Zellen. In der Darstellung wurden alle Messungen, die mit Imipramin durchgeführt wurden, zusammengefasst, d.h. Messungen von E_m , $[Ca^{2+}]_i$ und $[Mg^{2+}]_i$.

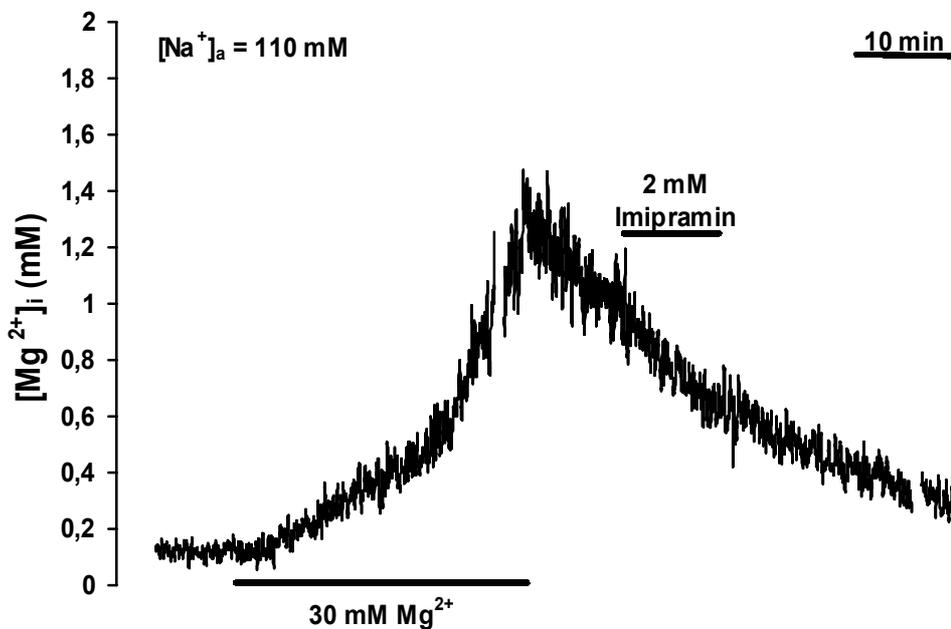


Abb. 24: Registrierbeispiel des Imipramin-Effektes auf die Mg^{2+} -Ausstromrate.

Die Applikation von 2 mM Imipramin beeinflusste die Mg^{2+} -Ausstromrate nicht.

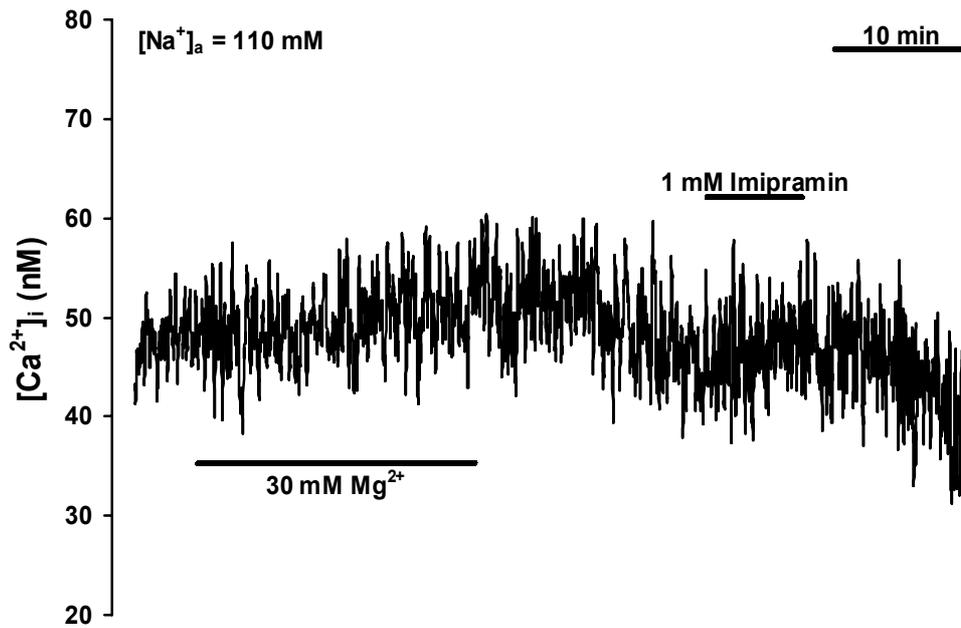


Abb. 25: Registrierbeispiel des Imipramin-Effektes auf $[Ca^{2+}]_i$.

Identisches Versuchsprotokoll wie in Abb. 24. Die Applikation von 1 mM Imipramin beeinflusste $[Ca^{2+}]_i$ nicht.

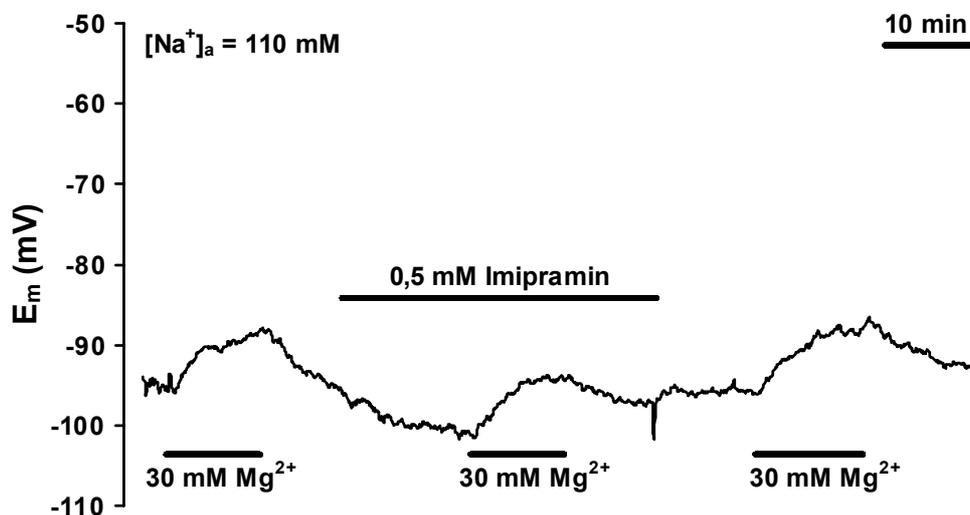


Abb. 26: Registrierbeispiel des Imipramin-Effekt auf E_m .

Die Applikation von 0,5 mM Imipramin beeinflusste das E_m und die 30 mM Mg^{2+} -Gabe induzierte Membrandepolarisation nicht. Die maximal verträgliche Imipramin-Konzentration betrug bei den E_m -Messungen 0,5 mM.

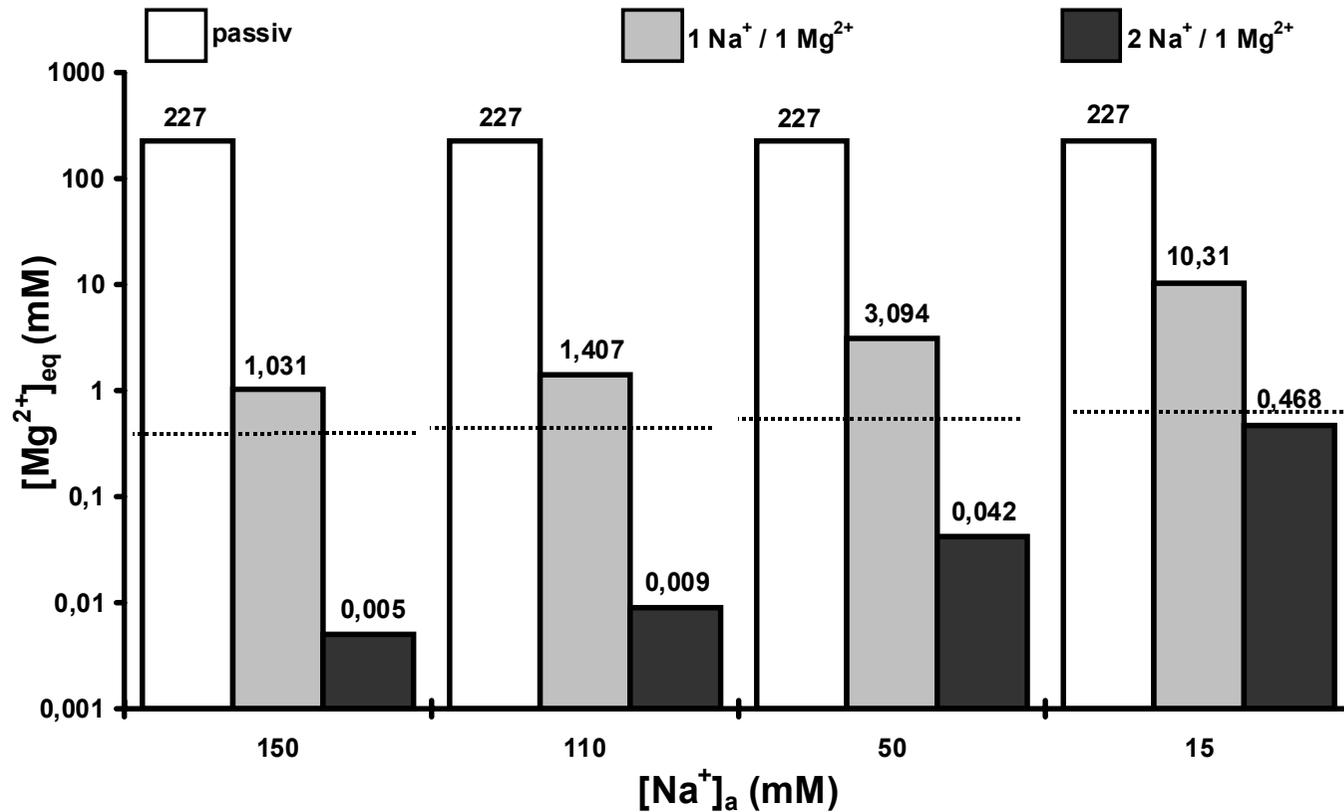


Abb. 27: Thermodynamisches Gleichgewicht $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ für $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher unterschiedlicher Stöchiometrie bei verschiedenen $[\text{Na}^+]_a$.

$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{eq}}$ wurde anhand von Gleichung 12 für eine passive Verteilung von Mg^{2+} (weiße Säulen) sowie für einen $1 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Mg}^{2+}$ -Austauscher (graue Säulen) und einen $2 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Mg}^{2+}$ -Austauscher (schwarze Säulen) berechnet. Die Werte für $[\text{Na}^+]_a$ und $[\text{Mg}^{2+}]_a$ sind durch die Zusammensetzung der Versuchslösungen gegeben. E_m wurde experimentell zu $-68,4 \text{ mV}$ bestimmt. Für $[\text{Na}^+]_i$ wurde ein Wert von $8,9 \text{ mM}$ aus der Literatur übernommen (Rose & Ransom 1997). Die bei den verschiedenen $[\text{Na}^+]_a$ experimentell bestimmten $[\text{Mg}^{2+}]_i$ sind als unterbrochene Linien eingezeichnet.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Professor Dr. W.-R. Schlue, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und vor allem für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen zur vorliegenden Arbeit herzlich bedanken. Professor Dr. K. Lunau danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Dr. D. Günzel möchte ich ganz besonders für ihre hilfreiche und konstruktive Kritik danken. Sie stand mir in allen Phasen der Arbeit unabhängig von der Tageszeit mit Rat und Tat zur Seite.

Professor Dr. H. J. Luhmann und Professor Dr. H.L. Haas danke ich für ihre Hilfe beim Erlernen der Präparationstechnik.

Dr. P. Hochstrate danke für seine hilfreichen und kritischen Anmerkungen zur vorliegenden Arbeit.

Bei Dr. P.W. Dierkes und H.J. Wüsten möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken und bei S. Durry für ihr phänomenales ortsauflösendes Gedächtnis. H. von Berg-Harder danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung in der praktischen Phase dieser Arbeit. Dr. E. von Berg danke ich für die Erstellung der Computerprogramme zur digitalen Erfassung der Feldpotentiale.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die mir in guter Erinnerung bleiben wird, danken.

Ute und Winfried Hegener danke ich für ihre großzügige Unterstützung in der Schlussphase der Arbeit, vor allem für die Bereitstellung sämtlicher Geräte mit Zubehör.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern und bei Jörg Kortgödde bedanken, die mich unterstützen, wo sie nur konnten und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Diese Arbeit wurde unterstützt aus den Mitteln des Graduiertenkollegs „Pathologische Prozesse des Nervensystems: Vom Gen zum Verhalten.“

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich sie in der vorliegenden oder ähnlichen Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.

Düsseldorf, 09.06.2002