

**Ionale Mechanismen von Volumenänderungen  
identifizierter Neuronen im Zentralnervensystem des  
medizinischen Blutegels**

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

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

vorgelegt von

Guido Klees  
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2005

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

Referent: Prof. Dr. W.-R. Schlue  
Koreferent: Prof. Dr. K. Lunau

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Material und Methoden</b> .....	7
<b>2.1 Versuchstiere und Präparation</b> .....	7
2.1.1 Der medizinische Blutegel.....	7
2.1.2 Präparation der Segmentalganglien.....	8
2.1.3 Identifizierung der Neuronen.....	8
<b>2.2 Versuchslösungen und Pharmaka</b> .....	9
<b>2.3 Messung des Zellvolumens mit Fluoreszenzfarbstoffen</b> .....	11
2.3.1 Messung von Zellvolumen und $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2.....	12
2.3.2 Fura-2-Injektion.....	14
2.3.3 Aufbau des Mikrofluorimeters.....	15
<b>2.4. Ionensensitive Glasmikroelektroden</b> .....	16
2.4.1 Theoretische Grundlagen.....	16
2.4.2 Herstellung ionensensitiver Glasmikroelektroden.....	19
2.4.3 Eichung ionensensitiver Glasmikroelektroden.....	22
2.4.4 Messung des Zellvolumens mit $TMA^+$ als Volumenmarker.....	25
2.4.5 Eichung $TMA^+$ -sensitiver Glasmikroelektroden.....	26
2.4.6 Verwendung kombinierter Eichlösungen.....	30
2.4.7 Verwendung unterschiedlicher Referenzlösungen.....	31
2.4.8 Aufbau der Messapparatur.....	32
<b>2.5 Messung des Eingangswiderstands</b> .....	33
<b>3. Ergebnisse</b> .....	34
<b>3.1 Elektrophysiologische Parameter und intrazelluläre Ionenkonzentrationen unter Ruhebedingungen</b> .....	34
3.1.1 Ruhewerte von $[K^+]_i$ , $[Na^+]_i$ , $[Cl^-]_i$ , $[Ca^{2+}]_i$ , $E_m$ und $R_{Input}$ .....	34
3.1.2 Zusammenhang zwischen $[K^+]_i$ , $[Na^+]_i$ bzw. $[Cl^-]_i$ und $E_m$ .....	36
3.1.3 $Cl^-$ -Verteilung bei den verschiedenen Neuronentypen.....	37

<b>3.2 Cl<sup>-</sup>-Regulation bei Retzius- und P-Neuronen</b> .....	39
3.2.1 Hemmung des K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Cotransporters: Wirkung auf E <sub>m</sub> und [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> .....	39
3.2.2 Hemmung des Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> -Cotransporters: Wirkung auf E <sub>m</sub> und [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> .....	40
<b>3.3 Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe: Wirkung auf E<sub>m</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> und Zellvolumen</b> .....	40
3.3.1 Hemmung der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Pumpe mit Ouabain.....	41
3.3.2 Hemmung der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Pumpe in K <sup>+</sup> -freier Badlösung.....	46
<b>3.4 Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren: Wirkung auf E<sub>m</sub>, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> und Zellvolumen</b> .....	48
3.4.1 Kainat-induzierte Zellschwellung bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen.....	50
3.4.2 Wirkung von Kainat, AMPA und L-Glutamat auf E <sub>m</sub> , [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> und Zellvolumen bei Retzius-Neuronen.....	50
<b>3.5 Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren: Wirkung auf E<sub>m</sub>, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> und Zellvolumen</b> .....	52
3.5.1 5-HT-induzierte Zellvolumenänderungen bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen.....	53
3.5.2 Wirkung von 5-HT auf E <sub>m</sub> und [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> bei P-Neuronen.....	54
<b>3.6 Na<sup>+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle bei P-Neuronen</b> .....	54
<b>4. Diskussion</b> .....	57
<b>4.1 Ruhewerte</b> .....	57
<b>4.2 Zellvolumenänderungen unter isotonischen Bedingungen</b> .....	58
4.2.1 Hemmung der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Pumpe.....	58
4.2.2 Bilanz der Ionenbewegungen.....	59
<b>4.3 Bedeutung von [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> für das Zellvolumen</b> .....	60
4.3.1 Cl <sup>-</sup> ist bei allen Neuronen aktiv verteilt.....	60
4.3.2 Cl <sup>-</sup> -Leitfähigkeit von Retzius- und P-Neuronen im Vergleich.....	61
4.3.3. Transportmechanismen zum Aufbau der aktiven Cl <sup>-</sup> -Verteilung.....	61
4.3.4 Zusammenhang zwischen E <sub>m</sub> , [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> und Zellvolumen.....	63
<b>4.4 Ionaler Mechanismus der Zellvolumenänderung</b> .....	65
4.4.1 Retzius-Neuronen.....	65
4.4.2 P-Neuronen.....	65
<b>4.5 Schlussbetrachtung</b> .....	66

<b>5. Zusammenfassung</b> .....	68
<b>6. Anhang</b> .....	71
<b>6.1 Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker TMA<sup>+</sup></b> .....	71
<b>6.2 Charakterisierung des TMA<sup>+</sup>-Aufnahmemechanismus</b> .....	72
<b>6.3 Wirkung von TMA<sup>+</sup> als AChR-Agonist bei Blutegel-Neuronen</b> .....	75
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	79
<b>8. Abbildungen</b> .....	96



## 1. Einleitung

Das Cytoplasma tierischer Zellen wird durch die Plasmamembran vom Extrazellularraum abgegrenzt. Die Plasmamembran ist eine Lipiddoppelschicht, der Proteine ein- und aufgelagert sind, wobei der Proteinanteil je nach Funktion der Plasmamembran zwischen 25 und 75 % variiert (Singer & Nicolson 1972, Nicolson & Singer 1972). Die Plasmamembran stellt eine Permeationsschranke für eine Vielzahl von Stoffen dar, wie anorganische Ionen, Aminosäuren, Proteine und Kohlenhydrate, während sie für Wassermoleküle weitgehend permeabel ist (Lucke & McCutcheon 1932). Die Wasserpermeabilität der Plasmamembran wird oftmals noch durch den Einbau von Aquaporinen, die wasserleitende Kanäle durch die Plasmamembran bilden, verstärkt (Agre 2004).

Im Gegensatz zu Pflanzenzellen sind tierische Zellen nicht durch eine Zellwand vor Volumenänderungen geschützt. Sie sind damit nicht in der Lage, im Zellinneren einen hydrostatischen Druck aufzubauen, sondern ändern ihr Volumen entsprechend den osmotischen Verhältnissen. Bereits geringe osmotische Gradienten zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum führen zu Wasserbewegungen über die Membran und beeinflussen das Zellvolumen. Für das Überleben von Zellen ist es notwendig, übermäßige Volumenänderungen zu vermeiden, da sonst nicht nur die strukturelle Integrität der Zellen im Gewebeverband gefährdet ist, sondern auch die intrazelluläre Homöostase und damit der Zellstoffwechsel entscheidend gestört wird (Lang et al. 1998).

In ihrem Cytosol benötigen Zellen eine Reihe von organischen Substanzen, die für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels essentiell sind, insbesondere Aminosäuren, Kohlenhydrate und energiereiche Verbindungen. Die osmotische Aktivität dieser zumeist anionischen Substanzen würde zu einem Wassereinstrom und damit zur Zellschwellung führen. Um dies zu verhindern und zugleich die Elektroneutralität zu wahren, senken die Zellen ihre intrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration ab und schaffen so „osmotischen Raum“ für die essentiell notwendigen organischen Substanzen.

Da die Plasmamembran für  $\text{K}^+$  erheblich permeabler ist als für  $\text{Na}^+$ , verlässt  $\text{K}^+$  dem Konzentrationsgradienten folgend die Zelle, so dass sich über der Plasmamembran eine Potentialdifferenz aufbaut, d.h. die intrazelluläre Seite der Plasmamembran wird gegenüber der extrazellulären Seite negativ. Diese Potentialdifferenz führt dazu, dass  $\text{Cl}^-$  aus der Zelle

heraus getrieben wird. Da die Plasmamembran auch für  $\text{Na}^+$  permeabel ist, strömt dieses Ion durch „Leckkanäle“ permanent in die Zelle ein.  $\text{Na}^+$ -Einstrom und  $\text{K}^+$ -Ausstrom werden von der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe kompensiert, die pro Zyklus 3  $\text{Na}^+$  aus der Zelle heraus und 2  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein transportiert. Die Ionengradienten müssen von der Zelle ständig aktiv, d.h. unter Verbrauch von Stoffwechselenergie, aufrechterhalten werden. Die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe ist das wichtigste Transportsystem, das zur Stabilisierung des Zellvolumens und der intrazellulären Osmolarität beiträgt (pump-leak steady-state concept; Hoffmann 2001).

Eine Änderung des Zellvolumens unter isotonischen Bedingungen geht immer auf eine Änderung der Anzahl im Cytosol gelöster Teilchen zurück. Die Osmose ist der Mechanismus für den Wassertransport über die Plasmamembran. Es ist daher möglich, Änderungen des Zellvolumens vorherzusagen, die durch Änderungen der intrazellulären Osmolarität ausgelöst werden. Die in die Plasmamembran eingelagerten Proteine stellen häufig spezifische Transportsysteme dar, mit deren Hilfe die Zellen Zusammensetzung und Osmolarität des Cytoplasmas aufrechterhalten oder gezielt verändern können. Für eine Änderung der intrazellulären Osmolarität kommt zunächst der Transport von Ionen in Frage, die besser und rascher über die Plasmamembran gelangen als größere organische Moleküle.

Die wichtigsten anorganischen Ionen, die an der Regulation der intrazellulären Osmolarität beteiligt sind und intrazellulär in relativ hohen Konzentrationen vorkommen, sind  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ . Entsprechend sind Zellen mit einer Vielzahl von Transportsystemen ausgestattet, die eine Aufnahme bzw. Abgabe dieser Ionen ermöglichen. Die Eigenschaften von Transportsystemen, über die Osmolyte in die Zelle aufgenommen oder von der Zelle abgegeben werden können, bestimmen die Anfälligkeit der Zellen für Änderungen des Zellvolumens. Dabei kann zwischen passiven, primär aktiven und sekundär aktiven Mechanismen des Ionentransports unterschieden werden. Der passive Ionentransport erfordert keine Stoffwechselenergie und erfolgt durch Ionenkanäle, die häufig für bestimmte Ionen selektiv sind. Die Richtung des Ionentransports wird nur vom elektrochemischen Gradienten für das betreffende Ion bestimmt. Unter primär aktivem Ionentransport versteht man den Transport von Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten unter Verbrauch von Stoffwechselenergie. Das am besten untersuchte primär aktive Transportsystem ist die bereits erwähnte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe. Von Bedeutung sind aber auch

Ca<sup>2+</sup>-Pumpen, die Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktiv aus dem Cytosol in den Extrazellulärraum oder in intrazelluläre Organellen transportieren (Penniston & Enyedi 1998, Strehler & Treiman 2004). Unter sekundär aktivem Ionentransport versteht man Mechanismen, bei denen der aktiv aufgebaute elektrochemische Gradient eines Ions ausgenutzt wird, um ein anderes Ion gegen seinen elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Beispiele hierfür sind der K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter, der Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauscher, der Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauscher und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Cotransporter (Hoffmann 1986, Lang et al. 1998, Russel 2000, Orłowski et al. 2004).

Spannungsabhängige Ionenkanäle werden durch Änderung des Membranpotentials (E<sub>m</sub>) aktiviert, ligandengesteuerte Ionenkanäle durch die Bindung von Ionen oder kleiner organischer Moleküle. Eine wichtige Untergruppe ligandengesteuerter Ionenkanäle sind ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren, bei denen der „Rezeptor“ Bestandteil eines Ionenkanals ist, der durch die Bindung des Neurotransmitters geöffnet werden kann. Ionenkanäle können auch über metabotrope Rezeptoren aktiviert werden, integrale Membranproteinen mit sieben transmembranalen Domänen, die vom Ionenkanal räumlich getrennt sind. Die Bindung des Neurotransmitters an den Rezeptor aktiviert ein trimeres GTP-bindendes Protein (G-Protein), das eine Second-Messenger-Kaskade auslöst, welche die Kanalaktivität beeinflusst. Einige Ionenkanäle werden mechanisch gesteuert, indem die Energie, die mit einer Membranverformung verbunden ist, über das Cytoskelett an den Kanal weitergeleitet wird. Ionenkanäle können auch durch andere Ionen aktiviert werden. Beispiele dafür sind Ca<sup>2+</sup>- oder Na<sup>+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle, die bei zahlreichen Präparaten beschrieben wurden (Dryer 1994, 2003, Bischoff et al. 1998, Blaustein & Lederer 1999, Lawrence & Rodrigo 2001, Yuan et al. 2003).

Bei der Regulation des Zellvolumens spielen einerseits Mechanismen eine Rolle, die das Fließgleichgewicht im Ruhezustand aufrechterhalten, wie beispielsweise der primär aktive Transport durch die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe (Hernandez & Cristina 1998, Lang et al. 1998, Armstrong 2003). Andererseits werden nach einer durch veränderte osmotische Verhältnisse hervorgerufenen Änderung des Zellvolumens Mechanismen aktiviert, die das ursprüngliche Volumen wiederherstellen („volume set point“; Sarkadi & Parker 1991, Lauf & Adragna 2000). An dieser Regulation des Zellvolumens sind unter anisotonischen Bedingungen neben Ionenkanälen auch sekundär aktive Transportsysteme beteiligt.

Eine Zellschwellung nach Verminderung der extrazellulären Osmolarität löst häufig eine regulatorische Volumenabnahme aus (RVD: „regulatory volume decrease“). Dabei bewirken die beteiligten Transportsysteme eine Abgabe von Osmolyten und einen nach außen gerichteten Wasserfluss. Bei den meisten Zellen beruht RVD auf einem Nettoverlust von KCl (Häussinger 1996), der durch den  $K^+/Cl^-$ -Cotransporter und durch verschiedene andere Transportsysteme vermittelt werden kann (Perry & O’Neill 1993, Nilius et al. 1996, Lang et al. 1998, Lauf & Adragna 2000, Idriss et al. 2000). Die Abgabe organischer Osmolyte kann ebenfalls zu RVD beitragen (Pasantes-Morales et al. 2000).

Einer Zellschrumpfung nach Erhöhung der extrazellulären Osmolarität wirkt oft eine regulatorische Volumenzunahme entgegen (RVI: „regulatory volume increase“), bei der es zu einer Aufnahme von Osmolyten und damit zu einem einwärts gerichteten Wasserfluss kommt. Bei den meisten Zellen erfolgt eine Nettoaufnahme von NaCl (Eveloff & Warnock 1987, O’Neill 1999), wobei je nach Zelltyp unterschiedliche Transportsysteme beteiligt sein können (Adorante & Miller 1990, Bevensee et al. 1999), unter anderem der  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Cotransporter (Häussinger 1996, Wehner & Tinel 1998).

Die Beispiele verdeutlichen, dass alle bisher näher untersuchten Zellvolumenänderungen mit Änderungen der intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentration ( $[Cl^-]_i$ ) einhergehen, die zu einem erheblichen Teil auf den Transport dieses Anions über die Plasmamembran zurückzuführen sind (Hoffmann 1986, Lang et al. 1998, Russell 2000, Armstrong et al. 2003).

Das Zellvolumen beeinflusst eine Vielzahl von zellulären Funktionen, wie den epithelialen Transport, den Zellstoffwechsel, die Freisetzung von Hormonen, das Zellwachstum und die Genexpression (Lang et al. 1998). Eine Volumenzunahme hat vielfach einen stimulierenden Einfluss auf die Synthese von Proteinen sowie von Glykogen, wodurch die Anzahl osmotisch aktiver Monomere sinkt und die intrazelluläre Osmolarität und damit das Zellvolumen verringert wird. In die gleiche Richtung wirkt möglicherweise die Bildung von Cytoskelettproteinen (Tubulin,  $\beta$ -Actin), die ebenfalls durch eine Zellschwellung gefördert wird (Theodoropoulos et al. 1992, Häussinger et al. 1994, Ferrer-Martinez et al. 1996). Umgekehrt führt eine Volumenabnahme zu einer Hemmung von Polymerisationsvorgängen, wodurch die Zahl der gelösten Monomere stabil bleibt oder steigt und damit der Zellschrumpfung entgegen wirkt.

In vielen Gewebetypen müssen Zellen auf äußere Einflüsse reagieren, die das Zellvolumen beeinflussen können. Dies gilt insbesondere für Epithelzellen, die wegen ihrer exponierten Lage ständig Änderungen der extrazellulären Osmolarität ausgesetzt sind. Ein anderer Gewebetyp, dessen Zellen besonderen Herausforderungen gegenüberstehen, ist das Nervengewebe. Neuronen und Gliazellen unterliegen bereits während ihrer normalen Aktivität Änderungen im transmembranalen Elektrolyt- und Wassertransport (Churchwell et al. 1996). Eine Änderung des Zellvolumens hat bei Nervenzellen verheerende Auswirkungen, da die Ionengradienten über der Plasmamembran und die strukturelle Integrität der Zellen Grundvoraussetzungen für die Aufrechterhaltung der Signalübertragung sind. Es ist bekannt, dass viele pathophysiologische Erscheinungen bei Nervenzellen mit einer Änderung des Zellvolumens einhergehen (Colwell & Levine 1996, Scheller et al. 1998).

Das Zentralnervensystem (ZNS) des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) ist ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Ionenhomöostase bei Neuronen und Gliazellen im intakten Gewebeverband (Schlue & Deitmer 1984, Ballanyi et al. 1990a, Schlue 1991, Munsch et al. 1995, Neumann et al. 2001, Dierkes et al. 2003). Wegen der Individualität und der leichten Identifizierbarkeit vieler Neuronen sowie der guten experimentellen Zugänglichkeit ist der Einsatz einer Reihe von Messtechniken möglich, mit deren Hilfe verschiedene zelluläre Parameter simultan erfasst werden können. Das ZNS des Blutegels ist somit geeignet, die ionalen Vorgänge, die Volumenänderungen von Neuronen zugrunde liegen oder diese begleiten, näher zu beschreiben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der ionalen Vorgänge, die unter isotonischen Bedingungen Volumenänderungen bei Blutegel-Neuronen verursachen. Es wurde zunächst ein Profil der elektrophysiologischen Eigenschaften und intrazellulären Ionenkonzentrationen bei verschiedenen Blutegel-Neuronen unter Ruhebedingungen erstellt, um den Einfluss von „Störungen“ der Ruhesituation auf das Zellvolumen quantifizieren zu können. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Verteilung und der Regulation von  $\text{Cl}^-$ . Danach wurden die ionalen Bewegungen und  $E_m$ -Änderungen nach Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe analysiert, um die Bedeutung der elektrochemischen Gradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  für die Konstanthaltung des Zellvolumens zu verstehen. Darüber hinaus wurde anhand von Volumenänderungen, die durch die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren induziert wurden, die Bedeutung des intrazellulären  $\text{Cl}^-$  für die Entstehung und den Abbau der Volumenänderungen näher untersucht und insbesondere

die Bedeutung von  $E_m$  für die Bewegung von  $Cl^-$  über die Plasmamembran analysiert. Darüber hinaus wurden die Ionentransportsysteme identifiziert und näher beschrieben, die einer Änderung des Zellvolumens entgegenwirken und damit die Anfälligkeit der Neuronen gegenüber Volumenänderungen senken.

Einzelne Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits als Originalarbeit (Dierkes et al. 2003) sowie in Form von Tagungsbeiträgen (Klees et al. 2002, Dierkes et al. 2002b, Coulon et al. 2003) veröffentlicht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Präparation

Alle Experimente wurden an identifizierten Neuronen isolierter Segmentalganglien des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* durchgeführt. Die adulten Versuchstiere wurden von der Firma Moser Blutegel (Schorndorf) bezogen.

#### 2.1.1 Der medizinische Blutegel

##### *Systematische Zuordnung*

Der medizinische Blutegel gehört nach der zoologischen Systematik zu den Articulata (Gliedertiere). Unter diesem Begriff werden die Stämme Annelida (Ringelwürmer) und Arthropoda (Gliederfüßler) zusammengefasst. Der Blutegel zählt zu den Anneliden und gehört der Klasse der Clitellata (Gürtelwürmer) an. Er wird der Unterklasse der Hirudinea (Egel) zugeordnet und ist innerhalb dieser Klasse Mitglied der Ordnung der Gnathobdelliformes (Kieferegel).

##### *Körperbau*

Der Körperbau des medizinischen Blutegels (Abb. 1 A) zeigt die für Anneliden typische Metamerie. Der Hautmuskelschlauch gliedert sich in 32 Segmente, von denen jedes 5 einzelne Segmentringe (Annuli) ausbildet. Eine Ausnahme bilden die Segmente im vorderen und hinteren Körperbereich mit 1 bis 4 Annuli (Mann 1962). An jedem Ende seines Körpers besitzt der Blutegel einen Saugnapf. Der hintere, größere Saugnapf dient der Fortbewegung. Der vordere Saugnapf wird von der Mundöffnung durchstoßen und dient zur Fortbewegung und Nahrungsaufnahme.

##### *Aufbau des ZNS*

Die Segmentierung des Hautmuskelschlauchs spiegelt sich auch in der Organisation des ZNS wider (Abb. 1 B). Das für Anneliden typische Strickleiternnervensystem ist beim Blutegel nur noch in modifizierter Form vorhanden. Das ZNS wird von einer ventral liegenden, durch paarige Konnektive verbundenen Segmentalganglienkette gebildet, die aus der Verschmelzung der beiden ursprünglichen Markstränge unter Reduzierung der Kommissuren hervorgegangen ist. Am Vorder- und Hinterende liegen das Kopf- und das

Analganglion, die durch die Verschmelzung der ersten 4 anterioren bzw. der letzten 7 posterioren Segmentalganglien entstanden sind. Jedes der 21 dazwischen liegenden Segmentalganglien enthält ~ 200 Paare homologer und wenige ungepaarte Neuronen (Abb. 2 A,B). Eine Ausnahme bilden die Geschlechtsganglien in den Segmenten 5 und 6, die etwa 750 Neuronen enthalten (Macagno 1980). Jedes Segmentalganglion innerviert das zugeordnete Körpersegment über paarige Axonbündel, die Seitennerven (Muller et al. 1981). Die gesamte Ganglienkette wird vom ventralen Blutsinus umschlossen.

### **2.1.2 Präparation der Segmentalganglien**

Die Präparation der Segmentalganglien erfolgte in einer mit Wachs ausgegossenen Schale. Der Blutegel wurde mit je zwei Stecknadeln durch den vorderen und hinteren Saugnapf in leicht gestrecktem Zustand mit der Ventralseite nach unten fixiert. Mit Hilfe einer Augenschere wurde der Hautmuskelschlauch in Höhe des Kopfganglions geöffnet und zusammen mit der dorsalen Darmwand in posteriorer Richtung entlang der Dorso-medianlinie durchtrennt. Am posterioren Ende wurde der Schnitt so geführt, dass der Enddarm unversehrt blieb, damit die Ganglien durch austretende Verdauungsenzyme nicht geschädigt wurden. Der Hautmuskelschlauch wurde nun aufgeklappt, mit weiteren Stecknadeln fixiert und mit Normalsalzlösung (NSL; siehe 2.2) ausgewaschen, um das Präparat von Darminhalt und Geweberesten zu säubern.

Die weitere Präparation erfolgte unter optischer Kontrolle mit Hilfe eines Binokulars. Mit einer feinen Präparierschere wurde zunächst die ventrale Darmwand direkt über der Ganglienkette durchtrennt. Danach wurde der ventrale Blutsinus im Bereich einer Ganglionkapsel mit einer feinen Pinzette angehoben und geöffnet. Nach Durchtrennung der Konnektive und Seitenwurzeln wurde ein einzelnes Segmentalganglion entnommen, in ein Blockschälchen mit NSL übertragen und bei Raumtemperatur für maximal 8 h aufbewahrt.

### **2.1.3 Identifizierung der Neuronen**

Die untersuchten Blutegel-Neuronen lassen sich anhand ihrer Größe, Lage und elektro-physiologischen Eigenschaften eindeutig identifizieren (Abb. 2). Die Retzius-Neuronen im anterior-medianen Paket besitzen die größten Zellkörper und waren daher mikroskopisch

leicht zu identifizieren. Die P-Neuronen in den posterior-lateralen Paketen ließen sich ebenfalls aufgrund ihrer Größe gut identifizieren. Die in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden Leydig-Neuronen zeigten im elektrophysiologischen Experiment Spontanktivität und waren von den P-Neuronen einfach zu unterscheiden, die nur kurz nach dem Elektrodeneinstich Aktionspotentiale auslösten. Die Zellkörper der AP- und N1-Neuronen in den anterior-lateralen Paketen besitzen eine ähnliche Größe und liegen nah beieinander, so dass sie nur durch ihre Aktionspotentialmuster eindeutig zu identifizieren waren. N1-Neuronen lösten nach dem Elektrodeneinstich für ~ 5 min Aktionspotentiale mit großer Amplitude und einer ausgeprägten Nachhyperpolarisation aus. AP-Neuronen zeigten regelmäßige, spontan auftretende Aktionspotentiale hoher Frequenz und geringer Amplitude.

## 2.2 Versuchslösungen und Pharmaka

Die Versuchslösungen wurden mit Hilfe von 1 M Stammlösungen von KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> und Tetramethylammoniumchlorid (TMA-Cl) hergestellt, NaCl wurde jeweils in fester Form eingewogen. Zur Pufferung des pH-Wertes wurde 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) verwendet. Alle Versuchslösungen wurden mit demineralisiertem Wasser mit einem spezifischen Widerstand von 18 MΩ·cm angesetzt (Entsalzungsanlage: Millipore). Der pH-Wert der Versuchslösungen wurde entweder mit 1 M NaOH, 1 M KOH oder mit 1 M NMDG-OH (N-methyl-D-glucammoniumhydroxid) auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität der Versuchslösungen wurde mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Gonotec) kontrolliert.

Die NSL bestand aus Cl<sup>-</sup>-Salzen folgender Kationen (in mM): 85 Na<sup>+</sup>, 4 K<sup>+</sup>, 2 Ca<sup>2+</sup> und 1 Mg<sup>2+</sup>. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH eingestellt; die Osmolarität betrug 190 mOsmol. In der K<sup>+</sup>-freien Lösung wurde die NaCl-Konzentration um 4 mM zur Aufrechterhaltung der Osmolarität erhöht, der pH-Wert wurde ebenfalls mit NaOH eingestellt. In Na<sup>+</sup>-freier Lösung wurde NaCl durch NMDG-Cl ersetzt. Der pH-Wert wurde mit NMDG-OH eingestellt, die Osmolarität betrug 188 mOsmol. Zur Herstellung der Cl<sup>-</sup>-freien Lösung wurden anstelle der Cl<sup>-</sup>-Salze Gluconatsalze verwendet, der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt. Da die Osmolarität dieser Versuchslösung nur 183 mOsmol betrug und damit

gegenüber NSL leicht hypotonisch war, wurde die Konzentration von Na-Gluconat um 5 mM erhöht.

*Pharmaka zur Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren*

Zur Untersuchung von Zellvolumenänderungen, die auf einer Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren beruhen, wurden unterschiedliche Pharmaka verwendet (Tabelle 1). Carbachol, TMA<sup>+</sup>, Kainat und AMPA wurden aus wässrigen Stammlösungen (1 M, 1 M, 50 mM bzw. 10 mM) in die Versuchslösungen pipettiert, während L-Glutamat und 5-HT (5-Hydroxytryptamin, Serotonin) abgewogen und direkt in den Versuchslösungen gelöst wurden. Der pH-Wert der Versuchslösungen wurde nach Zugabe der Pharmaka stets kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert.

**Tabelle 1: Agonisten verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren**

<b>Substanz</b>	<b>Wirkung ; vollständiger Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>L-Glutamat</b>	Physiologischer Agonist von Glutamat-Rezeptoren; L-Glutaminsäure, Natriumsalz	Sigma
<b>Kainat</b>	Agonist von Glutamat-Rezeptoren des AMPA- und Kainat-Typs; 2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidin	Tocris
<b>(S)-AMPA</b>	Agonist von Glutamat-Rezeptoren des AMPA-Typs; (S)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-propionsäure	Tocris
<b>Carbachol</b>	Unspezifischer Agonist von Acetylcholin-Rezeptoren; Carbamylcholinchlorid	Sigma
<b>TMA<sup>+</sup></b>	Unspezifischer Agonist von Acetylcholin-Rezeptoren; Tetramethylammoniumchlorid Tetramethylammoniumsulfat	Merck Fluka
<b>5-HT</b>	Physiologischer Agonist von 5-HT-Rezeptoren; 3-(2-Aminoethyl)-5-hydroxyindol (5-Hydroxytryptamin, Creatinsulfat-Komplex), anderer Name: Serotonin	Sigma

*In der Versuchsreihe zur TMA<sup>+</sup>-Aufnahme in Abwesenheit von Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> wurde in der Na<sup>+</sup>-freien Lösung das Chloridsalz und in der Cl<sup>-</sup>-freien Lösung das Sulfatsalz von TMA<sup>+</sup> verwendet.*

*Inhibitoren für Ionentransportsysteme*

Zur Hemmung verschiedener Ionentransportsysteme wurden die in Tabelle 2 zusammengestellten Pharmaka verwendet, die als feste Substanzen in NSL gelöst wurden.

**Tabelle 2: Inhibitoren für Ionentransportsysteme**

<b>Substanz</b>	<b>Wirkung / vollständiger Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>TEA<sup>+</sup></b>	Inhibitor spannungsabhängiger K <sup>+</sup> -Kanäle; Tetraethylammonium	Aldrich
<b>Furosemid</b>	Inhibitor des K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Cotransporters und des Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> -Cotransporters; (5-[Aminosulfonyl]-4-chloro-2-[(2-furanylmethyl)amino]benzoesäure)	Sigma
<b>Bumetanid</b>	Inhibitor des Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> -Cotransporters; (3-[Aminosulfonyl]-5-[butylamino]-4-phenoxybenzoesäure)	Sigma
<b>Ouabain</b>	Inhibitor der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Pumpe; (G-Strophanthin; 1 $\beta$ , 3 $\beta$ , 5 $\beta$ , 11 $\alpha$ , 14, 19-Hexahydroxycard-20-enolid-3-[6-deoxyl- $\alpha$ -L-mannopyranosid])	Merck
<b>DIDS</b>	Unspezifischer Inhibitor von Cl <sup>-</sup> -Transportsystemen; 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure	Sigma

**2.3 Messung des Zellvolumens mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Fluoreszenzfarbstoffe besitzen die Eigenschaft, kurzwelliges Licht zu absorbieren und darauf hin längerwelliges Licht zu emittieren. Zur Messung von Ionenkonzentrationen werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren optische Eigenschaften durch die Bindung einer bestimmten Ionensorte spezifisch verändert werden (Tsien 1989). Dabei kann die Ionenbindung eine Verschiebung des Absorptions- und/oder Emissionsspektrums oder auch eine Änderung der Quantenausbeute bewirken. Bei Erfüllung weiterer Kriterien (Photostabilität, hohe Absorption und Quantenausbeute, hohe Selektivität, geeignete Gleichgewichtskonstante, geringe Toxizität, niedrige Membranpermeabilität) können diese Farbstoffe zur Messung der freien cytosolischen Konzentrationen verschiedener Ionen verwendet werden (Haugland 2002). Besitzen diese Farbstoffe darüber hinaus innerhalb ihres Anregungsspektrums einen Isofluarpunkt, d. h. eine Anregungswellenlänge, bei der

die Farbstofffluoreszenz unabhängig von der Konzentration des zu messenden Ions ist, so besteht die Möglichkeit, simultan zur Änderung einer bestimmten Ionenkonzentration auch Änderungen der Farbstoffkonzentration und damit des Zellvolumens zu ermitteln (Muallem et al. 1992, Crowe et al. 1995).

### 2.3.1 Messung von Zellvolumen und $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2

Um Änderungen des Zellvolumens anhand der Fluoreszenzemission zu bestimmen, werden einzelne Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen, die dann als „Volumenmarker“ dienen können (Muallem et al. 1992). In dieser Arbeit wurde der  $Ca^{2+}$ -Indikator Fura-2 verwendet, dessen Eignung zur Volumenmessung bei Bluteigel-Neuronen bereits gezeigt wurde (Wüsten 2004). Die Verwendung von Fura-2 als Volumenmarker ist nur bei Anregung am Isofluarpunkt (Anregungswellenlänge: 360 nm; Abb. 3) möglich, an dem die Fluoreszenzemission von der  $Ca^{2+}$ -Bindung an den Farbstoff unabhängig ist (siehe Muallem et al. 1992, Wüsten 2004).

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurde iontophoretisch in die Neuronen injiziert (siehe 2.3.2.). Dies hatte zum einen den Vorteil, dass die Neuronen anhand ihrer elektrophysiologischer Parameter (siehe 2.1.3) eindeutig identifiziert werden konnten und zum anderen lag der Farbstoff nur im osmotisch aktiven Kompartiment der Zellen, dem Cytosol, vor (siehe Wüsten 2004).

Die mit einer Volumenänderung verbundene Wasseraufnahme bzw. Wasserabgabe (Altamirano et al. 1998) führt zu entsprechenden Änderungen der Farbstoff-Konzentration (Abb. 4). Zur Erfassung dieser Konzentrationsänderungen ist es nötig, die Messung der Fluoreszenzemission auf ein kleines Volumenelement der Zelle zu beschränken, welches von der numerischen Apertur des Objektivs sowie von der vermessenen Region in der Bildebene abhängig ist (Crowe et al. 1995, Altamirano et al. 1998). In den Experimenten wurde ein quadratisches Messfeld mit einer Kantenlänge von 5  $\mu\text{m}$  verwendet, welches bei Retzius-Neuronen (Durchmesser:  $79 \pm 8 \mu\text{m}$ ,  $n = 28$ ; Dierkes 1998) etwa 0,5 % der maximalen Querschnittsfläche entsprach.

Unter idealen Bedingungen verhält sich die Fluoreszenzemission umgekehrt proportional zum Zellvolumen (Alvarez-Leefmans et al. 1995):

$$\frac{F_0 - F_{HF}}{F_{Exp} - F_{HF}} = \frac{V_{Exp}}{V_0} \quad (1)$$

$F_0$  bezeichnet die Fluoreszenz innerhalb des Volumenelements der Zelle unter Kontrollbedingungen,  $F_{Exp}$  die Fluoreszenz unter veränderten experimentellen Bedingungen. Entsprechend bezeichnen  $V_0$  und  $V_{Exp}$  das Wasservolumen der Zelle unter Kontrollbedingungen bzw. bei veränderten experimentellen Bedingungen.  $F_{HF}$  ist die Hintergrundfluoreszenz des Präparats, die zur Korrektur von der jeweiligen Gesamtfluoreszenz subtrahiert werden muss, um die Fluoreszenz des eingebrachten Farbstoffs zu ermitteln.

Zur Messung von  $[Ca^{2+}]_i$  mit Fura-2 wurde die von Grynkiewicz et al. (1985) entwickelte Ratio-Methode verwendet (siehe auch Hochstrate & Schlue 1994, Dierkes 1998). Hierbei wird der Farbstoff mit zwei Wellenlängen (hier 360 und 380 nm) alternierend angeregt und  $[Ca^{2+}]_i$  aus dem Verhältnis ('ratio' = R) der entsprechenden Fluoreszenzintensitäten ( $F_{360}$ ,  $F_{380}$ ) bestimmt:

$$R = \frac{F_{360}}{F_{380}} \quad (2)$$

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot F \cdot \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \quad (3)$$

Dabei steht  $K_d$  für die Dissoziationskonstante des  $Ca^{2+}$ -Fura-2-Komplexes und F für einen Korrekturfaktor, der apparative Parameter und physikalische Farbstoffeigenschaften wie Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute beinhaltet (siehe Dierkes 1998, Wüsten 2004).  $R_{min}$  gibt den minimalen Wert für R wieder, der bei Abwesenheit von  $Ca^{2+}$  erreicht wird, und  $R_{max}$  den maximalen Wert, der sich bei  $Ca^{2+}$ -Sättigung des Farbstoffs einstellt.

Die Werte für  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und für den Korrekturfaktor F wurden durch eine *in vitro*-Eichung ermittelt (Abb. 3). Die Eichlösungen enthielten 100  $\mu$ 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  $\text{CaCl}_2$ , während die Lösung mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form stattdessen 10 mM Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA, Sigma) enthielt. Die Lösungen wurden zur Eichung in Messkammern mit einer Schichtdicke von 150  $\mu\text{m}$  und einem Volumen von  $\sim 5 \mu\text{l}$  pipettiert und in derselben Apparatur vermessen, in der auch die Volumen- und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen erfolgten. Es wurden folgende Parameter ermittelt:  $R_{\min} = 0,3$ ,  $R_{\max} = 2,7$  und  $F = 6,8$ . Für  $K_d$  wurde ein Wert von 135 nM verwendet, der unter Bedingungen gemessen wurde, die annähernd den hier gegebenen Versuchsbedingungen entsprachen (100 mM KCl, 20° C, pH 7,1 - 7,2; Grynkiewicz et al. 1985). Der Zusammenhang zwischen R und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist in Abb. 3 B dargestellt.

### 2.3.2 Fura-2-Injektion

Zur iontophoretischen Fura-2 Injektion wurde das Segmentalganglion mit der Ventralseite nach oben in einen speziellen Halter eingespannt, der sich in einer mit NSL gefüllten Kunststoffwanne befand (Hochstrate & Schlue 1994, Dierkes 1998, Wüsten 2000). Als Injektionselektroden dienten filamenthaltige Glaskapillaren (GC150F-15, äußerer/innerer Durchmesser: 1,5/0,86 mm, Harvard Apparatus LTD), die mit einem Vertikalpuller (Narishige PE-2) ausgezogen wurden. Die Spitze der Glaskapillaren wurde mit einer wässrigen Farbstofflösung (100 mM Fura-2,  $\text{K}^+$ -Salz) gefüllt, mit einem Silberdraht ( $\varnothing 0,1$  mm) versehen und mit Hartklebewachs (Deiberit 502) versiegelt. Der Widerstand der Injektionselektroden betrug in NSL  $\sim 100 \text{ M}\Omega$ . Mit einem Mikromanipulator wurde die Injektionselektrode unter optischer Kontrolle in das jeweilige Neuron eingestochen, wobei der Einstich über ein Oszilloskop (PM3233, Philips) verfolgt wurde. Außerdem wurden das Membranpotential ( $E_m$ ) sowie Amplitude und Frequenz spontan auftretender Aktionspotentiale registriert. Die Fura-2-Injektion erfolgte über einen Iontophoreseverstärker (L/M-1, List) mit negativen Injektionsströmen (20 nA, P-Neuronen: 20 s, Retzius-Neuronen: 60 s). Unmittelbar nach der Farbstoffinjektion wurde das Präparat mitsamt Halterung in die Messkammer des Mikrofluorimeters überführt.

### 2.3.3 Aufbau des Mikrofluorimeters

Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein kommerzielles Mikrofluorimeter (Deltascan 4000, Photon Technology International, PTI) verwendet, das aus vier Grundelementen bestand: Lichtquelle mit Monochromatoren, Mikroskop, Photometer und einem Rechner zur Datenaufnahme (Abb. 5).

Das Licht zur Fluoreszenzanregung wurde von zwei Xenon-Kurzbogenlampen (UXL-75XE, 75 Watt, Ushio) geliefert. Über zwei rotierende Sektorscheiben (Chopper) wurde der Lichtbogen alternierend auf die Eintrittsspalten zweier Paare von Gittermonochromatoren projiziert, die das Anregungslicht in seine spektralen Anteile zerlegten. Das Anregungslicht der gewählten Wellenlängen gelangte dann über einen Quarzlichtleiter in den Epifluoreszenzeingang eines Umkehrmikroskops (Diaphot-TMD, Nikon) und anschließend durch ein UV-durchlässiges Objektiv (Fluor 40Ph 3DL, V = 40x, Nikon) zum Präparat. Das vom Präparat emittierte Licht wurde über das Objektiv aufgefangen und durch ein Sperrfilter (BA 510/540, Nikon) vom Anregungslicht getrennt. Eine Halogenlampe oberhalb des Präparats ermöglichte die Betrachtung im Durchlicht und diente in Kombination mit zwei Blau-Filtern mit UV-Durchlass (BG3, BG12, Schott) auch zur Fluoreszenzanregung bei der Justierung des Präparats.

Das Photometer (PMT 4000, PTI) bestand aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) sowie optischen Hilfsmitteln zur Einstellung des Messfelds. Die Spannungspulse über dem Arbeitswiderstand des SEVs, die aus dem Photonenstrom in den SEV resultierten, wurden von einer Zähl Elektronik registriert, die über ein Interface mit dem Computer verbunden war. Zur Datenaufnahme und -verarbeitung wurde dieselbe Software (PTI) verwendet, die auch zur Steuerung von Chopper, Shutter und Monochromatoren benutzt wurde.

Das Präparat wurde mit dem Halter in einer Versuchswanne befestigt, deren Boden aus einem Deckglas bestand (Dicke 0,15 mm) und die sich auf dem Objektisch des Mikroskops befand. Der Lösungszufluss erfolgte über ein Schlauchsystem mit einem Lösungsverteiler, so dass immer nur eine Lösung in die Versuchswanne floss. Der gleichmäßige Abfluss der Versuchslösungen wurde über einen Streifen aus Fliesspapier mit Abflusseinrichtung gewährleistet. Die Durchflussrate des Systems betrug 4,3 ml/min und das

Volumen der Lösung in der Versuchswanne ~ 0,15 ml, so dass die Versuchslösung ~ 30 mal pro min ausgetauscht wurde.

## 2.4 Ionensensitive Glasmikroelektroden

Die Technik elektrolytgefüllter Glasmikroelektroden ist seit den ersten  $E_m$ -Messungen von Ling und Gerard (1949) an Froschmuskelfasern eine etablierte Methode zur Untersuchung elektrophysiologischer Eigenschaften einzelner Zellen. Eine Weiterentwicklung dieser Technik stellen ionensensitive Glasmikroelektroden zur Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen dar, die seit Anfang der 70er Jahre verwendet werden (Walker 1971).

### 2.4.1 Theoretische Grundlagen

Ionensensitive Glasmikroelektroden ermöglichen die Messung der intrazellulären Aktivität bzw. Konzentration einer einzelnen Ionensorte innerhalb eines Gemisches unterschiedlicher Ionen. Bei ionensensitiven Glasmikroelektroden ist die Elektrodenspitze mit einem Sensorcocktail („Flüssigmembran-Ionophor“) gefüllt, in dem in einer organischen Phase Carriermoleküle gelöst sind, die im Idealfall nur eine bestimmte Ionensorte binden, die so genannten Messionen. Die Carriermoleküle ermöglichen den Eintritt der Messionen aus der Versuchslösung in die Flüssigmembran und machen damit die Flüssigmembran für die Messionen selektiv permeabel. Der Ionenfluss in den Sensor führt zu einer Potentialdifferenz über der Membran, die durch die Nernst-Gleichung beschrieben werden kann und als Ionenpotential ( $E_{Ion}$ ) bezeichnet wird. Bei Messungen in Zellen ist das Potential einer ionensensitiven Glasmikroelektrode nicht nur durch  $E_{Ion}$  bestimmt, sondern auch durch  $E_m$ , d.h. das elektrische Potential des Cytosols bezogen auf das Potential des geerdeten Extrazellulärraums. Ionensensitive Glasmikroelektroden registrieren somit die Summe aus  $E_{Ion}$  und  $E_m$ , und entsprechend muss zur Berechnung von  $E_{Ion}$  vom registrierten Elektrodenpotential  $E_m$  subtrahiert werden. Zur Bestimmung von  $E_m$  wird eine elektrolytgefüllte Referenzelektrode zusätzlich in die Zelle eingestochen. Um die Zellen nicht durch den Einstich mehrerer Elektroden zu verletzen, wurden in dieser Arbeit ionensensitive Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs sowie Zwei- bzw. Dreikanal-Glasmikroelektroden des gedrehten Typs verwendet (Abb. 6). Diese ionensensitiven Glasmikro-

elektroden verfügten über einen Referenzkanal zur Messung von  $E_m$  sowie über einen bzw. zwei ionensensitive Kanäle (Schlue et al. 1997).

Eine ideale ionensensitive Flüssigmembran sollte nur für eine Ionensorte permeabel sein. In diesem Fall lässt sich das über der Flüssigmembran aufgebaute Potential  $E$  durch die Nernst-Gleichung (8) beschreiben (Ammann 1986):

$$E = E_0 + s \cdot \log a_i \quad (8)$$

$E$ : Potential der ionensensitiven Messzelle

$E_0$ : Standardpotential

$s$ : Nernst-Steigung

$a_i$ : Aktivität des Messions  $i$

Die Nernst-Steigung ( $s$ ) ist definiert durch:

$$s = 2,303 \frac{R \cdot T}{z_i \cdot F} \quad (9)$$

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

$T$ : absolute Temperatur (K)

$z_i$ : Ladungszahl des Messions

$F$ : Faradaykonstante ( $96487 \text{ C mol}^{-1}$ )

Bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  beträgt die Nernst-Steigung  $s$  für ein einfach geladenes Ion  $59 \text{ mV}$  pro Dekade.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Flüssigmembran-Ionophore zur Messung der intrazellulären Konzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{TMA}^+$  wiesen Interferenzen mit anderen Ionen („Störionen“) auf, die somit zum Potential  $E$  beitragen. Daraus resultiert bei niedrigen Messionenaktivitäten eine Abweichung von der Proportionalität zwischen  $E$  und dem Logarithmus der Messionenaktivität. Der Zusammenhang zwischen  $E$ , Messionen- und Störionenaktivität wird durch die Nikolsky-Eisenman-Gleichung (10) beschrieben (Eisenman 1962, Ammann 1986):

$$E = E_0 + s \cdot \log \left[ a_i + \sum_i k_{i,j}^{pot} \left( a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (10)$$

$a_i, a_j$ : Aktivität des Messions / Störions

$z_i, z_j$ : Ladungszahl des Messions / Störions

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

Der potentiometrische Selektivitätskoeffizient ( $k_{i,j}^{pot}$ ) stellt ein Maß für die Bevorzugung des Messions gegenüber einem definierten Störion dar.

Bei hoher Messionenaktivität verhält sich E proportional zum Logarithmus der Messionenaktivität  $a_i$ , so dass sich Gl. (10) der Nernst-Gleichung (8) annähert. Mit abnehmender Messionenaktivität nähert sich E asymptotisch einem konstanten Wert an, der dem Potentialbeitrag der Störionenaktivität  $a_j$  entspricht. Der Punkt an dem Mession und Störionen zu gleichen Teilen zu E beitragen, wird als Detektionslimit  $a_i^0$  bezeichnet. Das Detektionslimit stellt definitionsgemäß die kleinste Messionenaktivität dar, die vor einem Störionen-hintergrund messbar ist. Graphisch entspricht das Detektionslimit der Konzentration des Messions am Schnittpunkt der beiden Asymptoten der Eichkurve. Durch Gleichsetzen der Gl. (8) und (10) ergibt sich für das Detektionslimit:

$$a_i^0 = \sum_i k_{i,j}^{pot} \left( a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}} \quad (11)$$

Das Einsetzen von Gl. (11) in Gl. (10) liefert eine Beziehung, nach der E dem Logarithmus der Summe von Messionenaktivität und Detektionslimit proportional ist:

$$E = E_0 + s \cdot \log(a_i + a_i^0) \quad (12)$$

Durch Umwandlung der Ionenaktivität in die Konzentration  $c$  (mit  $a = c \cdot \gamma$ ) ergibt sich:

$$E = E_0 + s \cdot \log(\gamma_i \cdot c_i + \gamma_i \cdot c_i^0) \quad (13)$$

$\gamma$ : Aktivitätskoeffizient

$c$ : Ionenkonzentration

Da der Aktivitätskoeffizient  $\gamma_i$  des Messions in den Eichlösungen nur um 2% variiert (siehe Ammann 1986) und  $E_0$  und  $s$  konstant sind, lässt sich Gl. (13) vereinfachen:

$$E = E_0 + s \cdot \log \gamma_i + s \cdot \log(c_i + c_i^0)$$

mit  $E_0 + s \cdot \log \gamma_i = E_0'$  ergibt sich:

$$E = E_0' + s \cdot \log(c_i + c_i^0) \quad (14)$$

#### 2.4.2 Herstellung ionensensitiver Glasmikroelektroden

##### *Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs*

Für die Herstellung der ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs wurden 7,5 cm lange Theta-Glaskapillaren (TGC 150-15 bzw. TGC 200-15, Clark Electromedical Instruments) verwendet, die in einem Vertikalpuller (Narishige PE-2) zu zwei Mikrokapillaren mit geringem Spitzendurchmesser ( $< 1 \mu\text{m}$ ) ausgezogen wurden (Abb. 6 A).

Da die verwendeten Sensorcocktails alle hydrophob sind, musste vor der Füllung des späteren ionensensitiven Elektrodenkanals die hydrophile Glasoberfläche hydrophob gemacht werden. Dies wurde durch die Reaktion der Hydroxyl-Gruppen der inneren Glasoberfläche mit einer organischen Silanverbindung (Hexamethyldisilan, HMDS, Fluka) erreicht, bei der Trimethylsilanreste an der Glasoberfläche gebunden werden (Ammann 1986). Die Silanisierung erfolgte nach dem von Kilb (1994) modifizierten Dampfverfahren von Coles und Tsacopoulos (1977). Während der 90- bis 100-minütigen Bedampfung mit HMDS wurde in den späteren Referenzkanal Druckluft geblasen, um ihn vor der Silanisierung zu schützen. Die Mikrokapillaren wurden nach der Silanisierung für

mindestens zwei Stunden in einem Ofen auf 200 °C erhitzt und anschließend im Exsikkator über Kieselgel gelagert. Die silanisierten Elektrodenrohlinge konnten so über mehrere Tage bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ionensensitive Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs als  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - oder  $\text{TMA}^+$ -sensitive Glasmikroelektroden verwendet. Die Füllung der Glasmikrokapillaren erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge. Zuerst wurde der Sensorcocktail in den Elektrodenrohling eingebracht. Dazu wurde ein fein ausgezogener Kunststoffschlauch in den Sensorcocktail eingetaucht und anschließend in die hintere Öffnung des silanisierten Kanals bis zur Verjüngung der Glasmikrokapillare eingeführt. Mittels einer Spritze, die mit dem hinteren Ende des Schlauchs verbunden war, wurde der Sensor in den Kanal gedrückt, in dem er sich nun durch Kapillarkräfte getrieben entlang der mittleren Trennwand bis in die Spitze des Kanals vorzog. Anschließend wurde der Referenzkanal mit Elektrolytlösung gefüllt. Zur Beseitigung von Luftblasen wurden die Glasmikroelektroden gegebenenfalls in einem Exsikkator einem Unterdruck ausgesetzt. Nach Überschichtung des Sensorcocktails mit einer entsprechenden „Backfill“-Lösung wurden beide Kanäle mit einem chlorierten Silberdraht versehen und mit Hartklebewachs versiegelt. In Tabelle 3 sind die verwendeten Sensorcocktails mit den dazugehörigen Backfill- und Referenzlösungen aufgelistet. Die ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden konnten in vertikaler Lage mit der Spitze in NSL über mehrere Tage aufbewahrt werden.

**Tabelle 3: Verwendete Ionophore, Backfill- und Referenzlösungen**

Mession	Ionophore	Backfill	Referenz
K <sup>+</sup> bzw. TMA <sup>+</sup>	Corning 477317	100 mM KCl	3 M Li-Acetat + 8 mM KCl
			0,5 M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 8 mM KCl
K <sup>+</sup>	I-Cocktail B (Valinomycin)	100 mM KCl	3 M Li-Acetat + 8 mM KCl
			0,5 M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 8 mM KCl
Na <sup>+</sup>	I-Cocktail A (ETH 227)	100 mM NaCl	0,5 M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 8 mM KCl
Cl <sup>-</sup>	I-Cocktail A	500 mM KCl	3 M Li-Acetat + 8 mM KCl
			0,5 M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 8 mM KCl

*Corning 477317 stammte aus dem institutseigenen Vorrat, die übrigen Ionophore wurden bei Fluka bezogen. Bei den durchgeführten Experimenten wurden je nach Versuchsbedingungen verschiedene Referenzlösungen verwendet (siehe 2.4.7).*

#### *Zwei- und Dreikanal-Glasmikroelektroden des gedrehten Typs*

Zur Herstellung der ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden des gedrehten Typs wurden zwei Einzelkanal-Glaskapillaren verwendet (ionensensitiver Kanal: GC 150-F-15, Referenzkanal: GC100-F-15, Clark Electromedical Instruments; Abb. 6 B). Die Glaskapillare für den späteren Referenzkanal wurde auf eine Länge von 6,5 cm gekürzt und an die Glaskapillare für den späteren ionensensitiven Kanal mit einer Länge von 7,5 cm zentriert angeklebt, so dass der ionensensitive Kanal an beiden Enden 0,5 cm überstand. Zur Aushärtung des Klebers (Araldit, Zweikomponentenkleber) wurden die Glaskapillaren für 60 min auf 60 °C erwärmt.

Das Ausziehen der Glaskapillaren erfolgte mit Hilfe eines Vertikalpullers (Narishige PE-2) in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Glaskapillaren ohne Zug erhitzt, um durch Drehung um die Längsachse den Referenzkanal um 180 ° um den ionensensitiven Kanal zu wickeln. Dabei wurden die Glaskapillaren um nicht mehr als 2 mm ausgezogen. Nach

Abkühlung wurden die Glaskapillaren im zweiten Schritt vollständig zu Mikrokapillaren ausgezogen.

Die Silanisierung des späteren ionensensitiven Kanals wurde nach der Dampfmethode von Berridge & Schlue (1978) durchgeführt, bei der die als Referenzkanal vorgesehene Mikrokapillare durch Füllung mit destilliertem Wasser vor der Silanisierung geschützt wird. Nach einer Silanisierungszeit von 90-100 min wurden die Glasmikrokapillaren wiederum für mindestens zwei Stunden auf 200 °C erhitzt, wobei das Wasser im Referenzkanal verdampfte. Die Füllung der Elektrodenrohlinge erfolgte analog zur Füllung der Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs.

Die Herstellung der ionensensitiven Dreikanal-Glasmikroelektroden des gedrehten Typs (Abb.6 C) erfolgte auf die gleiche Weise wie die der gedrehten Zweikanal-Glasmikroelektroden, mit dem Unterschied, dass für die späteren ionensensitiven Kanäle an Stelle einer Einzelkanal-Glaskapillare eine Theta-Glaskapillare (TGC 150-15, Clark Electro-medical Instruments) verwendet wurde. Ionensensitive Zweikanal- und Dreikanal-Glasmikroelektroden des gedrehten Typs wurden als  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{TMA}^+$ -sensitive Glasmikroelektroden verwendet. Dementsprechend kamen auch die gleichen Sensoren sowie die entsprechenden Backfill- und Referenzlösungen zum Einsatz (siehe Tabelle 3).

### **2.4.3 Eichung ionensensitiver Glasmikroelektroden**

$\text{Na}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -sensitive Glasmikroelektroden zeigen bei ihrer Eichung innerhalb physiologischer Ionenkonzentrationen kein lineares Verhalten, so dass Mehrpunkteichungen notwendig sind. Es wurden überwiegend Vierpunkteichungen durchgeführt, da diese ausreichten, um mittels der Nicolsky-Eisenman-Gleichung eine hinreichend genaue Eichkurve zu erstellen (Abb. 7).

Die Zusammensetzungen der verwendeten  $\text{K}^+$ -Eichlösungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Die Gesamtionenstärke der Eichlösungen wurde konstant gehalten, indem die Summe der Konzentrationen von  $\text{KCl}$  und  $\text{NaCl}$  immer 100 mM betrug. Als  $\text{K}^+$ -Ionophor wurde sowohl Valinomycin als auch Corning 477317 verwendet.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der K<sup>+</sup>-Eichlösungen**

<b>K<sup>+</sup>-Konzentration</b>	<b>KCl (mM)</b>	<b>NaCl (mM)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>HEPES (mM)</b>	<b>Osmolalität (mOsmol/kg)</b>
100 mM	100	0	0,5	10	201,5
25 mM	25	75	0,5	10	
5 mM	5	95	0,5	10	
0 mM	0	100	0,5	10	202,5
pH: 7,3 mit NaOH					

Da der verwendete Na<sup>+</sup>-Ionophor (ETH 227) eine starke Interferenz gegenüber Li<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen zeigt (Selektivitätskoeffizient:  $k_{Na, Li}^{pot} = 0,40$ ,  $k_{Na, Ca}^{pot} = 0,63$ ; Fluka), wurden zum einen die Eichlösungen mit 1 mM EGTA und 0,73 mM CaCl<sub>2</sub> auf eine Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 10<sup>-7</sup> M gepuffert (Pershadsingh & McDonald 1980). Dies entsprach in etwa der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von Retzius-Neuronen (Hochstrate & Schlue 1994, Hochstrate et. al. 1995). Zum anderen wurde der Referenzkanal ausschließlich mit 0,5 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 8 mM KCl gefüllt. Die Zusammensetzungen der Na<sup>+</sup>-Eichlösungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Na<sup>+</sup>-Eichlösungen**

<b>Na<sup>+</sup>- Konzentration</b>	<b>NaCl (mM)</b>	<b>KCl (mM)</b>	<b>CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>HEPES (mM)</b>	<b>EGTA (mM)</b>	<b>Osmolarität (mOsmol/kg)</b>
50 mM	50	80	0,73	0,5	10	1	259,5
10 mM	10	80	0,73	0,5	10	1	
2,5 mM	2,5	80	0,73	0,5	10	1	
0 mM	0	80	0,73	0,5	10	1	169,5
pH: 7,3 mit KOH							

Zur Eichung Cl<sup>-</sup>-sensitiver Glasmikroelektroden wurden anstelle der Cl<sup>-</sup>-Salze Gluconat-salze verwendet. Die gewünschte Cl<sup>-</sup>-Konzentration wurde durch den Austausch von K-Gluconat gegen KCl eingestellt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Cl<sup>-</sup>-Eichlösungen**

Cl <sup>-</sup> Konzentration	KCl (mM)	K- Gluconat (mM)	Na- Gluconat (mM)	Mg- Gluconat (mM)	HEPES (mM)	Osmolarität (mOsmol/kg)
50 mM	50	30	5	0,5	10	171,5
12,5 mM	12,5	67,5	5	0,5	10	
3 mM	3	77	5	0,5	10	
0 mM	0	80	5	0,5	10	168,5
pH: 7,30 mit KOH						

In Tabelle 7 sind die ermittelten „Nernstschen“ Steigungen und die Detektionslimits der verwendeten ionensensitiven Glasmikroelektroden zusammengefasst. Im Hinblick auf die Steigung wurden für die jeweiligen Sensoren keine signifikanten Unterschiede zwischen Zwei- und Dreikanal-Glasmikroelektroden festgestellt. Signifikante Unterschiede im Detektionslimit wurden nur bei den beiden K<sup>+</sup>-Sensoren beobachtet.

**Tabelle 7: Nernstsche Steigungen (s) und Detektionslimits ( $c_i^0$ ) der verwendeten ionensensitiven Glasmikroelektroden**

Ionophor	Anzahl der Kanäle	s (mV/Dekade)	$c_i^0$ (mM)
K <sup>+</sup> (Corning 477317)	2 (n = 119)	-48,3 ± 3,9	1,2 ± 0,5
	3 (n = 24)	-46,7 ± 6,4	2,0 ± 0,8 **
K <sup>+</sup> (Valinomycin)	2 (n = 22)	-48,4 ± 6,1	1,1 ± 0,8
	3 (n = 13)	-51,3 ± 5,2	0,6 ± 0,4 *
Na <sup>+</sup> (ETH 227)	2 (n = 12)	-49,2 ± 3,3	1,7 ± 0,9
	3 (n = 38)	-45,0 ± 6,6	2,0 ± 1,0
Cl <sup>-</sup> (Cocktail A)	2 (n = 27)	48,4 ± 6,1	0,7 ± 0,7
	3 (n = 17)	46,2 ± 8,4	0,7 ± 0,7

Mittelwerte ± S.D. aus n = 12-119 Messungen. Die Parameter der Zweikanal-Glasmikroelektroden wurden mit denen der Dreikanal-Glasmikroelektroden auf signifikante Unterschiede hin überprüft (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

#### 2.4.4 Messung des Zellvolumens mit TMA<sup>+</sup> als Volumenmarker

Die Anwendung ionensensitiver Glasmikroelektroden zur Registrierung des Zellvolumens ist deshalb möglich, weil Änderungen des Zellvolumens auf einer Wasseraufnahme bzw. Wasserabgabe der Zellen beruhen und somit entsprechende Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen auftreten. Zur Volumenmessung ist es notwendig, die Zellen mit einem Volumenmarker zu beladen, der bestimmte Kriterien erfüllen muss: 1. Die Konzentration des Volumenmarkers muss mit Hilfe ionensensitiver Glasmikroelektroden in Gegenwart der physiologisch vorkommenden intrazellulären Ionen bestimmt werden können. 2. Der Volumenmarker sollte unter physiologischen Bedingungen nicht in der Zelle vorkommen. 3. Der Volumenmarker sollte nicht metabolisiert werden oder in den Zellmetabolismus eingreifen. 4. Der Volumenmarker sollte nur eine geringe Membranpermeabilität aufweisen.

Der K<sup>+</sup>-Ionophor Corning 477317 ist für quaternäre Ammoniumionen wesentlich sensitiver als für K<sup>+</sup> (Neher & Lux 1973). Diese Eigenschaft ermöglicht die Bestimmung des Zellvolumens mit Hilfe quaternärer Ammoniumionen als Volumenmarker (Reuss 1985, Ballanyi et al. 1990, Alvarez-Leefmans 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde TMA<sup>+</sup> (Tetramethylammonium) als Volumenmarker verwendet, dessen Eignung bei Blutegel-Neuronen bereits gezeigt wurde (Neumann et al. 2001, Neumann 2003). Da Blutegel-Neuronen TMA<sup>+</sup> aktiv aufnehmen können, erfolgte die Beladung der Neuronen durch extrazelluläre Applikation von 5 mM TMA-Cl. In einigen Versuchen wurde die TMA-Cl-Konzentration auf 10 mM erhöht, um die Beladung zu beschleunigen. Anhand der intrazellulären TMA<sup>+</sup>-Konzentration ([TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) ist es nun möglich, auf Änderungen des Zellvolumens zu schließen. Ein Anstieg von [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> entspricht einer Volumenabnahme, ein Abfall einer Volumenzunahme. Die relative Volumenänderung lässt sich anhand der [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> unter Kontrollbedingungen ([TMA<sup>+</sup>]<sub>Kon</sub>) und unter experimentell geänderten Bedingungen ([TMA<sup>+</sup>]<sub>Exp</sub>) mit folgender Gleichung berechnen (Ballanyi et al. 1990):

$$\Delta Vol. = \frac{[TMA^+]_{Kon}}{[TMA^+]_{Exp}} - 1$$

Die Berechnung des Zellvolumens ist auf diese Weise nur möglich, wenn die Änderungen von  $[TMA^+]_i$  ausschließlich auf Änderungen des Zellvolumens beruhen. Die in dieser Arbeit untersuchten Neuronen zeigten jedoch alle einen kontinuierlichen  $TMA^+$ -Verlust, der in guter Näherung einer einfachen Exponentialfunktion folgte und somit bei der Berechnung des Zellvolumens berücksichtigt werden konnte (Abb. 8).

Die  $TMA^+$ -Aufnahme der untersuchten Neuronen bei extrazellulärer  $TMA^+$ -Applikation ist im Anhang dokumentiert. Dort werden weiterführende Experimente vorgestellt, die den  $TMA^+$ -Aufnahmemechanismus der Neuronen näher charakterisieren. Darüber hinaus wird die Wirkung von  $TMA^+$  auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neuronen erläutert.

#### 2.4.5 Eichung $TMA^+$ -sensitiver Glasmikroelektroden

Wegen der Sensitivität von Corning 477317 für  $K^+$  und  $TMA^+$  wurden die Elektroden meist für beide Ionensorten geeicht. Der  $K^+$ -Hintergrund der  $TMA^+$ -Eichlösungen (Tabelle 8) entsprach annähernd der bekannten  $[K^+]_i$  bei Blutegel-Neuronen (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 8: Zusammensetzung der  $TMA^+$ -Eichlösungen**

<b>TMA-Cl Konzentration</b>	<b>KCl (mM)</b>	<b>NaCl (mM)</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>HEPES (mM)</b>	<b>Osmolarität (mOsmol/kg)</b>
10 mM	80	5	0,5	10	195
2,5 mM	80	5	0,5	10	
0,5 mM	80	5	0,5	10	
0 mM	80	5	0,5	10	174,5
pH: 7,3 mit NaOH					

In Tabelle 9 sind die Nernstschen Steigungen und Detektionslimits der verwendeten TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden zusammengefasst. Die bei Zweikanal- und Dreikanal-Glasmikroelektroden erhaltenen Werte für  $s$  und  $c_i^0$  waren praktisch identisch.

**Tabelle 9: Nernstsche Steigung ( $s$ ) und Detektionslimit ( $c_i^0$ ) der TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden**

Ionophor	Anzahl der Kanäle	$s$ (mV/Dekade)	$c_i^0$ (mM)
TMA <sup>+</sup>	2 (n = 155)	-58,8 ± 7,2	0,15 ± 0,07
Corning 477317	3 (n = 23)	-58,3 ± 6,8	0,17 ± 0,07

Mittelwerte ± S.D. aus  $n = 23$  bzw. 155 Messungen

Da eine Änderung des Zellvolumens mit Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen verbunden ist, wurde der Einfluss des ionalen Hintergrunds auf die TMA<sup>+</sup>-Empfindlichkeit der ionensensitiven Glasmikroelektroden untersucht. Dazu wurden sechs modifizierte 7-Punkt-Eichungen (10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1, 0 mM TMA<sup>+</sup>) durchgeführt, die dann jeweils mit einer konventionellen 7-Punkt-Eichung verglichen wurden. Die Eichlösungen für die konventionellen 7-Punkt-Eichung hatten folgenden konstanten ionalen Hintergrund (in mM): 80 KCl, 5 NaCl, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Die Osmolarität der Eichlösungen lag zwischen 195 mOsmol/kg (10 mM TMA<sup>+</sup>) und 174 mOsmol/kg (TMA<sup>+</sup>-frei).

#### Modifizierte Eichlösungen

Um den Einfluss einer erhöhten Gesamtionenstärke auf die TMA<sup>+</sup>-Empfindlichkeit der Glasmikroelektroden zu untersuchen, wurden 3 Eichungen mit Lösungen durchgeführt, die zusätzlich entweder 100 mM KCl, 100 mM NaCl oder 200 mM Saccharose enthielten. Die Osmolarität der +100 mM KCl-Lösungen lag zwischen 375 (10 mM TMA<sup>+</sup>) und 359 mOsmol/kg (TMA<sup>+</sup>-frei), die der +100 mM NaCl-Lösungen zwischen 372 und 359 mOsmol/kg und die der +200 mM Saccharose-Lösungen zwischen 414 und 394 mOsmol/kg. Der Einfluss einer verringerten Gesamtionenstärke auf die TMA<sup>+</sup>-Empfindlichkeit wurde mit Eichlösungen untersucht, deren KCl-Konzentration um 40 mM abgesenkt war. Die Osmolaritäten dieser Lösungen lagen zwischen 123 und 105 mOsmol/kg. Der Einfluss eines Austauschs von K<sup>+</sup> gegen Na<sup>+</sup> wurde anhand von Eichlösungen untersucht, in denen 40 bzw. 60 mM KCl durch NaCl ersetzt waren. Der pH-

Wert war bei allen Eichlösungen mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Eine Übersicht der mit den modifizierten Eichlösungen ermittelten Detektionslimits gibt Tabelle 10.

**Tabelle 10: Detektionslimit ( $c_i^0$ ) von TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden in Lösungen mit unterschiedlichen Ionenhintergrund**

Konzentration (mM)	Kontrolle	+ 100 KCl	+ 100 NaCl	+ 200 Sacc.	- 40 KCl	- 40 KCl + 40 NaCl	- 60 KCl + 60 NaCl
$c_i^0$ (mM TMA <sup>+</sup> )	0,10 ± 0,02	0,18 ± 0,03 **	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,05 ± 0,00 **	0,05 ± 0,00 **	0,03 ± 0,00 **

Mittelwerte ± S.D. aus n = 3 bis 7 Messungen. Die Ergebnisse der Eichungen unter veränderten ionalen bzw. osmotischen Bedingungen wurden auf signifikante Unterschiede zur Kontrolleichung hin überprüft (\*\*: p ≤ 0,01).

Hochsignifikante Abweichungen vom Detektionslimit unter Kontrollbedingungen zeigten sich jeweils bei den Eichungen mit einem veränderten K<sup>+</sup>-Hintergrund. K<sup>+</sup>-Ionen stellen erwartungsgemäß die Hauptstörionen bei der Bestimmung der TMA<sup>+</sup>-Konzentration mittels des Ionophors Corning 477317 dar (siehe 2.4.1, Gl. 12). Entsprechend war das Detektionslimit bei erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentration hochsignifikant vergrößert und bei erniedrigter K<sup>+</sup>-Konzentration hochsignifikant verkleinert. Eine Erhöhung der Gesamtionenstärke und/oder der Osmolarität (+100 mM NaCl; +200 mM Saccharose) beeinflussten das Detektionslimit nicht signifikant.

Die Änderungen des Ionenpotentials bei den einzelnen Eichschritten wurden bestimmt und jeweils auf signifikante Unterschiede zur konventionellen Eichung hin überprüft (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Änderung des Ionenpotentials (in mV) von TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden bei schrittweiser Erniedrigung der TMA<sup>+</sup>-Konzentration in Lösungen mit unterschiedlichem Ionenhintergrund**

Konzentration (mM)	Kontrolle	+ 100 KCl	+ 100 NaCl	+ 200 Sacc.	- 40 KCl	- 40 KCl + 40 NaCl	- 60 KCl + 60 NaCl
10 auf 5	-51,6 ± 3,7	-49,3 ± 2,5	-51,6 ± 2,9	-50,0 ± 5,2	-49,0 ± 2,1	-49,3 ± 5,3	-48,6 ± 2,1
5 auf 2,5	-49,4 ± 3,3	-51,1 ± 2,4	-51,6 ± 4,1	-51,8 ± 6,3	-51,8 ± 3,2	-52,2 ± 3,1	-51,8 ± 3,5
2,5 auf 1	-50,0 ± 3,7	-45,5 ± 4,2	-50,1 ± 3,9	-51,6 ± 5,1	-51,5 ± 4,1	-51,4 ± 2,3	-51,8 ± 2,1
1 auf 0,5	-51,0 ± 4,0	-43,1 ± 3,0 **	-49,9 ± 6,3	-56,2 ± 6,0	-50,3 ± 1,4	-50,2 ± 1,8	-52,8 ± 4,3
0,5 auf 0	-15,2 ± 1,1	-9,8 ± 1,3 **	-15,5 ± 0,8	-15,0 ± 1,7	-20,3 ± 1,2 **	-20,1 ± 0,7 **	-24,5 ± 1,0 **

Mittelwerte ± S.D. aus  $n = 3$  bis 7 Messungen. Die Ergebnisse der Eichungen unter veränderten ionalen bzw. osmotischen Bedingungen wurden auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle hin überprüft (\*\*:  $p \leq 0,01$ ).

Die Eichkurven der TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden verliefen unabhängig vom Ionenhintergrund zwischen 10 und 1 mM TMA<sup>+</sup> linear, wobei sich die Steigungen nicht signifikant unterschieden. Unterhalb von 1 mM TMA<sup>+</sup> wurde der Einfluss von K<sup>+</sup> auf das Ionenpotential deutlich, insbesondere im Bereich von 0,5 bis 0 mM TMA<sup>+</sup>: Bei erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentration war die TMA<sup>+</sup>-Sensitivität vermindert, bei erniedrigter K<sup>+</sup>-Konzentration dagegen erhöht. Zusammenfassend zeigten die Befunde, dass die TMA<sup>+</sup>-Empfindlichkeit der Glasmikroelektroden bei einer minimalen TMA<sup>+</sup>-Konzentration von 0,5 mM von der Gesamtionenstärke (siehe +100 mM NaCl, +200 mM Saccharose, -40 mM KCl) und dem Austausch von Na<sup>+</sup> gegen K<sup>+</sup> unabhängig ist (siehe -40 bzw. -60 KCl gegen +40 bzw. +60 mM NaCl) und nur durch deutliche Erhöhung der K<sup>+</sup>-Konzentration (siehe +100 KCl) beeinflusst wird. Die TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden sind daher bei einer  $[TMA^+]_i > 0,5$  mM geeignet, um Änderungen des Zellvolumens zuverlässig zu messen.

### 2.4.6 Verwendung kombinierter Eichlösungen

Bei Mehrkanal-Glasmikroelektroden mit unterschiedlichen Ionophoren beansprucht die Eichung aller Kanäle viel Zeit. Aus diesem Grund wurden zwei kombinierte Eichlösungen hergestellt, die eine erhebliche Zeitersparnis erbrachten. Die kombinierten Eichlösungen erlaubten eine parallele Eichung der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-sensitiven sowie der TMA<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-sensitiven Kanäle (Abb. 9). Die Zusammensetzungen der Eichlösungen sind in Tabelle 12 und 13 zusammengestellt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung der kombinierten K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Eichlösungen**

<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>KCl</b>	<b>NaCl</b>
100	0	100	0
95	5	95	5
75	25	75	25
25	75	25	75
5	95	5	95
0	100	0	100
pH: 7,3 mit NMDG-OH			

Konzentrationsangaben in mM. Alle Eichlösungen enthielten 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM HEPES. Die freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration war auf ~10<sup>-7</sup> M gepuffert.

**Tabelle 13: Zusammensetzung der kombinierten TMA<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Eichlösungen**

<b>TMA<sup>+</sup></b>	<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>KCl</b>	<b>TMACl</b>	<b>K-Gluconat</b>
10 mM	70 mM	60	10	40
2,5 mM	12,5 mM	10	2,5	90
0,5 mM	3 mM	2,5	0,5	97,5
0 mM	0 mM	0	0	100
pH: 7,3 mit NMDG-OH				

Konzentrationsangaben in mM. Alle Eichlösungen enthielten 5 mM Na-Gluconat, 0,5 mM Mg-Gluconat und 10 mM HEPES. Die Cl<sup>-</sup>-Konzentration wurde durch die Verwendung von KCl und TMA-Cl eingestellt.

Die kombinierten Eichlösungen wurden durch Vergleich mit den konventionellen Eichlösungen („1-Ion-Eichungen“) auf ihre Eignung überprüft (Abb. 10). Die Steigungen und Detektionslimits, die mit kombinierten und konventionellen Eichlösungen bestimmt wurden, wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Tabelle 14, 15).

**Tabelle 14: „Nernstsche“ Steigungen (in mV/Dekade) von K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- und TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden mit konventionellen (konv.) und kombinierten (komb.) Eichlösungen**

Eichung	K <sup>+</sup>		Na <sup>+</sup>		Cl <sup>-</sup>		TMA <sup>+</sup>	
	konv.	komb.	konv.	komb.	konv.	komb.	konv.	komb.
Mittelwert	-53,57	-51,23	-50,88	-48,48	45,40	50,30	-60,63	-61,03
SD	6,27	5,34	3,56	4,59	1,40	2,54	4,85	3,24
n	3	3	4	4	3	3	4	4

**Tabelle 15: Detektionslimits (in mM) von K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- und TMA<sup>+</sup>-sensitiven Glasmikroelektroden mit konventionellen (konv.) und kombinierten (komb.) Eichlösungen**

Eichung	K <sup>+</sup>		Na <sup>+</sup>		Cl <sup>-</sup>		TMA <sup>+</sup>	
	konv.	komb.	konv.	komb.	konv.	komb.	konv.	komb.
Mittelwert	0,50	0,41	1,39	1,65	0,36	0,42	0,15	0,17
SD	0,31	0,31	0,32	0,67	0,34	0,35	0,06	0,03
n	3	3	4	4	3	3	4	4

#### 2.4.7 Verwendung unterschiedlicher Referenzlösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene ionensensitive Glasmikroelektroden eingesetzt, die sich in einer Reihe von Parametern unterschieden. Da die verwendeten Ionophore unterschiedlich starke Interferenz gegenüber anderen Ionen zeigten, wie beispielsweise der Na<sup>+</sup>-Sensor gegenüber Li<sup>+</sup> (siehe 2.4.3), war je nach Versuchsbedingungen der Einsatz zweier unterschiedlicher Referenzlösungen notwendig (3 M Li-Acetat + 8 mM KCl und 0,5 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 8 mM KCl). Die ermittelten Werte für E<sub>m</sub> von Retzius-Neuronen waren von der Füllung des Referenzkanals unabhängig.

### 2.4.8 Aufbau der Messapparatur

Der Versuchsaufbau war zur elektrischen Abschirmung in einem Faradaykäfig untergebracht. Er bestand aus einer Versuchswanne, zwei Mikromanipulatoren (Leitz) sowie den Messköpfen der Verstärker. Nach Eichung der ionensensitiven Glasmikroelektroden wurden die Segmentalganglien in der mit Sylgard (Dow Corning) ausgegossenen Versuchswanne (Volumen 0,2 ml) an ihren Konnektiven und Seitenwurzeln mit Minutienadeln festgesteckt. Die Ventralseite der Segmentalganglien zeigte nach oben, so dass die Neuronzellkörper deutlich zu erkennen und für den Einstich der Glasmikroelektroden leicht zugänglich waren. Der Lösungsaustausch erfolgte über ein Superfusionssystem, wobei die Lösung an der einen Seite in die Versuchswanne gelangte und an der anderen Seite wieder abgesaugt wurde. Der Lösungszufluss wurde durch eine Peristaltikpumpe (Watson-Marlow) angetrieben, der Lösungsabfluss durch eine Scheibenpumpe. Die Durchflussrate betrug 2,7 ml/min, das Kammervolumen wurde 14 mal pro min ausgetauscht. Der Lösungszufluss wurde über einen Windkessel geleitet, um die Entstehung störender Luftblasen zu vermeiden. Die Erdung des Versuchsbads erfolgte über eine Agarbrücke (3% Agar in 3 M KCl). Der Einstich der Glasmikroelektroden in das jeweilige Neuron wurde unter optischer Kontrolle (Binokular, Zeiss) durchgeführt. Die ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden wurden an einen Zweikanal-Differenzverstärker mit zwei hochohmigen Eingängen angeschlossen (WPI FD 223;  $R = 10^{15} \Omega$ ). Bei Messungen mit mehr Kanälen bzw. mit zwei ionensensitiven Glasmikroelektroden wurden zwei weitere Verstärker verwendet (WPI Duo 773, Kanal A hochohmig:  $R=10^{15} \Omega$ , Kanal B niederohmig:  $R=10^{11} \Omega$ ). Wegen des vergleichsweise geringen Eingangswiderstands wurden die Kanäle B ausschließlich zur Registrierung der Referenzsignale verwendet. Die Ausgangssignale wurden nach Digitalisierung mittels eines Analog-Digital-Wandlers (Digidata 1322A, Axon Instruments) von einem PC (AMD Duron 750 MHz) mittels des Datenerfassungsprogramms AxoScope aufgezeichnet (Version 8.1 bzw. 9.0, Axon Instruments). Die Auswertung der digitalisierten Daten wurde mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) durchgeführt.

## 2.5 Messung des Eingangswiderstands

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei verschiedener Blutegele-Neuronen Messungen des Eingangswiderstands ( $R_{\text{Input}}$ ) durchgeführt. Dabei wurde neben einer Einzelkanal- oder einer ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode eine weitere Einzelkanal- oder Zweikanal-Glasmikroelektrode in das Neuron eingestochen. Über diese Elektrode wurden alle 10 s hyperpolarisierende Strompulse von -1 bis -5 nA bei einer Pulsdauer von 1 s injiziert, die von einem Injektionsverstärker erzeugt wurden (A310 Accupulser, WPI).  $R_{\text{Input}}$  wurde aus der Amplitude der durch den Strompuls induzierten Membranhyperpolarisation bestimmt. Die Ausgangssignale wurden mit einer Rate von 20 Hz registriert.

### 3. Ergebnisse

Die Beschreibung der Ergebnisse ist folgendermaßen gegliedert. Zuerst werden die elektrophysiologischen Parameter und insbesondere die intrazellulären Ionenkonzentrationen der Neuronen im Ruhezustand charakterisiert, um später die Auswirkungen von „Störungen“ des Ruhezustands auf das Zellvolumen näher zu quantifizieren. Anschließend werden einige Aspekte des Cl<sup>-</sup>-Transports näher untersucht, da Cl<sup>-</sup> bei der Kontrolle des Zellvolumens als Gegenion von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> eine besondere Rolle spielt. Der Ionenmechanismus von Zellvolumenänderungen wurde anhand von Störungen des Ruhezustands untersucht, die experimentell durch die Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe oder durch die Aktivierung von Glutamat- bzw. 5-HT-Rezeptoren induziert wurden. Abschließend werden Na<sup>+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle bei P-Neuronen beschrieben, die für einige ungewöhnliche Eigenschaften dieser Neuronen verantwortlich sind.

#### 3.1 Elektrophysiologische Parameter und intrazelluläre Ionenkonzentrationen unter Ruhebedingungen

##### 3.1.1 Ruhewerte von [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, E<sub>m</sub> und R<sub>Input</sub>

Die Verwendung ionensensitiver Glasmikroelektroden erlaubte es, simultan E<sub>m</sub> sowie, je nach verwendetem Ionophor, die intrazellulären Konzentrationen von K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> ([K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>) zu bestimmen. Unmittelbar nach dem Einstich der Glasmikroelektroden waren E<sub>m</sub> und die intrazellulären Ionenkonzentrationen noch nicht stationär, stellten sich jedoch innerhalb von 10 bis 15 min auf konstante Werte ein. Der „Einheilungsvorgang“ war dabei vom verwendeten Elektrodentyp unabhängig. Sowohl bei Verwendung von Zweikanal- als auch von Dreikanal-Glasmikroelektroden wurden vergleichbare E<sub>m</sub>-Ruhewerte gemessen. In den Experimenten zur Bestimmung von R<sub>Input</sub> wurden zwei Glasmikroelektroden in ein einzelnes Neuron eingestochen, wobei verschiedene Elektrodenkombinationen verwendet wurden (siehe 2.5, 3.6). Der Einstich zweier Glasmikroelektroden stellte offenbar keine größere „Belastung“ für die Zellen dar, da sich sowohl für E<sub>m</sub> als auch für die intrazellulären Ionenkonzentrationen nach 10 bis 15 min vergleichbare, konstante Messwerte einstellten. Die E<sub>m</sub>- und R<sub>Input</sub>-Ruhewerte sowie die Ruhewerte der intrazellulären Ionenkonzentrationen sind in Tabelle 16 wiedergegeben.

Die bei den untersuchten Neuronen ermittelten  $E_m$ -Werte stimmen mit Messwerten aus früheren Arbeiten gut überein (Schlue & Deitmer 1984, Lucht 1997, Dierkes 1998, Hintz 1999, Hintz et al. 1999, Kilb & Schlue 1999). Die bei den verschiedenen Neuronen ermittelten  $R_{\text{Input}}$ -Werte unterschieden sich voneinander und spiegeln wahrscheinlich die unterschiedliche Größe der Neuronenzellkörper wider. Retzius-Neuronen wiesen mit  $\sim 10$   $M\Omega$  den geringsten  $R_{\text{Input}}$ -Wert auf. Für P- und AP-Neuronen wurden etwa doppelt so große  $R_{\text{Input}}$ -Werte ermittelt und bei N1- und Leydig-Neuronen war  $R_{\text{Input}}$  mit 28 bzw. 39  $M\Omega$  am größten.

**Tabelle 16:  $E_m$ ,  $R_{\text{Input}}$  und intrazelluläre Ionenkonzentrationen unter Ruhebedingungen**

	<b>Retzius</b>	<b>P</b>	<b>AP</b>	<b>N1</b>	<b>Leydig</b>
<b><math>[K^+]_i</math></b> (mM)	$88 \pm 19$ n = 69	$83 \pm 14$ n = 27	$85 \pm 28$ n = 5	$72 \pm 17$ n = 11	$61 \pm 11$ n = 17
<b><math>E_m</math></b> (mV)	$-43,1 \pm 7,9$	$-46,0 \pm 7,2$	$-35,3 \pm 3,2$	$-47,5 \pm 8,4$	$-37,8 \pm 8,4$
<b><math>[Na^+]_i</math></b> (mM)	$10,1 \pm 5,0$ n = 16	$11,8 \pm 7,8$ n = 17	$6,3 \pm 2,8$ n = 6	$10,0 \pm 7,0$ n = 5	$10,4 \pm 6,9$ n = 4
<b><math>E_m</math></b> (mV)	$-43,9 \pm 10,3$	$-41,3 \pm 7,8$	$-36,2 \pm 2,7$	$-39,3 \pm 2,8$	$-39,5 \pm 8,4$
<b><math>[Cl^-]_i</math></b> (mM)	$12,7 \pm 6,9$ n = 48	$17,1 \pm 5,1$ n = 34	$11,3 \pm 2,7$ n = 8	$14,6 \pm 2,8$ n = 7	$13,3 \pm 4,0$ n = 6
<b><math>E_m</math></b> (mV)	$-43,0 \pm 6,9$	$-41,7 \pm 5,7$	$-38,9 \pm 4,7$	$-40,0 \pm 4,6$	$-36,7 \pm 4,1$
<b><math>[Ca^{2+}]_i</math></b> (nM)	$79 \pm 8$ n = 19	$54 \pm 13$ n = 18	$86 \pm 19$ n = 5	$65 \pm 7$ n = 5	$91 \pm 14$ n = 5
<b><math>R_{\text{Input}}</math></b> ( $M\Omega$ )	$9,9 \pm 2,2$ n = 52	$20,7 \pm 7,0$ n = 16	$22,0 \pm 3,7$ n = 18	$27,7 \pm 10,0$ n = 11	$38,7 \pm 10,0$ n = 7
<b><math>E_m</math></b> (mV)	$-44,8 \pm 6,7$	$-43,4 \pm 6,8$	$-35,1 \pm 5,8$	$-42,9 \pm 5,9$	$-43,4 \pm 6,1$

Mittelwerte  $\pm$  S.D aus  $n = 4$ -185 Messungen. In die Auswertung gingen nur Neuronen ein, deren  $E_m$  nach der Stabilisierung negativer als  $-30$  mV war.  $R_{\text{Input}}$  wurde anhand der Verstellung von  $E_m$  bei Injektion von hyperpolarisierenden Strompulsen bestimmt ( $-1$  bis  $-3$  nA). Die  $[K^+]_i$ -Werte bei Retzius-, P-, N1- und Leydig-Neuronen wurden sowohl mit Corning 477317-gefüllten als auch mit Valinomycin-gefüllten Glasmikroelektroden bestimmt. Dem  $[K^+]_i$ -Wert bei AP-Neuronen liegen nur Messungen mit Valinomycin-gefüllten Glasmikroelektroden zugrunde, da die mit Corning 477317 erhaltenen Werte offensichtlich artifiziell erhöht waren. Die intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) unter Ruhebedingungen wurde mikrofluorimetrisch mit Fura-2 10 bis 15 Minuten nach der Farbstoffinjektion ermittelt. Die  $E_m$ , die jeweils bei der Messung von  $[K^+]_i$ ,  $[Na^+]_i$ ,  $[Cl^-]_i$  und  $R_{\text{Input}}$  simultan bestimmt wurden, sind klein gedruckt.

Bei N1- und Leydig-Neuronen wurde  $[K^+]_i$  ausschließlich mit dem klassischen Ionenaustauscher Corning 477317 bestimmt, während bei Retzius-, P- und AP-Neuronen auch Glasmikroelektroden mit Valinomycin als  $K^+$ -Sensor verwendet wurden. Bei Retzius- und P-Neuronen unterschieden sich die mit den beiden Sensoren bestimmten  $[K^+]_i$ -Werte nicht voneinander, während bei AP-Neuronen mit Corning 477317 eine signifikant höhere  $[K^+]_i$  gemessen wurde als mit Valinomycin ( $117 \pm 33$  mM,  $n = 8$  bzw.  $85 \pm 28$  mM,  $n = 5$ ). Diese Diskrepanz könnte auf der Sensitivität von Corning 477317 für Cholin beruhen (Ballanyi & Schlue 1989, Ballanyi et al. 1990, Neumann et al. 2001; Abb. 11). Falls AP-Neuronen cholinerg sind, wäre das Corning 477317-Signal nicht nur durch  $[K^+]_i$ , sondern auch durch die intrazelluläre CholinKonzentration bestimmt und somit  $[K^+]_i$  überschätzt. Für Retzius- und P-Neuronen wurde gezeigt, dass diese nicht zu den cholinergen Neuronen des Blutegels gehören (Wallace & Gillon 1982). Eine Diskrepanz zwischen den mit Corning 477317- bzw. mit Valinomycin-gefüllten Glasmikroelektroden erhaltenen Daten war bei Retzius- und P-Neuronen daher nicht zu erwarten und wurde auch nicht beobachtet.

Bei Retzius-, P- und AP-Neuronen lag  $[K^+]_i$  im Mittel bei  $\sim 87$  mM. Bei N1-Neuronen war  $[K^+]_i$  signifikant und bei Leydig-Neuronen hoch signifikant niedriger als bei den anderen Neuronen. Die Werte für  $[Na^+]_i$  bei Retzius-, P-, N1- und Leydig-Neuronen variierten zwischen 10 und 12 mM, während bei AP-Neuronen geringere Werte gemessen wurden. Die Werte für  $[Cl^-]_i$  bei Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen unterschieden sich nicht voneinander ( $\sim 12$  mM), bei N1-Neuronen war  $[Cl^-]_i$  tendenziell und bei P-Neuronen deutlich höher. Die  $[Ca^{2+}]_i$  der Neuronen variierten zwischen 50 und 90 nM, was mit Ergebnissen aus früheren Arbeiten im Einklang steht (siehe Dierkes 1998).

### 3.1.2 Zusammenhang zwischen $[K^+]_i$ , $[Na^+]_i$ bzw. $[Cl^-]_i$ und $E_m$

Die unter Ruhebedingungen bei einem gegebenen Neuronentyp ermittelten  $[K^+]_i$ -,  $[Na^+]_i$ - und  $[Cl^-]_i$ -Werte variierten zum Teil erheblich. Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen  $E_m$  und der jeweiligen Ionenkonzentration besteht, wurden  $[K^+]_i$ ,  $[Na^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  gegen  $E_m$  aufgetragen (Abb. 12). Die  $[K^+]_i$ -Werte der Neuronen schwankten zwischen 50-120 mM, eine Abhängigkeit von  $E_m$  konnte bei keinem der Neuronentypen festgestellt werden. Die ermittelten  $[Na^+]_i$  der untersuchten Neuronen lagen überwiegend zwischen 5 und 20 mM. Bei Retzius-Neuronen war  $[Na^+]_i$  umso kleiner, je negativer  $E_m$  war. Ob bei

AP-, N1- oder Leydig-Neuronen ein Zusammenhang zwischen  $[\text{Na}^+]_i$  und  $E_m$  besteht, war nicht auszumachen, da die  $E_m$ -Werte bei diesen Neuronen nur wenig variierten. Bei P-Neuronen scheint keine Abhängigkeit zwischen  $[\text{Na}^+]_i$  und  $E_m$  zu bestehen, zumal mehrere Neuronen bei negativem  $E_m$  relativ hohe  $[\text{Na}^+]_i$ -Werte aufwiesen. Die Werte für  $[\text{Cl}^-]_i$  variierten zwischen 5 und 25 mM, wobei alle Neuronentypen die Tendenz zeigten, dass  $[\text{Cl}^-]_i$  mit zunehmender Negativierung von  $E_m$  immer kleiner wurde.

### 3.1.3 $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei den verschiedenen Neuronentypen

Der Zusammenhang zwischen  $[\text{Cl}^-]_i$  und  $E_m$  könnte als Anzeichen für eine passive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung gewertet werden. Tatsächlich wurde eine passive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei P-Neuronen vermutet (Munsch et al. 1995), bei Retzius-Neuronen dagegen eine aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung (Munsch & Schlue 1993, Munsch et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Auftragung des  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtspotentials ( $E_{\text{Cl}}$ ) gegen  $E_m$ , dass  $E_{\text{Cl}}$  bei allen untersuchten Neuronen meist negativer als  $E_m$  war, also überwiegend eine aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung vorlag (Abb. 13 A). Die Differenz zwischen den Mittelwerten von  $E_{\text{Cl}}$  und  $E_m$  war bei Retzius-, AP-, Leydig- und N1-Neuronen jedoch größer als bei P-Neuronen (Retzius: 10,9 mV, AP: 15,5 mV, Leydig: 13,8 mV, N1: 7,5 mV, P: 4,0 mV; Abb. 13 B). Mit Ausnahme der P-Neuronen war der Unterschied zwischen  $E_{\text{Cl}}$  und  $E_m$  bei allen Neuronen signifikant. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der  $\text{Cl}^-$ -Verteilung und der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran besteht, wurde die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit anhand der  $R_{\text{Input}}$ -Änderung bestimmt, die bei unspezifischer Hemmung der  $\text{Cl}^-$ -Kanäle durch die Applikation von 0,5 mM DIDS auftrat. Die Versuche wurden bei Retzius- und P-Neuronen durchgeführt, da diese sich hinsichtlich ihrer  $\text{Cl}^-$ -Verteilung deutlich unterschieden. Bei Retzius-Neuronen nahm  $R_{\text{Input}}$  um ~ 20 %, bei P-Neuronen nur um ~ 5 % zu (Abb. 14). Dieses Ergebnis widersprach den Erwartungen, da eine hohe  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit eher eine passive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung begünstigen sollte und umgekehrt eine geringe  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit eine aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung. Retzius-Neuronen müssen daher über einen ausgeprägten  $\text{Cl}^-$ -Auswärtstransport verfügen, um trotz hoher  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit die aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung aufrecht zu erhalten.

Um ein Maß für die Geschwindigkeit des Cl<sup>-</sup>-Transports bei den verschiedenen Neuronen zu erhalten, wurde die Cl<sup>-</sup>-Abgaberate nach Entfernen des extrazellulären Cl<sup>-</sup> bestimmt. In Cl<sup>-</sup>-freier Lösung verloren alle Neuronen ihr intrazelluläres Cl<sup>-</sup>, jedoch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten (Abb. 15). Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen zeigten vergleichbare Abgaberraten von  $3,3 \pm 1,2$  mM/min (n = 5),  $2,9 \pm 1,2$  mM/min (n = 4) bzw.  $2,6 \pm 0,7$  mM/min (n = 4). Die Abgaberraten der P- und N1-Neuronen waren mit  $1,3 \pm 0,5$  mM/min (n = 5) bzw.  $1,5 \pm 0,4$  mM/min (n = 6) signifikant kleiner. Diese Ergebnisse widersprechen den Befunden von Munsch et al. (1995), nach denen die Abnahme von [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> nach Cl<sup>-</sup>-Entfernung bei Retzius-Neuronen langsamer erfolgt als bei P-Neuronen. Die hier bestimmten Cl<sup>-</sup>-Abgaberraten bei Retzius- und P-Neuronen stehen jedoch mit den ermittelten Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten der beiden Neuronentypen im Einklang (Abb. 14). Nach Wiedergabe des extrazellulären Cl<sup>-</sup> stellte sich bei allen Neuronen innerhalb von 10-15 min die ursprüngliche [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> wieder ein.

Entgegen der Erwartung verursachte das Entfernen des extrazellulären Cl<sup>-</sup> bei allen Neuronen eine anhaltende Membranhyperpolarisation, deren Ursache bis jetzt unbekannt ist. Bei P-, N1- und AP-Neuronen setzte die Membranhyperpolarisation unmittelbar nach dem Überwechseln in die Cl<sup>-</sup>-freie Badlösung ein ( $-11,1 \pm 2,1$  mV, n = 5;  $-11,4 \pm 2,7$  mV, n = 6 bzw.  $-10,3 \pm 9,6$  mV, n = 4). Wie an der hohen Standardabweichung zu erkennen ist, war die Membranhyperpolarisation bei AP-Neuronen variabel (Einzelwerte: -12,3 mV, -22,6 mV, -6,2 mV), bei einer der 4 Messungen blieb eine Membranhyperpolarisation sogar völlig aus. Bei Retzius- und Leydig-Neuronen ging in den meisten Experimenten der Membranhyperpolarisation ( $-6,0 \pm 1,8$  mV, n = 5 bzw.  $-6,5 \pm 1,9$  mV, n = 4) eine transiente Membrandepolarisation voraus ( $7,0 \pm 5,9$  mV, n = 4 bzw.  $4,0 \pm 1,8$  mV, n = 2), die vermutlich auf den Cl<sup>-</sup>-Ausstrom zurückzuführen ist. In Cl<sup>-</sup>-freier Badlösung generierten alle Neuronen spontan Salven von Aktionspotentialen („Bursts“), die bis zum Überwechseln in Cl<sup>-</sup>-haltige Badlösung andauerten (siehe Munsch et al. 1995, Beck et al. 2001). Die Wiedergabe des extrazellulären Cl<sup>-</sup> verursachte häufig eine anfängliche Membranhyperpolarisation, nach der E<sub>m</sub> wieder auf den Ausgangswert zurückkehrte.

## 3.2 Cl<sup>-</sup>-Regulation bei Retzius- und P-Neuronen

Wie die meisten Zellen verfügen Neuronen über verschiedene Cl<sup>-</sup>-Transportsysteme, von denen einige Cl<sup>-</sup> in die Zelle hinein und andere Cl<sup>-</sup> aus der Zelle heraus transportieren. Von besonderer Bedeutung für die beschriebene aktive Cl<sup>-</sup>-Verteilung der Neuronen sind Transportsysteme, die einen Cl<sup>-</sup>-Ausstrom bewerkstelligen. Für den Cl<sup>-</sup>-Ausstrom kommen zwei verschiedene Cl<sup>-</sup>-Transporter in Frage, zum einen der Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher, der zusammen mit dem K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauscher KCl aus der Zelle transportiert, und zum anderen der K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter (Lang et al. 1998). Unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen, d.h. bei nominalem Fehlen von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in den Versuchslösungen, sollte nur der K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter in der Lage sein, Cl<sup>-</sup> aus der Zelle heraus zu transportieren. In den folgenden Experimenten wurde die mögliche Rolle des K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters bei der Aufrechterhaltung der aktiven Cl<sup>-</sup>-Verteilung bei Blutegel-Neuronen untersucht. Wegen der deutlichen Unterschiede hinsichtlich ihrer Cl<sup>-</sup>-Verteilung wurden die Experimente erneut an Retzius- und P-Neuronen durchgeführt.

### 3.2.1 Hemmung des K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters: Wirkung auf E<sub>m</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>

Bei Retzius-Neuronen verursachte die Applikation von 0,5 mM Furosemid, einem unspezifischen Inhibitor des K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters (Hoffmann 1986, Russel 2000), nur eine geringe Membrandepolarisation um  $2,0 \pm 3,8$  mV ( $n = 13$ ). Innerhalb von 10 min stieg [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> um  $5,2 \pm 3,0$  mM an, ohne jedoch einen stationären Wert zu erreichen (Abb. 16 A). Durch diese Verschiebungen näherten sich E<sub>Cl</sub> und E<sub>m</sub> einander an, d.h. die aktive Cl<sup>-</sup>-Verteilung ging tendenziell in eine passive Verteilung über. Vor der Furosemid-Applikation lag E<sub>m</sub> bei  $-43,1 \pm 7,0$  mV und E<sub>Cl</sub> bei  $-56,7 \pm 10,6$  mV, nach 10 min in Furosemid betrug E<sub>m</sub>  $-41,1 \pm 6,7$  mV und E<sub>Cl</sub>  $-46,9 \pm 10,8$  mV. P-Neuronen reagierten auf Furosemid überwiegend mit einer Membranhyperpolarisation um  $-1,4 \pm 1,7$  mV ( $n = 5$ ), die von einem geringen [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg um  $1,6 \pm 1,1$  mM begleitet war, der nach 10 min ebenfalls noch andauerte (Abb. 16 B). Vor der Furosemid-Applikation lag E<sub>m</sub> bei  $-38,8 \pm 4,2$  mV und E<sub>Cl</sub> bei  $-47,0 \pm 5,2$  mV, nach 10 min in Furosemid betrug E<sub>m</sub>  $-40,2 \pm 3,2$  mV und E<sub>Cl</sub>  $-44,5 \pm 5,1$  mV. Auch bei P-Neuronen näherten sich also E<sub>Cl</sub> und E<sub>m</sub> einander an. Die Befunde deuten darauf hin, dass sowohl bei Retzius- als auch bei P-Neuronen der K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter an der aktiven Cl<sup>-</sup>-Verteilung beteiligt ist.

### 3.2.2 Hemmung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters: Wirkung auf $E_m$ und $[\text{Cl}^-]_i$

Furosemid inhibiert auch den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (Hoffmann 1986), der den gekoppelten Einwärtstransport von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und zwei  $\text{Cl}^-$  vermittelt (Häussinger 1996, Wehner & Tinel 1998). Um zu prüfen, ob in die beschriebene Furosemid-Wirkung bei Retzius- und P-Neuronen (Abb. 16) auch die Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters involviert ist, wurde bei beiden Neuronentypen die Wirkung des spezifischen Inhibitors Bumetanid untersucht (Wehner & Tinel 1998, Russel 2000; Abb. 17). Retzius-Neuronen reagierten auf die Applikation von 0,1 mM Bumetanid mit einer Membrandepolarisation um  $3,4 \pm 3,7$  mV und einem  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg um  $3,0 \pm 2,0$  mM ( $n = 10$ , Abb. 17 A). Die Daten variierten jedoch erheblich, denn bei 7 der 10 untersuchten Retzius-Neuronen hatte Bumetanid nur eine geringe Wirkung auf  $E_m$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  ( $1,3 \pm 1,5$  mV bzw.  $2,0 \pm 1,2$  mM). Bei P-Neuronen wurde weder  $E_m$  ( $-1,3 \pm 1,5$  mV  $n = 4$ ) noch  $[\text{Cl}^-]_i$  ( $0,2 \pm 1,0$  mM) nennenswert durch Bumetanid verändert (Abb. 17 B). Diesen Ergebnissen nach spielt der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter bei der  $\text{Cl}^-$ -Regulation von Retzius- und P-Neuronen nur eine untergeordnete Rolle.

### 3.3 Hemmung der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe: Wirkung auf $E_m$ , $[\text{Na}^+]_i$ , $[\text{K}^+]_i$ , $[\text{Cl}^-]_i$ und Zellvolumen

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe ist das wichtigste aktive Transportsystem, das an der Aufrechterhaltung des zellulären Fließgleichgewichts und damit auch des Zellvolumens beteiligt ist (pump-leak steady-state concept; Hoffman 2001). Die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe durch Ouabain führt zum Zusammenbruch der Ionengradienten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  sowie zu einem Anstieg von  $[\text{Cl}^-]_i$  und ist in der Regel von einer Zellschwellung begleitet (Hernandez & Cristina 1998, Lang et al. 1998, Armstrong 2003). Bei Retzius-Neuronen wurde gezeigt, dass Ouabain zu einer mehrstufigen Membrandepolarisation und zu einem reversiblen Anstieg von  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führt (Deitmer & Schlue 1983, Hochstrate & Schlue 2001), ebenso wie zu einer Zellschwellung (Wüsten 2004). Um die ionalen Ursachen der Volumenänderungen unter isotonischen Bedingungen aufzuklären, wurden Zellvolumen und  $E_m$  sowie  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  bei Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe gemessen. Die Experimente wurden wiederum bei Retzius- und P-Neuronen durchgeführt.

### 3.3.1 Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe mit Ouabain

Ouabain (G-Strophantin) ist ein spezifischer Hemmstoff der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe (Scheiner-Bobis & Schoner 2001). Die Wirkung von Ouabain auf das Zellvolumen und E<sub>m</sub> sowie auf [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> wurde untersucht, um anhand einer Ionenbilanz Aussagen über den Mechanismus der Zellschwellung treffen zu können. Dabei wurden bei Retzius-Neuronen [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> mit ionensensitiven Dreikanal-Glasmikroelektroden simultan gemessen. Das Zellvolumen konnte bei diesen Experimenten nicht mit ionensensitiven Glasmikroelektroden mit TMA<sup>+</sup> als Volumenmarker bestimmt werden, da die Ouabain-Wirkung über einen langen Zeitraum von ~ 40 min andauerte und der TMA<sup>+</sup>-Verlust der Neuronen zu rasch erfolgte. Daher wurden die Messungen des Zellvolumens mikrofluorimetrisch mit Hilfe von Fura-2 als Volumenmarker durchgeführt.

#### *Retzius-Neuronen:*

Bei Retzius-Neuronen führte die 10-minütige Applikation von 0,5 mM Ouabain zu einer meist dreistufigen Membrandepolarisation (Abb. 18). Unmittelbar nach Applikationsbeginn depolarisierten die Neuronen, ausgehend von einem Ruhe-E<sub>m</sub> von  $-48,7 \pm 9,7$  mV (n = 10), rasch auf ein zeitweise stabiles E<sub>m</sub> von  $-36,3 \pm 10,6$  mV. Nach 3-5 min erfolgte eine zweite schnelle Membrandepolarisation auf ein wiederum zeitweise stabiles E<sub>m</sub> von  $-22,5 \pm 4,2$  mV. Die dritte Depolarisationsphase setzte 3-5 min nach Beginn der zweiten Phase ein und bestand in einer langsamen Annäherung an ein minimales E<sub>m</sub> von  $-13,1 \pm 2,8$  mV, das 15-20 min nach Beginn der Ouabain-Applikation erreicht wurde.

Diese E<sub>m</sub>-Änderungen gingen mit einem [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>- und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg sowie einem [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abfall einher (Abb. 18 A). Parallel hierzu trat eine Zellschwellung um  $24 \pm 5$  % (n = 4; Abb. 18 B) auf. Der [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg und der [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abfall erfolgte in drei Phasen, die mit denen der dreistufigen Membrandepolarisation korrelierten. Zunächst waren die [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>- und [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Änderungen mit 2-4 mM/min relativ langsam (Phase 1), doch nach 5-8 min beschleunigten sie sich plötzlich auf ~ 10 mM/min (Phase 2). Einige Minuten später verlangsamten sich die Änderungen, bis nach weiteren 5-10 min [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> konstante Werte erreichten (Phase 3). Der Zeitverlauf des [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Anstiegs entsprach etwa dem der E<sub>m</sub>-Verschiebung, d.h. wenn sich E<sub>m</sub> veränderte, änderte sich auch [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, und wenn E<sub>m</sub> unverändert blieb, änderte sich auch [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> nicht. (Abb. 18 A). Alle durch Ouabain hervorgerufenen Wirkungen waren nach 20 bis 30 min vollständig reversibel.

Unter isotonischen Bedingungen beruht eine Zunahme des Zellvolumens auf einer Erhöhung der Anzahl im Cytosol gelöster Teilchen. Eine Nettoaufnahme von Ionen induziert dementsprechend einen Wassereinstrom über die Plasmamembran in die Zelle und damit eine Zellschwellung, wobei die intrazellulären Ionenkonzentrationen verdünnt werden. Die Ouabain-induzierten Konzentrationsänderungen spiegeln daher nicht nur transmembranale Ionenflüsse wider, sondern auch Zellvolumenänderungen. Um diejenigen Komponenten der Konzentrationsänderungen zu bestimmen, die auf Ionenfluss beruhen, müssen die gemessenen Konzentrationsänderungen hinsichtlich der Volumenänderung korrigiert werden. Diese Korrektur erfolgte durch die Berechnung der Konzentrationsänderungen, die bei einem konstanten Zellvolumen zu erwarten sind (Tabelle 17).

Die Gesamtkonzentration an Kationen ( $[\text{Na}^+]_i + [\text{K}^+]_i$ ) nahm volumenkorrigiert um  $23 \pm 8$  mM und  $[\text{Cl}^-]_i$  um  $27 \pm 7$  mM zu. Die Zunahme der Kationenkonzentration beruht darauf, dass die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme höher war als die  $\text{K}^+$ -Abgabe. Die „Nettoaufnahme“ von  $\text{Na}^+$  unterschied sich dabei nicht signifikant von der  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme, so dass von einer elektro-neutralen  $\text{NaCl}$ -Aufnahme ausgegangen werden kann, die für die beobachtete Zellschwellung verantwortlich ist. Insbesondere erklärt die ermittelte  $\text{NaCl}$ -Aufnahme von  $\sim 25$  mM die gemessene Zellschwellung von 24% auch quantitativ (siehe 3.4.2)

**Tabelle 17: Ouabain-induzierte Änderungen von Zellvolumen,  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  bei Retzius-Neuronen**

<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf das Zellvolumen</b>	
$\Delta\text{Vol}_{\text{rel.}} (\%)$	$24 \pm 5$ (n = 4)
<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf <math>[\text{Na}^+]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{Na}^+]_i$	$6 \pm 3$
Maximales $[\text{Na}^+]_i$	$86 \pm 4$
Gemessenes $\Delta[\text{Na}^+]_i$	$+80 \pm 5$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Na}^+]_i$	$+96 \pm 5$
<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf <math>[\text{K}^+]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{K}^+]_i$	$92 \pm 2$
Minimales $[\text{K}^+]_i$	$15 \pm 9$
Gemessenes $\Delta[\text{K}^+]_i$	$-76 \pm 10$
Volumenkorr. $\Delta[\text{K}^+]_i$	$-73 \pm 12$
<b>Nettoänderung der intrazellulären Kationenkonzentration</b>	
$\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$	$+3 \pm 7$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$	$+23 \pm 8$
<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf <math>[\text{Cl}^-]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{Cl}^-]_i$	$12 \pm 5$
Maximales $[\text{Cl}^-]_i$	$32 \pm 5$
Gemessenes $\Delta[\text{Cl}^-]_i$	$+21 \pm 6$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Cl}^-]_i$	$+27 \pm 7$

Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus n = 3-4 Versuchen. Die Vorzeichen kennzeichnen eine Zunahme (+) bzw. Abnahme (-) der jeweiligen Ionenkonzentration. Alle Konzentrationsangaben in mM. Angegeben sind die Ruhewerte vor der Ouabain-Applikation, die Maximal- bzw. Minimalwerte in Gegenwart von Ouabain sowie die maximalen gemessenen und volumenkorrigierten Konzentrationsänderungen. Zusätzlich angegeben ist die gemessene und die volumenkorrigierte Kationenbilanz ( $\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$ ).

#### *P-Neuronen:*

Bei P-Neuronen induzierte die 10-minütige Applikation von 0,5 mM Ouabain unterschiedliche  $E_m$ -Änderungen, die sich grob in zwei Kategorien einteilen lassen (Abb. 19, 20). Bei 9 von 17 Neuronen traten starke  $E_m$ -Änderungen auf, zunächst eine Membranhyperpolarisation ( $-9,2 \pm 3,2$  mV), die in eine langanhaltende Membrandepolarisation ( $29,4 \pm 10,0$  mV) überging, die auch nach Auswaschen des Ouabains zunächst anhielt (Abb. 19). Bei 6

dieser 9 Neuronen kehrte  $E_m$  nach 20-30 min auf den Ruhewert zurück, während bei 3 Neuronen die Membrandepolarisation andauerte. Bei den übrigen 8 Neuronen wurde  $E_m$  durch Ouabain nur wenig beeinflusst ( $2,2 \pm 1,2$  mV; Abb. 20). Nach Auswaschen des Ouabains trat jedoch bei 6 dieser 8 Neuronen eine langanhaltende Membranhyperpolarisation auf ( $-11,8 \pm 2,0$  mV).

Auch bei P-Neuronen verursachte Ouabain einen  $[Na^+]_i$ - und  $[Cl^-]_i$ -Anstieg sowie einen  $[K^+]_i$ -Abfall. Dabei zeigte sich, dass die Konzentrationsänderungen bei Neuronen mit starker  $E_m$ -Änderung deutlich größer waren als bei Neuronen mit geringer  $E_m$ -Änderung (vgl. Abb. 19, 20). In diesen beiden Gruppen betrug der  $[Na^+]_i$ -Anstieg  $88 \pm 28$  mM ( $n = 5$ ) bzw.  $17 \pm 5$  mM ( $n = 2$ ) und die  $[K^+]_i$ -Abnahme  $-63 \pm 10$  mM ( $n = 2$ ) bzw.  $-27 \pm 6$  mM ( $n = 2$ ). Am deutlichsten war der Zusammenhang zwischen den Änderungen von  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$ . Bei Neuronen mit starker  $E_m$ -Änderung nahm während der Membranhyperpolarisation  $[Cl^-]_i$  um  $-5,7 \pm 2,1$  mV ( $n = 3$ ) ab und während der Membrandepolarisation um  $42 \pm 14$  mM zu. Bei Neuronen mit geringer  $E_m$ -Änderung veränderte sich auch  $[Cl^-]_i$  mit  $-0,6 \pm 1,5$  mM ( $n = 3$ ) nur wenig.

Die Variabilität der Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen spiegelte sich auch in den Änderungen des Zellvolumens wider. Ouabain verursachte im Mittel eine Zellschwellung um  $35 \pm 26$  % ( $n = 6$ ; Abb. 19 D), wobei die Einzelwerte zwischen 21% und 67% variierten. Bei einem Neuron blieb eine Zellvolumenänderung sogar völlig aus (Abb. 20 D), während bei einem anderen Neuron der Zellschwellung sogar eine Schrumpfung vorausging. Die Ouabain-induzierten Volumenänderungen waren immer vollständig reversibel. Die für alle P-Neuronen gemittelten Änderungen von Zellvolumen,  $[Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  sind in Tabelle 18 wiedergegeben. Wegen der starken Variabilität der Ouabain-induzierten Änderungen von  $E_m$  und der intrazellulären Ionenkonzentrationen sind die Standardabweichungen der Mittelwerte sehr hoch. Da  $[Na^+]_i$  und  $[K^+]_i$  jeweils mit ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden gemessen wurden, beruht die Berechnung der Nettobewegung an Kationen auf Experimenten an verschiedenen Neuronen, wodurch die Bestimmung der Kationenbilanz ungenauer wird.

Die Gesamtkonzentration an Kationen ( $[\text{Na}^+]_i + [\text{K}^+]_i$ ) nahm volumenkoriert um  $54 \pm 61$  mM und  $[\text{Cl}^-]_i$  um  $31 \pm 34$  mM zu. Die Nettoaufnahme an Kationen war zwar im Mittel deutlich größer, unterschied sich jedoch von der  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme nicht signifikant, so dass auch bei P-Neuronen die elektroneutrale Aufnahme von NaCl primär für die Zellschwellung verantwortlich sein dürfte.

**Tabelle 18: Ouabain-induzierte Änderungen von Zellvolumen,  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  bei P-Neuronen**

<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf das Zellvolumen</b>	
$\Delta\text{Vol.}_{\text{rel.}}$ (%)	$+35 \pm 26$ (n = 6)
<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf <math>[\text{Na}^+]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{Na}^+]_i$	$16 \pm 11$
Maximales $[\text{Na}^+]_i$	$84 \pm 51$
Gemessenes $\Delta[\text{Na}^+]_i$	$+68 \pm 42$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Na}^+]_i$	$+90 \pm 55$
<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf <math>[\text{K}^+]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{K}^+]_i$	$80 \pm 9$
Minimales $[\text{K}^+]_i$	$35 \pm 20$
Gemessenes $\Delta[\text{K}^+]_i$	$-45 \pm 22$
Volumenkorr. $\Delta[\text{K}^+]_i$	$-36 \pm 27$
<b>Nettoänderung der intrazellulären Kationenkonzentration</b>	
$\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$	$+23 \pm 47$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$	$+54 \pm 61$
<b>Wirkung von 0,5 mM Ouabain auf <math>[\text{Cl}^-]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{Cl}^-]_i$	$20 \pm 9$
Maximales $[\text{Cl}^-]_i$	$41 \pm 33$
Gemessenes $\Delta[\text{Cl}^-]_i$	$+21 \pm 25$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Cl}^-]_i$	$+31 \pm 34$

Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus n = 4-7 Versuchen. Die Vorzeichen kennzeichnen eine Zunahme (+) bzw. Abnahme (-) der jeweiligen Ionenkonzentration. Alle Konzentrationsangaben in mM. Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 17.

### 3.3.2 Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe in K<sup>+</sup>-freier Badlösung

Auch durch Entfernen des extrazellulären K<sup>+</sup> ist es möglich, die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe zu hemmen, da deren Aktivität von der Gegenwart des extrazellulären K<sup>+</sup> abhängt. Die Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe durch Applikation einer K<sup>+</sup>-freien Badlösung beeinflusste die verschiedenen zellulären Parameter jedoch zum Teil anders als die Hemmung durch Ouabain.

#### *Retzius-Neuronen:*

Die K<sup>+</sup>-freie Badlösung führte bei Retzius-Neuronen meistens zunächst zu einer Membrandepolarisation um  $3,0 \pm 1,2$  mV ( $n = 7$ ; Abb. 21). Danach erholte sich  $E_m$  jedoch und war nach 20 min in K<sup>+</sup>-freier Badlösung um  $-5,7 \pm 3,6$  mV in hyperpolarisierende Richtung verschoben. Die Wiedergabe von K<sup>+</sup> löste eine schnelle Membranhyperpolarisation um -3 bis -15 mV aus, die vermutlich durch die Aktivierung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe zustande kommt und den elektrogenen Charakter dieses Transportsystems widerspiegelt. Danach kehrte  $E_m$  innerhalb von 5 bis 10 min auf den Ausgangswert zurück.

Die K<sup>+</sup>-freie Badlösung verursachte wie die Ouabain-Applikation einen [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg und einen [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abfall (Abb. 21 A). Im Unterschied zur Ouabain-Wirkung kam es jedoch zu einem [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Abfall und zur Zellschrumpfung (Abb. 21 B,C). Auffällig war, dass die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Abnahme unmittelbar nach dem Entfernen des extrazellulären K<sup>+</sup> einsetzte und hier  $E_m$ -unabhängig erfolgte. Die beschriebene Wirkung von K<sup>+</sup>-freier Badlösung auf  $E_m$ , [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> stimmte insgesamt mit den Befunden früherer Arbeiten überein (Deitmer & Schlue 1981, 1983, Neumann 2003).

Um aus den gemessenen Konzentrationsänderungen auf die transmembranalen Ionenflüsse schließen zu können, wurde wiederum eine Volumenkorrektur vorgenommen (siehe 3.3.1). Die Änderungen von Zellvolumen, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Die Gesamtkonzentration an Kationen ([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> + [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) nahm volumenkorrigiert um  $-8 \pm 6$  mM und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> um  $-5 \pm 2$  mM ab. Die Nettoabgabe von Kationen unterschied sich von der Cl<sup>-</sup>-Abgabe nicht signifikant, so dass von einer elektroneutralen KCl-Abgabe auszugehen ist, die für die beobachtete Zellschrumpfung verantwortlich ist. Die ermittelte KCl-Abgabe von  $\sim -6,5$  mM erklärt die gemessene Zellschrumpfung von -7 % auch quantitativ (siehe 3.4.2).

**Tabelle 19: Änderungen von Zellvolumen,  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  in  $\text{K}^+$ -freier Badlösung bei Retzius-Neuronen**

<b>Wirkung von <math>\text{K}^+</math>-freier Badlösung auf das Zellvolumen</b>	
$\Delta\text{Vol}_{\text{rel.}}$ (%)	$-7 \pm 2$ (n = 6)
<b>Wirkung von <math>\text{K}^+</math>-freier Badlösung auf <math>[\text{Na}^+]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{Na}^+]_i$	$12 \pm 4$
Maximales $[\text{Na}^+]_i$	$34 \pm 13$
Gemessenes $\Delta[\text{Na}^+]_i$	$+22 \pm 9$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Na}^+]_i$	$+21 \pm 8$
<b>Wirkung von <math>\text{K}^+</math>-freier Badlösung auf <math>[\text{K}^+]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{K}^+]_i$	$87 \pm 20$
Minimales $[\text{K}^+]_i$	$59 \pm 9$
Gemessenes $\Delta[\text{K}^+]_i$	$-27 \pm 13$
Volumenkorr. $\Delta[\text{K}^+]_i$	$-29 \pm 13$
<b>Nettoänderung der intrazellulären Kationenkonzentration</b>	
$\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$	$-5 \pm 6$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Na}^+]_i + \Delta[\text{K}^+]_i$	$-8 \pm 6$
<b>Wirkung von <math>\text{K}^+</math>-freier Badlösung auf <math>[\text{Cl}^-]_i</math></b>	
Ruhe- $[\text{Cl}^-]_i$	$16 \pm 7$
Minimales $[\text{Cl}^-]_i$	$10 \pm 7$
Gemessenes $\Delta[\text{Cl}^-]_i$	$-5 \pm 2$
Volumenkorr. $\Delta[\text{Cl}^-]_i$	$-5 \pm 2$

Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus n = 5 Versuchen. Die Vorzeichen kennzeichnen eine Zunahme (+) bzw. Abnahme (-) der jeweiligen Ionenkonzentration. Alle Konzentrationsangaben in mM. Weitere Einzelheiten siehe Tabelle 17.

#### *P-Neuronen:*

Bei P-Neuronen führte die  $\text{K}^+$ -freie Badlösung zu einer zeitweiligen Membranhyperpolarisation um  $-26,9 \pm 10,5$  mV (n = 11), deren Amplitude und zeitlicher Verlauf variierten (Abb. 22 A). Es bestand dabei ein Zusammenhang zwischen der maximalen Amplitude und der Zeitdauer bis zum Erreichen des Maximums. Je langsamer sich die Membranhyperpolarisation entwickelte, desto größer war die Amplitude und umso später wurde das Amplitudenmaximum erreicht (Abb. 22 B). Bei 3 von 11 Neuronen kehrte  $E_m$  noch in  $\text{K}^+$ -freier Badlösung auf den Ausgangswert zurück, während bei den übrigen 8

Neuronen eine langanhaltende Membrandepolarisation um  $20,9 \pm 9,6$  mV auftrat. Nach Wiedergabe des extrazellulären  $K^+$  zur Badlösung kehrte  $E_m$  nur bei 5 dieser 8 Neuronen auf den Ausgangswert zurück, während bei den übrigen 3 Neuronen die Membran depolarisiert blieb.

Die  $K^+$ -freie Badlösung bewirkte einen  $[Na^+]_i$ -Anstieg um  $64 \pm 23$  mM ( $n = 5$ ) und einen  $[K^+]_i$ -Abfall um  $-65 \pm 10$  mM ( $n = 3$ ). Beide Konzentrationsänderungen setzten unmittelbar nach dem Wechsel in die  $K^+$ -freie Badlösung ein. Die  $K^+$ -freie Badlösung löste auch  $[Cl^-]_i$ -Änderungen aus, die parallel zu den  $E_m$ -Änderungen verliefen.  $[Cl^-]_i$  nahm während der Membranhypolarisation um  $-4,4 \pm 2,9$  mM ( $n = 5$ ) ab und stieg bei den Neuronen, deren Membran anschließend depolarisierte, um  $47 \pm 20$  mM ( $n = 3$ ) über den Ausgangswert hinaus an. Dagegen erreichte  $[Cl^-]_i$  bei den Neuronen, deren  $E_m$  auf den Ausgangswert zurückkehrte, auch nur den Ausgangswert ( $+2,0 \pm 2,6$  mM,  $n = 3$ ; Abb. 23).

Die  $K^+$ -freie Badlösung beeinflusste bei P-Neuronen das Zellvolumen nur wenig. Bei 4 von insgesamt 8 Messungen war nach 20 min in  $K^+$ -freier Lösung das Zellvolumen um  $-7 \pm 2$  % vermindert, bei 3 Neuronen trat eine Zellschwellung um  $6 \pm 5$  % auf, und bei einem Neuron blieb das Zellvolumen unbeeinflusst. Die Änderungen des Zellvolumens waren reversibel, und nur bei einem einzigen Neuron blieb eine anhaltende Zellschwellung zurück.

### **3.4 Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren: Wirkung auf $E_m$ , $[Cl^-]_i$ und Zellvolumen**

Im ZNS von Vertebraten ist L-Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter (Headley & Grillner 1990, Zorumski & Thio 1992). Im Blutegel-ZNS wurden ionotrope Glutamat-Rezeptoren (GluR) bei zahlreichen Neuronen nachgewiesen, unter anderem bei Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen sowie bei Neuropil-Gliazellen, jedoch scheinen sie bei P- und N1-Neuronen nicht vorzukommen (James & Walker 1978, Ballanyi et al. 1989a, Dörner et al. 1990, Thorogood & Brodfuehrer 1995, Dierkes et al. 1996). Bisher ist unklar, inwieweit die GluRs im Blutegel-ZNS denjenigen von Vertebraten entsprechen. Die pharmakologischen Befunde deuten auf einen „AMPA/Kainat-Mischtyp“ hin, jedoch ist auch möglich, dass AMPA- und Kainat-Rezeptoren von den Neuronen gemeinsam expri-

miert werden (Roberts et al. 1982, Dierkes et al. 1996). Zweifelsfrei auszuschließen ist, dass die GluRs im Blutegel-ZNS mit den NMDA-Rezeptoren verwandt sind (Dörner et al. 1990). Die ionotropen GluRs bei Blutegel-Neuronen sind nur für monovalente Kationen permeabel, während diejenigen bei Neuropil-Gliazellen auch für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel sind (Hochstrate & Schlue 1994, Dierkes et al. 1996). Bei Retzius-Neuronen sind neben unspezifischen Kationenkanälen auch Glutamat-aktivierte  $\text{Cl}^-$ -Kanäle beschrieben worden (Mat Jais et al. 1983), die auch durch Kainat aktiviert werden.

Alle unter isotonischen Bedingungen beobachteten Zellvolumen-Änderungen gehen mit  $[\text{Cl}^-]_i$ -Änderungen einher, die wiederum von  $E_m$  abhängen (Neumann et al. 2003; vgl. 3.3.1 und 3.3.2). Um den Zusammenhang zwischen  $E_m$ ,  $[\text{Cl}^-]_i$  und Zellvolumen genauer zu charakterisieren, wurden diese Parameter bei jeweils einem einzelnen Neuron simultan mit Hilfe ionensensitiver Dreikanal-Glasmikroelektroden gemessen. Da Blutegel-Neuronen das intrazellulär akkumulierte  $\text{TMA}^+$  wieder rasch verlieren (Tabelle 22), musste daher der Zusammenhang zwischen den Parametern anhand von Volumenänderungen untersucht werden, die sich deutlich schneller entwickeln als nach Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe. Die Aktivierung von GluRs durch Kainat bzw. AMPA löst bei Retzius-Neuronen eine Zellschwellung aus, die ihr Maximum nach wenigen Minuten erreicht und innerhalb von  $\sim 10$  min reversibel ist (Dierkes et al. 2002a, Klees 2002, Neumann 2003). Die durch Kainat und AMPA induzierte Zellschwellung geht wie die Ouabain-induzierte Zellschwellung auf eine  $\text{NaCl}$ -Aufnahme zurück (Neumann 2003).

Um eine Übersicht über die Wirkung der GluR-Aktivierung auf das Zellvolumen der verschiedenen Neuronen zu erhalten, wurde mit Hilfe ionensensitiver Zweikanal-Glasmikroelektroden zunächst die Kainat-Wirkung auf das Zellvolumen bei den verschiedenen Neuronen untersucht. Der glutamaterge Agonist Kainat aktiviert AMPA- und Kainat-Rezeptoren und übt auf  $E_m$ ,  $[\text{Cl}^-]_i$  und Zellvolumen eine größere Wirkung aus als der für AMPA-Rezeptoren spezifische Agonist AMPA (Neumann 2003).

### 3.4.1 Kainat-induzierte Zellschwellung bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen

Die einminütige Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Kainat führte bei Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen zu einer deutlichen Membrandepolarisation (James et al. 1980a,b, Mat Jais et al. 1983, 1984, Brodfuehrer & Cohen 1990, Lührke & Deitmer 1996) und zur Zellschwellung. Beide Effekte traten sofort mit der Kainat-Applikation auf, erreichten nach 2-4 min ihr Maximum und waren nach 10-15 min vollständig reversibel (Abb. 24, Tabelle 20). Demgegenüber antworteten P- und N1-Neuronen bei der Kainat-Applikation mit einer kurz andauernden Membrandepolarisation geringer Amplitude ohne Zellvolumenänderung.

**Tabelle 20: Wirkung von Kainat auf  $E_m$  und Zellvolumen bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen**

	<b>Retzius</b>	<b>P</b>	<b>N1</b>	<b>AP</b>	<b>Leydig</b>
$\Delta E_m$ (mV)	17,4 $\pm$ 8,6 n = 7	5,1 $\pm$ 2 n = 9	10,2 $\pm$ 2,5 n = 4	11,9 $\pm$ 4,9 n = 4	14,5 $\pm$ 3,0 n = 5
$\Delta \text{Vol.}$ (%)	19 $\pm$ 5 n = 7	1 $\pm$ 1 n = 9	0 $\pm$ 0 n = 4	16 $\pm$ 5 n = 4	15 $\pm$ 7 n = 5

Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus  $n = 4-9$  Versuchen. Die Messungen wurden mit ionensensitiven Zweikanal-Glas-mikroelektroden mit  $\text{TMA}^+$  als Volumenmarker durchgeführt. Die Kainat-Konzentration betrug 100  $\mu\text{M}$  und die Applikationsdauer 1 min.

### 3.4.2 Wirkung von Kainat, AMPA und L-Glutamat auf $E_m$ , $[\text{Cl}^-]_i$ und Zellvolumen bei Retzius-Neuronen

Der Zusammenhang zwischen  $E_m$ ,  $[\text{Cl}^-]_i$  und Zellvolumen wurde bei Retzius-Neuronen untersucht, die nach Kainat-Applikation die deutlichste  $E_m$ - und Zellvolumenänderungen zeigten. Dabei wurden neben Kainat auch die Agonisten AMPA und L-Glutamat eingesetzt. Die einminütige Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Kainat oder AMPA verursachte eine Zellschwellung, einen  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg und eine langanhaltende Membrandepolarisation, wobei Kainat immer wirksamer war als AMPA (Tabelle 21, Abb. 25). In den Experimenten zeigte sich, dass mit fortschreitender Membrandepolarisation  $[\text{Cl}^-]_i$  immer weiter anstieg und parallel die Zellschwellung größer wurde.

**Tabelle 21: Wirkung von Kainat und AMPA auf  $E_m$ ,  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen**

Agonist	Kainat (n = 7)	AMPA (n = 5)
$\Delta Vol.$ (%)	16 $\pm$ 14	10 $\pm$ 6
Gemessenes $\Delta [Cl^-]_i$	14 $\pm$ 10	8 $\pm$ 2
Volumenkorr. $\Delta [Cl^-]_i$	19 $\pm$ 13	11 $\pm$ 2
$\Delta E_m$ (mV)	16 $\pm$ 10	11 $\pm$ 2

Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus n = 5 bzw. 7 Messungen. Die Messungen wurden mit ionensensitiven Dreikanal-Glasmikroelektroden mit TMA<sup>+</sup> als Volumenmarker durchgeführt. Alle Konzentrationsangaben in mM. Kainat und AMPA wurden in einer Konzentration von 100  $\mu$ M appliziert, die Applikationsdauer betrug 1 min.

Da der physiologische Agonist L-Glutamat bei Retzius-Neuronen eine deutlich geringere Wirkung auf  $E_m$ ,  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen ausübte als Kainat oder AMPA (Neumann 2003), wurde die Applikationszeit von 1 auf 5 min erhöht. L-Glutamat wurde in Konzentrationen von 5 und 30 mM benutzt, die Halbsättigung bzw. Sättigung der Wirkung hervorrufen (Dierkes, pers. Mitteilung). Bei beiden Konzentrationen bewirkte L-Glutamat nur geringfügige  $E_m$ -, Zellvolumen- und  $[Cl^-]_i$ -Änderungen. Auf eine initiale Membrandepolarisation (5 mM: 6,1  $\pm$  1,3 mV, 30 mM: 7,5  $\pm$  2,3 mV, jeweils n = 3) folgte noch während der Gabe von L-Glutamat eine Membranhyperpolarisation (5 mM: -4,1  $\pm$  3,1 mV, 30 mM: -2,3  $\pm$  2,1 mV). Unmittelbar nach Auswaschen des L-Glutamats kehrte  $E_m$  auf den Ausgangswert zurück. Während der Membrandepolarisation stiegen  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen leicht um 2-3 mM bzw. 2-5 % an, dagegen nahmen  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen während der Membranhyperpolarisation geringfügig um -2 mM bzw. -2 % ab.

Anhand der volumenkorrigierten  $[Cl^-]_i$ -Änderungen, die durch Kainat, AMPA bzw. L-Glutamat hervorgerufen wurden, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen  $Cl^-$ -Aufnahme und Zellschwellung ermittelt werden (Abb. 25 B): Ein  $[Cl^-]_i$ -Anstieg um 1 mM war von einer Zunahme des Zellvolumens um etwa 1% begleitet.

### 3.5 Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren: Wirkung auf $E_m$ , $[Cl^-]_i$ und Zellvolumen

Die 5-HT-Rezeptoren bei Vertebraten werden in sieben Hauptgruppen eingeteilt und mit Ausnahme des ionotropen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors sind alle metabotrope Rezeptoren (Humphrey et al. 1993, Teitler & Herrick-Davis 1994, Pierce et al. 1996). Bei Vertebraten moduliert 5-HT eine Vielfalt von Parametern wie Blutdruck, Körpertemperatur, Schlaf-Wach-Rhythmus und Nahrungsaufnahme (Schloss & Williams 1998). Beim Blutegel werden unter anderem das Schwimm- und Fressverhalten durch 5-HT beeinflusst (Lent & Dickinson 1984).

Bei Retzius-Neuronen sprechen pharmakologische Befunde für metabotrope 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Lucht 1997). Diese Rezeptoren aktivieren bei Vertebraten Phospholipase C, die Phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet. IP<sub>3</sub> bewirkt die Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Reticulum in das Cytoplasma, DAG und Ca<sup>2+</sup> aktivieren gemeinsam Proteinkinase C (PKC), die auch auf Kanalproteine wirken kann (Brown et al. 1984). Bei Retzius-Neuronen führt 5-HT zu einer Membranhyperpolarisation, die auf der Aktivierung von Cl<sup>-</sup>-Kanälen beruht (Munsch & Schlue 1993, Dierkes 1998).

Bei P-Neuronen wurden neben 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren auch 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren beschrieben (Lucht 1997), die bei Vertebraten die Adenylatcyclase-Aktivität modulieren, wobei es sowohl zur Hemmung des Enzyms (5-HT<sub>1B-F</sub>) als auch zur Aktivierung kommen kann (5-HT<sub>1A</sub>; Humphrey et al. 1993). Bei P-Neuronen führt 5-HT über die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren zur Aktivierung von Cl<sup>-</sup>-Kanälen und über die 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren zur Aktivierung von unselektiven Kationenkanälen (Drapeau & Sanchez-Armass 1988, Lucht 1997, Dierkes & Schlue 2004). Insgesamt reagieren P-Neuronen auf die Applikation von 5-HT mit einer Membrandepolarisation, einem Anstieg von  $[Na^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  sowie einem Abfall von  $[K^+]_i$  (Dierkes 1998). Auch bei N1-Neuronen führt 5-HT zu einer starken Membrandepolarisation und zu einem Anstieg von  $[Na^+]_i$  (Dierkes 1998). Bei AP- und Leydig-Neuronen hat 5-HT dagegen keinen Einfluss auf  $[Na^+]_i$  und nur wenig Wirkung auf  $E_m$ , wobei AP-Neuronen mit einer leichten Membranhyperpolarisation reagieren und Leydig-Neuronen mit einer Membrandepolarisation. Die Wirkungen von 5-HT entfalten sich wie die von Kainat und AMPA recht schnell und sind innerhalb von 10-15 min völlig reversibel.

Bei P-Neuronen verursacht 5-HT eine durch NaCl-Aufnahme bedingte Zellschwellung, während bei Retzius-Neuronen eine Änderung des Zellvolumens ausbleibt (Neumann 2003). Bei N1-, AP- und Leydig-Neuronen wurde die Beeinflussung des Zellvolumens durch 5-HT bisher noch nicht untersucht. Um den Zusammenhang zwischen  $E_m$ ,  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen bei der Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren näher zu bestimmen, wurde zunächst die Wirkung von 5-HT auf das Zellvolumen der verschiedenen Neuronen mit ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden mit  $TMA^+$  als Volumenmarker untersucht.

### **3.5.1 5-HT-induzierte Zellvolumenänderungen bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen**

Die einminütige Applikation von 5 mM 5-HT verursachte bei 6 von 8 untersuchten Retzius-Neuronen eine Membranhyperpolarisation von  $-6,1 \pm 4,1$  mV, während die beiden übrigen mit einer leichten Membrandepolarisation von  $1,4 \pm 0,2$  mV antworteten. Bei AP-Neuronen löste 5-HT eine initiale Membranhyperpolarisation aus ( $-1,3 \pm 0,5$  mV,  $n = 5$ ), die in eine Membrandepolarisation überging ( $3,1 \pm 1,1$  mV). Leydig-Neuronen reagierten auf 5-HT mit einer anhaltenden Membrandepolarisation von  $5,4 \pm 2,6$  mV ( $n = 4$ ). Das Zellvolumen von Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen wurde durch 5-HT nicht beeinflusst. Die 5-HT-induzierte Membrandepolarisation bei P- und N1-Neuronen betrug  $42,5 \pm 9,6$  mV ( $n = 18$ ) bzw.  $45,6 \pm 7,6$  mV ( $n = 14$ ).

Mit  $TMA^+$  als Volumenmarker wurde bei P-Neuronen eine Zellschwellung um  $27 \pm 8$  % ( $n = 9$ ) und bei N1-Neuronen um  $73 \pm 21$  % ( $n = 4$ ) gemessen. Diese Werte sind jedoch offensichtlich überschätzt, da 5-HT vermutlich die Permeabilität der Zellmembran für  $TMA^+$  erhöhte (Abb. 26 A,B), so dass es neben der  $[TMA^+]_i$ -Abnahme aufgrund der Zellschwellung zu einem gesteigerten  $TMA^+$ -Verlust kommt (Abb. 26 C,D). Diese 5-HT-Wirkung war bei N1-Neuronen stärker ausgeprägt als bei P-Neuronen. Mit Fura-2 als Volumenmarker wurde bei P-Neuronen eine Zellschwellung von nur  $13 \pm 4$  % ( $n = 4$ ) und bei N1-Neuronen von nur  $17 \pm 5$  % ( $n = 5$ ) ermittelt (Abb. 27 A).

Die simultane Messung von  $[Cl^-]_i$ ,  $E_m$  und Zellvolumen unter dem Einfluss von 5-HT konnte somit bei P- und N1-Neuronen nicht durchgeführt werden. Daher wurde mit Hilfe  $Cl^-$ -sensitiver Zweikanal-Glasmikroelektroden bei P-Neuronen nur der Zusammenhang zwischen  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$  untersucht.

### 3.5.2 Wirkung von 5-HT auf $E_m$ und $[Cl^-]_i$ bei P-Neuronen

Die einminütige Applikation von 5 mM 5-HT bewirkte einen  $[Cl^-]_i$ -Anstieg um  $12 \pm 8$  mM ( $n = 6$ ; Abb. 27 B). Es zeigte sich, dass sowohl der  $[Cl^-]_i$ -Anstieg als auch die  $[Cl^-]_i$ -Wiederabnahme nach Auswaschen des 5-HT von der  $E_m$ -Änderung abhängig waren. Vermutlich erfolgte der  $Cl^-$ -Transport ausschließlich passiv durch  $Cl^-$ -Kanäle, da der  $[Cl^-]_i$ -Anstieg nur solange erfolgte, bis  $E_m$  und  $E_{Cl}$  identisch waren. Die  $[Cl^-]_i$ -Wiederabnahme setzte erst ein, nachdem  $E_m$  negativer als  $E_{Cl}$  geworden war und damit eine auswärts gerichtete EMK für  $Cl^-$  bestand. Die  $[Cl^-]_i$ -Änderungen erfolgten deutlich langsamer als die  $E_m$ -Änderungen, was auf die geringe  $Cl^-$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran von P-Neuronen zurückzuführen ist (vgl. 3.1.3). Auffällig war, dass der  $[Cl^-]_i$ -Anstieg annähernd die gleiche Kinetik aufwies wie die Zellschwellung und sich auch hier ein Zusammenhang zwischen volumenkorrigierter  $[Cl^-]_i$ -Zunahme ( $14 \pm 8$  mM) und Zellschwellung ( $13 \pm 4$  %) ergab, der demjenigen bei Retzius-Neuronen entsprach (siehe 3.4.2).

### 3.6 $Na^+$ -aktivierte $K^+$ -Kanäle bei P-Neuronen

Nach Hemmung der  $Na^+$ - $K^+$ -Pumpe wurde bei P-Neuronen trotz Schwächung des  $K^+$ -Gradienten eine Membranhyperpolarisation beobachtet (siehe 3.3.1, 3.3.2, Abb. 19, 20, 22). Offenbar beruht diese Membranhyperpolarisation auf einer drastischen Erhöhung der  $K^+$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran, wodurch die  $K^+$ -Selektivität der Membran so stark zunimmt, dass die Schwächung des  $K^+$ -Gradienten zeitweilig überkompensiert wird (Schlue & Deitmer 1984, Schlue 1991). Der Befund, dass die Zunahme der  $K^+$ -Leitfähigkeit in Abwesenheit von extrazellulärem  $Na^+$  reduziert war (Schlue 1991), spricht dafür, dass die Leitfähigkeitszunahme in  $Na^+$ -haltiger Lösung auf der Aktivierung von  $Na^+$ -aktivierten  $K^+$ -Kanälen ( $K_{Na}$ ) beruht, die bereits bei verschiedenen Vertebraten-Neuronen nachgewiesen wurden (Bischoff et al. 1998, Dryer 1994, 2003, Lawrence & Rodrigo 2001,

Yuan et al. 2003). Die  $K_{Na}$ -Kanäle zeigen keine Desensitivierung und benötigen für ihre Aktivierung eine  $[Na^+]_i$  von wenigstens 10 mM; die halbmaximale Aktivierung erfolgt bei  $[Na^+]_i \approx 40$  mM (Dryer 1994, Bischoff et al. 1998). Interessanterweise ist der Zusammenhang zwischen  $[Na^+]_i$  und Kanalaktivität  $Cl^-$ -abhängig, da bei erhöhter  $[Cl^-]_i$  die Dosis-wirkungskurve zu kleineren  $[Na^+]_i$  verschoben ist (Yuan 2003). Um weitere Hinweise für die Gegenwart von  $K_{Na}$ -Kanälen bei P-Neuronen zu finden, wurde der Zusammenhang zwischen  $R_{Input}$ ,  $E_m$  und  $[Na^+]_i$  näher untersucht.

Im Experiment wurden zwei Elektrodentypen verwendet, zum einen eine  $Na^+$ -sensitive Zweikanal-Glasmikroelektrode zur  $[Na^+]_i$ - und  $E_m$ -Messung und zum anderen eine elektrolytgefüllte Zweikanal-Glasmikroelektrode zur Bestimmung von  $R_{Input}$  durch Applikation von hyperpolarisierenden Strömen sowie zur Injektion von  $Na^+$  oder  $K^+$ . Bei der letzteren Elektrode war ein Kanal mit 0,5 M  $Na_2SO_4$  gefüllt und der andere mit 0,5 M  $K_2SO_4$ .

Die  $Na^+$ -Injektion (+3 nA) verursachte anfänglich eine Membrandepolarisation um  $\sim 20$  mV, die dann kontinuierlich abnahm, während  $[Na^+]_i$  über die Injektionsdauer von 3 min um  $\sim 30$  mM anstieg (Abb. 28 A).  $R_{Input}$  nahm sofort mit Beginn der  $Na^+$ -Injektion deutlich ab und verringerte sich danach kontinuierlich weiter. Nach Abschalten des Injektionsstroms war  $E_m$  in hyperpolarisierende Richtung verschoben und kehrte danach ebenso wie  $[Na^+]_i$  innerhalb von 10 min auf den Ausgangswert zurück.  $R_{Input}$  blieb nach Abschalten des Injektionsstroms vermindert und nahm parallel zu  $E_m$  und  $[Na^+]_i$  wieder zu. Die Injektion von  $K^+$  führte ebenfalls zu einer Membrandepolarisation um  $\sim 20$  mV und zur Abnahme von  $R_{Input}$ . Beide Parameter blieben jedoch über die Injektionsdauer unverändert und kehrten nach Abschalten des Injektionsstroms sofort auf die Ausgangswerte zurück. Auf  $[Na^+]_i$  hatte die  $K^+$ -Injektion erwartungsgemäß keinen Einfluss (Abb. 28 A). Die Verminderung von  $R_{Input}$  nach Beendigung der  $Na^+$ -Injektion sowie die Wiedernahme von  $R_{Input}$  parallel zur Wiederabnahme von  $[Na^+]_i$  sprechen für die Präsenz von  $K_{Na}$ -Kanälen bei P-Neuronen.

Bei P-Neuronen wurden hyperpolarisationsaktivierte, unspezifische Kationenkanäle ( $I_h$ -Kanäle) nachgewiesen (Gerard 2003), die für  $K^+$  und  $Na^+$  permeabel sind und durch  $Cs^+$  selektiv blockiert werden können. Um den Einfluss der  $I_h$ -Kanäle während der Membranhyperpolarisation nach Beendigung der  $Na^+$ -Injektion auf  $R_{Input}$  zu untersuchen, wurde  $Na^+$  auch in Anwesenheit von 2 mM  $Cs^+$  injiziert. Die  $R_{Input}$ -Abnahme in Anwesenheit von  $Cs^+$

war mit der Abnahme vergleichbar, die ohne  $\text{Cs}^+$  ermittelt wurde. Der Anteil der  $I_h$ -Kanäle an der  $R_{\text{Input}}$ -Abnahme nach Beendigung der  $\text{Na}^+$ -Injektion ist daher vernachlässigbar.

Der Zusammenhang zwischen  $R_{\text{Input}}$ ,  $E_m$  und  $[\text{Na}^+]_i$  bei P-Neuronen wurde zum einen anhand der Daten charakterisiert, die bei den  $\text{Na}^+$ -Injektionsexperimenten gewonnen wurden. Zum anderen wurden Messwerte hinzugezogen, die unmittelbar nach dem Einstich der beiden Elektroden ermittelt wurden. Nach dem Elektrodeneinstich war  $[\text{Na}^+]_i$  vorübergehend erhöht (siehe 3.1.1), so dass auch hier der Zusammenhang zwischen  $R_{\text{Input}}$ ,  $E_m$  und  $[\text{Na}^+]_i$  untersucht werden konnte. Die in Abb. 28 B wiedergegebenen Daten zeigen, dass  $R_{\text{Input}}$  mit steigender  $[\text{Na}^+]_i$  abnimmt. Der Effekt setzt bei  $[\text{Na}^+]_i \geq 10 \text{ mM}$  ein und nimmt dann kontinuierlich zu. Bei drastischer Erhöhung von  $[\text{Na}^+]_i (> 45 \text{ mM})$  nahm  $R_{\text{Input}}$  um bis zu 95% ab.

Bei Retzius-Neuronen führte die  $\text{Na}^+$ -Injektion ebenfalls zu einer Membrandepolarisation und zur  $R_{\text{Input}}$ -Abnahme, die beide über die Injektionsdauer konstant blieben und nach Beendigung der Injektion sofort auf ihren Ausgangswert zurückkehrten (Abb. 29). Der Injektionsstrom von +3 nA verursachte jedoch nur einen  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg um  $\sim 10 \text{ mM}$ , und um einen ähnlichen  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg wie bei P-Neuronen zu induzieren, waren deutlich höhere Injektionsströme nötig. Ein Injektionsstrom von +10 nA verursachte eine stabile Membrandepolarisation um  $\sim 40 \text{ mV}$ , einen  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg um 30 bis 40 mM und eine konstante  $R_{\text{Input}}$ -Abnahme. Nach Abschalten des Injektionsstroms kehrten  $E_m$  und  $R_{\text{Input}}$  bei 2 von insgesamt 4 untersuchten Neuronen sofort auf die Ausgangswerte zurück, während bei den übrigen beiden Neuronen eine Membranhyperpolarisation auftrat und  $R_{\text{Input}}$  um  $\sim 15 \%$  verringert blieb. Ein Zusammenhang zwischen  $R_{\text{Input}}$  und  $[\text{Na}^+]_i$  wie bei P-Neuronen scheint daher bei Retzius-Neuronen allenfalls sehr schwach ausgeprägt zu sein.

## 4. Diskussion

In diesem Abschnitt werden zunächst die elektrophysiologischen Parameter und insbesondere die intrazellulären Ionenkonzentrationen der verschiedenen Blutegel-Neuronen im Ruhezustand beschrieben und deren Abhängigkeit von  $E_m$  diskutiert. Bei Retzius- und P-Neuronen konnten anhand der Veränderung des Ruhezustands durch Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe die ionalen Ursachen von Zellvolumenänderungen unter isotonischen Bedingungen geklärt werden. Eine Zellschwellung beruht auf einer elektroneutralen  $\text{NaCl}$ -Aufnahme, eine Zellschrumpfung dagegen auf einer elektroneutralen  $\text{KCl}$ -Abgabe. Da die Richtung der Volumenänderung von der  $\text{Cl}^-$ -Bewegung bestimmt ist, wird die  $\text{Cl}^-$ -Regulation bei Retzius- und P-Neuronen diskutiert, wobei die an der aktiven  $\text{Cl}^-$ -Verteilung beteiligten Ionentransportsysteme und Ionenströme genauer erläutert werden. Darüber hinaus wird der Zusammenhang zwischen  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $E_m$  und Zellvolumen an Hand von Zellschwellungen behandelt, die durch die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren induziert wurden und die auf den gleichen ionalen Ursachen beruhen wie die durch Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe ausgelösten Zellschwellungen. Außerdem werden die Unterschiede in den Zellvolumen-Änderungen zwischen Retzius- und P-Neuronen auf die zellspezifische Ausprägung besonderer Ionentransportsysteme zurückgeführt.

### 4.1 Ruhewerte

Die hier ermittelten  $E_m$ -Werte (Tabelle 16) stimmen mit Werten aus früheren Arbeiten gut überein (Schlue & Deitmer 1984, Lucht 1997, Dierkes 1998, Hintz et al. 1999, Hintz 1999, Kilb & Schlue 1999), wobei festzuhalten ist, dass AP-Neuronen mit  $\sim -36$  mV ein im Mittel etwas weniger negatives  $E_m$  besitzen als die übrigen Neuronen mit  $E_m \leq -40$  mV. Die Unterschiede zwischen  $R_{\text{Input}}$  bei den verschiedenen Neuronentypen spiegeln vermutlich die Größe der Neuronenzellkörper wider, da  $R_{\text{Input}}$  mit der Zellkörpergröße systematisch kleiner wurde.

Bei Retzius-, P- und AP-Neuronen lag  $[\text{K}^+]_i$  zwischen 80 und 90 mM, während  $[\text{K}^+]_i$  bei N1- und Leydig-Neuronen mit  $\sim 70$  bzw.  $\sim 60$  mM etwas niedriger war. Mit Ausnahme der AP-Neuronen, bei denen  $[\text{Na}^+]_i$  etwa 6-7 mM betrug, lag  $[\text{Na}^+]_i$  bei den anderen Neuronen

bei  $\sim 10$  mM.  $[\text{Cl}^-]_i$  betrug  $\sim 12$  mM, wobei N1-Neuronen tendenziell und P-Neuronen deutlich höhere  $[\text{Cl}^-]_i$ -Werte zeigten als die anderen Neuronen. Die mikrofluorimetrisch bestimmten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lagen im Bereich von 50-90 nM. Insgesamt stimmen die ermittelten intrazellulären Ionenkonzentrationen und Werte für  $R_{\text{Input}}$  mit früheren Ergebnissen gut überein (Dierkes 1998, 2002c, 2003, Kilb 1998, Coulon 2001, Neumann 2003).

Bei keinem Neuronentyp konnte für  $[\text{K}^+]_i$  eine Abhängigkeit von  $E_m$  beobachtet werden (Abb. 12 A). Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da  $E_m$  von  $E_K$  bestimmt wird und somit mit zunehmender  $[\text{K}^+]_i$  negativer werden sollte. Die Gründe für den fehlenden Zusammenhang zwischen  $E_m$  und  $[\text{K}^+]_i$  sind unklar. Eine Aussage zum Zusammenhang zwischen  $[\text{Na}^+]_i$  und  $E_m$  konnte nur für Retzius- und P-Neuronen getroffen werden. Bei Retzius-Neuronen war  $[\text{Na}^+]_i$  umso niedriger, je negativer  $E_m$  war. Bei simultanen Messungen von  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{K}^+]_i$  (siehe 3.3.1) zeigte sich, dass Retzius-Neuronen mit relativ niedrigen  $[\text{Na}^+]_i$  oft relativ hohe  $[\text{K}^+]_i$  aufwiesen, wodurch ein negativeres  $E_m$  begünstigt werden sollte. Es wurden jedoch auch Retzius-Neuronen gefunden, bei denen  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{K}^+]_i$  beide relativ hoch waren und  $E_m$  weniger negativ. Bei P-Neuronen wurden dagegen auch bei sehr negativen  $E_m$ -Werte relativ hohe  $[\text{Na}^+]_i$  gemessen (Abb. 12 B). Dieser Befund begründet sich dadurch, dass P-Neuronen  $\text{Na}^+$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle besitzen, die sich bei einem  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg öffnen und die  $\text{K}^+$ -Selektivität der Plasmamembran stark erhöhen (siehe 4.4.2). Bei allen untersuchten Neuronen war  $[\text{Cl}^-]_i$  von  $E_m$  abhängig und umso niedriger je negativer  $E_m$  war (Abb. 12 C).

## 4.2 Zellvolumenänderungen unter isotonischen Bedingungen

### 4.2.1 Hemmung der $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe

Wie zu erwarten führte die Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe bei Retzius- und P-Neuronen zum Zusammenbruch der Ionengradienten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  (Abb. 18, 19, 20, 21),  $[\text{Cl}^-]_i$  änderte sich jedoch unterschiedlich. Auffällig war bei Retzius-Neuronen, dass der Ouabain-induzierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg bzw. die  $[\text{K}^+]_i$ -Abnahme in drei Phasen erfolgten, die mit der dreistufigen Membrandepolarisation korrelierten. Der Zeitpunkt, in dem die Geschwindigkeiten beider Konzentrationsänderungen zunahmen, fiel mit dem Zeitpunkt zusammen, in dem  $E_m$  positiver als  $\sim -40$  mV wurde (Abb. 18). Diese Zunahme der

Ionentransportrate ist wahrscheinlich auf die Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle zurückzuführen, die bei  $E_m$  positiver als  $-40$  mV anhaltend geöffnet werden ( $I_{\text{NaP}}$ , Angstadt 1999). Da die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit der begrenzende Faktor beim Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{K}^+$  ist, bewirkt der verstärkte  $\text{Na}^+$ -Einstrom einen verstärkten  $\text{K}^+$ -Ausstrom. Die Wirkung der Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe auf das Zellvolumen war erstaunlicherweise sehr variabel, korrelierte aber offensichtlich mit den Änderungen von  $[\text{Cl}^-]_i$ . Dabei ging eine Zellschwellung immer mit einer  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme einher und eine Zellschrumpfung mit einer  $\text{Cl}^-$ -Abgabe, während das Zellvolumen bei konstanter  $[\text{Cl}^-]_i$  nicht beeinflusst wurde.

#### 4.2.2 Bilanz der Ionenbewegungen

Die Berechnung der Konzentrationsänderungen für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , die bei einem konstanten Zellvolumen zu erwarten sind, ließ Rückschlüsse auf die Ionenflüsse zu, welche die Änderung des Zellvolumens verursachen. Die Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe durch Ouabain verursachte bei Retzius- und P-Neuronen eine Zellschwellung, die auf einer  $\text{NaCl}$ -Aufnahme beruhte (Tabelle 17, 18). Dieses Ergebnis wird durch frühere Untersuchungen erhärtet, nach denen die Ouabain-induzierte Schwellung der Retzius-Neuronen sowohl in  $\text{Cl}^-$ -freier als auch in  $\text{Na}^+$ -freier Badlösung ausblieb (Wüsten 2004).

Die Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe in  $\text{K}^+$ -freier Badlösung versuchte dagegen bei Retzius-Neuronen eine Zellschrumpfung, die auf einer  $\text{KCl}$ -Abgabe beruhte (Tabelle 19), während bei P-Neuronen keine einheitliche Zellvolumenänderung festgestellt werden konnte (siehe 4.4.2). Ein wichtiger Aspekt bei Änderungen von Ionenkonzentrationen ist, dass diese weitgehend elektroneutral verlaufen müssen (Macknight 1987, Armstrong 2003). Um bei einem Retzius-Neuron das  $E_m$  um  $10$  mV zu verändern, müssen  $4 \cdot 10^8$  Elementarladungen über die Plasmamembran fließen ( $C_{\text{Input}} = 6,6$  nF; Kilb 1998). Unter der Annahme, dass das Cytosol  $\sim 60$  % des Zellkörpers ( $\varnothing \sim 80$   $\mu\text{m}$ ) einnimmt, also ein Volumen von  $\sim 160$  pl hat, errechnet sich aus dem volumenkorrigierten  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg um  $27$  mM bei der Ouabain-induzierten Zellschwellung eine Aufnahme von  $\sim 2 \cdot 10^{12}$   $\text{Cl}^-$ -Ionen, die ohne die Aufnahme von Kationen eine  $E_m$ -Änderung um  $-50$  V verursachen würde. Die elektroneutrale Änderung der intrazellulären Ionenkonzentration wurde durch die Messergebnisse bestätigt, nach denen sich die Nettoänderung der Kationenkonzentration sowohl bei einer

Zellschwellung als auch bei einer Zellschrumpfung von den  $[\text{Cl}^-]_i$ -Änderungen nicht signifikant unterschied (Tabelle 17, 18, 19).

### 4.3 Bedeutung von $[\text{Cl}^-]_i$ für das Zellvolumen

#### 4.3.1 $\text{Cl}^-$ ist bei allen Neuronen aktiv verteilt

Das  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtspotential ( $E_{\text{Cl}}$ ) wurde anhand der gemessenen  $[\text{Cl}^-]_i$  berechnet und mit  $E_m$  verglichen, um die  $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei den verschiedenen Neuronen zu erfassen (Abb. 13). Eine aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung wurde bei Retzius-Neuronen bereits früher gezeigt (Munsch & Schlue 1993), während eine passive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei P-Neuronen nur vermutet wurde (Munsch et al. 1995). Die hier gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass bei allen untersuchten Neuronen eine aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung vorliegt, da  $E_{\text{Cl}}$  bei allen Neuronen negativer als  $E_m$  war, d.h.  $[\text{Cl}^-]_i$  war niedriger als für eine passive Verteilung zu erwarten. Für die aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung muss ein Transportsystem verantwortlich sein, das permanent  $\text{Cl}^-$  aus dem Cytosol entfernt und damit eine einwärts gerichtete  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$  aufrechterhält.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei Retzius- als auch bei P-Neuronen der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter für die aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung verantwortlich ist (Abb. 16). Dieses Transportsystem, das zur Familie der elektroneutralen Kationen-gekoppelten  $\text{Cl}^-$ -Cotransporter gehört (Genfamilie SLC12A4-7; Hebert et al. 2004), nutzt den durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe aufgebauten elektrochemischen  $\text{K}^+$ -Gradienten aus, um  $\text{Cl}^-$  aus der Zelle zu entfernen (Hoffmann 1986, Lang et al. 1998, Lauf et al. 2000). Bei Retzius- und P-Neuronen konnte gezeigt werden, dass der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter auch bei einem durch Membrandepolarisation verursachten  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg die  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$  konstant hält (Abb. 25 A, 27 B), solange der  $\text{K}^+$ -Gradient besteht und der Transporter seine Antriebskraft nicht verliert. Der  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg erfolgt daher annähernd parallel zur Membrandepolarisation, wie es auch bei einer passiven  $\text{Cl}^-$ -Verteilung zu erwarten wäre. Somit erklärt sich auch die Abhängigkeit zwischen  $[\text{Cl}^-]_i$  und  $E_m$  unter Ruhebedingungen (siehe 4.1). Durch Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren bei P-Neuronen konnte gezeigt werden, dass der  $\text{Cl}^-$ -Transport bei der  $[\text{Cl}^-]_i$ -Wiederabnahme nach einer Zellschwellung primär passiv verläuft und der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter hierbei nur eine untergeordnete Rolle spielt (siehe 3.5.2, Abb. 27 B).

### 4.3.2 Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit von Retzius- und P-Neuronen im Vergleich

Um die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit der Plasmamembran der Bluteigel-Neuronen näher zu beschreiben, wurde zum einen die [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Abnahme in Cl<sup>-</sup>-freier Badlösung verfolgt (Abb. 15) und zum anderen die R<sub>Input</sub>-Zunahme bei DIDS-Applikation (Abb. 14). Retzius-Neuronen zeigten mit ~3 mM/min eine mehr als doppelt so große Cl<sup>-</sup>-Abgaberate wie P-Neuronen und die DIDS-induzierte R<sub>Input</sub>-Zunahme war mit ~20 % sogar etwa viermal so groß wie bei P-Neuronen. Da Retzius-Neuronen (Ø ~80 µm) ein etwa 4-mal so großes Zellvolumen wie P-Neuronen (Ø ~50 µm) aufweisen, ist die von Retzius-Neuronen pro Zeiteinheit abgegebene Cl<sup>-</sup>-Menge etwa 8-mal so groß wie bei P-Neuronen. Die Befunde weisen darauf hin, dass die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit der Plasmamembran von Retzius-Neuronen erheblich höher ist als die von P-Neuronen. Dieses Ergebnis war überraschend, da die aktive Cl<sup>-</sup>-Verteilung bei Retzius-Neuronen stärker ausgeprägt ist als bei P-Neuronen und eine geringe Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit eine aktive Cl<sup>-</sup>-Verteilung begünstigen sollte. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Befunden, nach denen die Cl<sup>-</sup>-Abgabe bei Retzius-Neuronen langsamer erfolgt als bei P-Neuronen (Munsch et al. 1995). Für eine höhere Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit der Retzius-Neuronen spricht jedoch auch die Beobachtung, dass [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> nach einer Membrandepolarisation bei Retzius-Neuronen deutlich rascher ansteigt als bei P-Neuronen (vgl. Abb. 25 A, 27 B).

### 4.3.3 Transportmechanismen zum Aufbau der aktiven Cl<sup>-</sup>-Verteilung

Um die Transportleistung des K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters der Retzius- und P-Neuronen bei der Aufrechterhaltung der aktiven Cl<sup>-</sup>-Verteilung abzuschätzen, wurde der Cl<sup>-</sup>-Leckstrom berechnet. Ein vereinfachtes Schema, das die Erzeugung der aktiven Cl<sup>-</sup>-Verteilung durch die Aktivität des K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporters beschreibt, ist in Abb. 30 wiedergegeben. In dem Schema sind alle so weit bekannten Transportsysteme sowie die Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ströme dargestellt, die mit der aktiven Cl<sup>-</sup>-Verteilung in Zusammenhang stehen. Die einwärtsgerichtete EMK<sub>Cl</sub> verursacht einen passiven Cl<sup>-</sup>-Einstrom, der von dem K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Cotransporter kompensiert wird. Der resultierende K<sup>+</sup>-Ausstrom wird von der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe kompensiert, wobei auch Na<sup>+</sup> aus der Zelle transportiert wird. Der Na<sup>+</sup>-Auswärtstransport zieht einen passiven Na<sup>+</sup>-Einstrom nach sich.

Bei Retzius-Neuronen beträgt  $R_{\text{Input}} \sim 10 \text{ M}\Omega$ ; dies entspricht einer Gesamtleitfähigkeit der Plasmamembran von  $10^{-7} \text{ S}$  (siehe Tabelle 16). Der Anteil der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit an  $R_{\text{Input}}$  beträgt  $\sim 20 \%$ , entsprechend einer  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit von  $2 \cdot 10^{-8} \text{ S}$  (vgl. 3.1.3). Mit  $\text{EMK}_{\text{Cl}} \sim 10 \text{ mV}$  berechnet sich der passive  $\text{Cl}^-$ -Strom zu  $2 \cdot 10^{-10} \text{ A}$ , d.h. es fließen ständig  $1,25 \cdot 10^9 \text{ Cl}^-/\text{s}$  in die Zelle. Bei einem Cytosolvolumen von  $160 \text{ pl}$  (siehe 4.2.2), sollte  $[\text{Cl}^-]_i$  bei ausbleibenden Auswärtstransport mit einer Rate von  $\sim 0,78 \text{ mM/min}$  ansteigen. Dieser Wert stimmt annähernd mit der Geschwindigkeit von  $\sim 0,52 \text{ mM/min}$  überein, mit der  $[\text{Cl}^-]_i$  nach Hemmung des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters durch Furosemid ansteigt (siehe 3.2.1, Abb. 16 A).

Bei P-Neuronen beträgt  $R_{\text{Input}} \sim 20 \text{ M}\Omega$ ; dies entspricht einer Gesamtleitfähigkeit von  $5 \cdot 10^{-8} \text{ S}$  (Tabelle 16). Der Anteil der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit an der Gesamtleitfähigkeit beträgt hier nur  $\sim 5 \%$ , entsprechend einer  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit von  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ S}$  (siehe 3.1.3). Bei einer  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$  von  $\sim 4 \text{ mV}$  beträgt der  $\text{Cl}^-$ -Einstrom  $10^{-11} \text{ A}$ , entsprechend  $6,25 \cdot 10^7 \text{ Cl}^-/\text{s}$ . Bei einem Cytosolvolumen von  $\sim 39 \text{ pl}$  ( $\varnothing \sim 50 \mu\text{m}$ ) sollte  $[\text{Cl}^-]_i$  bei fehlendem Auswärtstransport mit einer Rate von  $\sim 0,16 \text{ mM/min}$  ansteigen, was mit der experimentell bestimmten Geschwindigkeit des  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstiegs nach Hemmung des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters durch Furosemid übereinstimmt ( $\sim 0,16 \text{ mM/min}$ ; 3.2.1, Abb. 16 B).

Durch den  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter verlässt mit jedem nach außen transportierten  $\text{Cl}^-$  auch ein  $\text{K}^+$  die Zelle, d.h. die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe muss rechnerisch einen halben Zyklus durchlaufen, um den  $\text{K}^+$ -Verlust zu kompensieren. Das bedeutet weiter, dass für jedes die Zelle verlassende  $\text{Cl}^-$ -Ion, rechnerisch  $1\frac{1}{2}$   $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle aufgenommen werden müssten. Der  $\text{Na}^+$ -Einstrom muss also allein wegen der Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters  $1\frac{1}{2}$ -mal so groß sein wie der gesamte passive  $\text{Cl}^-$ -Einstrom. Das bedeutet aber nicht, dass die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran mindestens  $1\frac{1}{2}$ -mal so groß sein muss wie die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit. Auf  $\text{Na}^+$  wirkt bei Retzius-Neuronen eine  $\text{EMK}_{\text{Na}}$  von  $\sim 100 \text{ mV}$  ( $E_{\text{Na}} = +55 \text{ mV}$ ,  $E_m = -43,6 \text{ mV}$ ) ein, die etwa 10-mal so groß ist wie  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$ . Bei einem Anteil der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit an der Gesamtleitfähigkeit der Plasmamembran von  $\sim 20\%$  sollte der Anteil der  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit, der auf Grund der Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zu fordern ist, etwa  $\sim 3 \%$  der Gesamtleitfähigkeit betragen. Ohne Kompensation durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe sollte der  $\text{Na}^+$ -Einstrom, der wegen der Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zu

erwarten ist, bei Retzius-Neuronen zu einem  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg mit einer Geschwindigkeit von  $\sim 0,8$  mM/min führen.

Eine entsprechende Abschätzung bei P-Neuronen ergibt einen Anteil der  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit an der Gesamtleitfähigkeit von nur 0,3 % ( $\text{EMK}_{\text{Na}} = \sim 93$  mV). Nach Hemmung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe durch Ouabain wurde bei Retzius-Neuronen in der 1. Phase ein  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg mit einer Rate von  $\sim 3$  mM/min beobachtet (siehe 3.3.1), der etwa viermal so schnell erfolgt wie der  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg, der auf Grund der Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zu erwarten ist. Für den Betrieb des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters bei Retzius-Neuronen wird also 25 % der gesamten Pumpenaktivität benötigt. Bei P-Neuronen muss der  $\text{Na}^+$ -Einstrom, der die Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters begleitet, nur zu einem  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg mit einer Rate von 0,24 mM/min führen. Die Rate des Ouabain-induzierten  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstiegs betrug  $\sim 1,7$  mM/min, war also etwa siebenmal so groß wie aufgrund der Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zu erwarten. Dies entspricht einem Anteil von 15 % der Gesamtleistung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe, die für die Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters benötigt wird. Aus den Geschwindigkeiten des Ouabain-induzierten  $\text{Na}^+$ -Anstiegs ergibt sich, dass die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe bei Retzius- bzw. bei P-Neuronen pro min eine ATP-Menge verbraucht, die einer ATP-Konzentration von  $\sim 1$  bzw.  $\sim 0,6$  mM entspricht. Die Frage, warum Retzius- und P-Neuronen eine aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung aufweisen, die einen erheblichen Teil der Gesamtleistung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe benötigt, ist bisher nicht zu beantworten. Möglich ist, dass die aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung eine Rolle bei der synaptischen Inhibition der Neuronen spielt.

#### 4.3.4 Zusammenhang zwischen $E_m$ , $[\text{Cl}^-]_i$ und Zellvolumen

Die Richtung der Volumenänderung wird von der  $\text{Cl}^-$ -Bewegung bestimmt (siehe 4.2), wobei eine Zellschwellung immer mit einer  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme einhergeht und eine Zellschrumpfung mit einer  $\text{Cl}^-$ -Abgabe. Die  $[\text{Cl}^-]_i$ -Änderungen sind überwiegend von den  $E_m$ -Änderungen abhängig und beruhen auf einer Änderung von  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$ . Für das Zellvolumen unter isotonischen Bedingungen ist daher  $E_m$  entscheidend. Eine Membrandepolarisation verstärkt den passiven  $\text{Cl}^-$ -Einstrom, eine Membranhyperpolarisation dagegen reduziert ihn, so dass der  $\text{Cl}^-$ -Transport über den  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter zu einer  $[\text{Cl}^-]_i$ -Abnahme führt. Bei konstantem  $E_m$  bleibt  $[\text{Cl}^-]_i$  unverändert.

Der Zusammenhang zwischen  $E_m$ ,  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen konnte bei der Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren eindeutig gezeigt werden (Abb. 25 A). L-Glutamat beeinflusste sowohl  $E_m$  als auch  $[Cl^-]_i$  nur geringfügig und das Zellvolumen blieb konstant, während AMPA und Kainat eine anhaltende Membrandepolarisation, einen  $[Cl^-]_i$ -Anstieg und eine Zellschwellung verursachten. Die unterschiedlichen Antworten auf die Applikation der drei Agonisten beruhen darauf, dass die Rezeptoren gegenüber Glutamat desensitivieren, nicht jedoch gegenüber Kainat und AMPA (Ohno et al. 1997, Bleakman et al. 1998, Neumann 2003).

Da  $Cl^-$  sowohl das Gegenion für  $Na^+$  als auch für  $K^+$  darstellt, reicht es aus, die  $[Cl^-]_i$ -Änderung zu verfolgen, um auf eine Nettoaufnahme von NaCl bzw. eine Nettoabgabe von KCl zu schließen, die für eine Änderung des Zellvolumens verantwortlich sein könnte. Das Zellvolumen ändert sich linear mit der um das Volumen korrigierten  $[Cl^-]_i$ -Änderung (Abb. 25 B). Unter der Annahme, dass sich die Neuronen wie ideale Osmometer verhalten und die Änderung des Volumens direkt proportional zur Änderung der intrazellulären Osmolarität erfolgt, lässt sich der Zusammenhang zwischen  $[Cl^-]_i$  und dem Zellvolumen folgendermaßen abschätzen:

Die Osmolarität der physiologischen Badlösung betrug  $\sim 190$  mOsmol bei einer Gesamtkonzentration an Ionen von  $\sim 200$  mM. Da unter isotonischen Bedingungen extrazelluläre und intrazelluläre Osmolarität gleich sind, entspricht eine Änderung der intrazellulären Ionenkonzentration um 2 mM einer Änderung der intrazellulären Osmolarität bzw. des Zellvolumens um 1%. Dieser Zusammenhang wird durch die experimentellen Befunde bestätigt, nach denen eine volumenkorrigierte Änderung von  $[Cl^-]_i$  um 1 mM eine Zellvolumenänderung von 1% verursacht.

## 4.4 Ionaler Mechanismus der Zellvolumenänderung

### 4.4.1 Retzius-Neuronen

Zusammenfassend kann der Mechanismus, der zur Änderung des Zellvolumens durch die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe bzw. durch anhaltende Aktivierung von unspezifischen Kationenkanälen führt, folgendermaßen beschrieben werden: Eine Membrandepolarisation führt zu einer Erhöhung der  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$  und damit zur  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme. Die  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme erfolgt elektroneutral, da sie an die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme gekoppelt ist. Der  $\text{Na}^+$ -Einstrom übersteigt den  $\text{K}^+$ -Ausstrom, so dass eine Nettoaufnahme von  $\text{NaCl}$ , Wassereinstrom und Zellschwellung resultieren. Eine Membranhyperpolarisation verursacht dagegen eine  $\text{Cl}^-$ -Abgabe, die elektroneutral an einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom gekoppelt ist. Der  $\text{K}^+$ -Ausstrom übersteigt den  $\text{Na}^+$ -Einstrom, so dass  $\text{KCl}$ -Abgabe, Wasserverlust und Zellschrumpfung resultieren. Bleibt  $E_m$  unverändert, kommt es lediglich zum Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{K}^+$ , damit zu keiner Nettoaufnahme oder -abgabe von Ionen und das Zellvolumen bleibt konstant.

Eine verstärkte  $[\text{Cl}^-]_i$ -Abnahme wurde bei Retzius-Neuronen in  $\text{K}^+$ -freier Badlösung beobachtet, wobei hier die  $[\text{Cl}^-]_i$ -Abnahme unabhängig von der  $E_m$ -Änderung erfolgte und schon während der anfänglichen Membrandepolarisation einsetzte. Der  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom geht hier vermutlich auf eine verstärkte Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zurück. In  $\text{K}^+$ -freier Badlösung wird die  $\text{EMK}$  für  $\text{K}^+$  erhöht, der die Antriebskraft des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters verstärkt.

### 4.4.2 P-Neuronen

Der Zusammenhang zwischen  $E_m$ ,  $[\text{Cl}^-]_i$  und Zellvolumen erklärt die Variabilität der Zellvolumenänderungen, die bei P-Neuronen nach Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe beobachtet wurden und die offensichtlich die Variabilität der  $E_m$ -Verschiebung widerspiegeln (Abb. 19, 20, 23). Bei P-Neuronen führte der Ouabain-induzierte Zusammenbruch der Ionengradienten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  nicht zwangsläufig zur Membrandepolarisation. In der Hälfte der Experimente wurden  $E_m$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  nur geringfügig beeinflusst, so dass in diesen Fällen das Zellvolumen annähernd konstant blieb (Abb. 20). Die Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe in  $\text{K}^+$ -freier Badlösung führte trotz des Zusammenbruchs der Ionengradienten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$

zu einer vorübergehenden Membranhyperpolarisation (Abb. 22 A) und zu variablen Zellvolumenänderungen.

Die  $E_m$ -Stabilisierung bei P-Neuronen beruht auf der Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen, welche die  $K^+$ -Selektivität der Membran vergrößern, so dass sich  $E_m$  dem  $K^+$ -Gleichgewichtspotential ( $E_K$ ) annähert (Schlue & Deitmer 1984, Schlue 1991). Die Aktivierung der  $K^+$ -Kanäle geht wahrscheinlich auf den  $[Na^+]_i$ -Anstieg zurück, da die Ouabain-induzierte Hemmung der  $Na^+$ - $K^+$ -Pumpe in  $Na^+$ -freier Badlösung die  $K^+$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran nur geringfügig beeinflusst (Schlue 1991). Tatsächlich ist  $R_{Input}$  bei P-Neuronen von  $[Na^+]_i$  stark abhängig (Abb. 28), während bei Retzius-Neuronen praktisch keine  $Na^+$ -Abhängigkeit vorhanden ist (Abb. 29). Darüber hinaus zeigte sich, dass bei P-Neuronen im Ruhezustand  $[Na^+]_i$  von  $E_m$  unabhängig ist, und insbesondere, dass auch Zellen mit sehr negativem  $E_m$  eine relativ hohe  $[Na^+]_i$  besitzen können. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass P-Neuronen über  $Na^+$ -aktivierte  $K^+$ -Kanäle verfügen, die bei Zunahme von  $[Na^+]_i$  das  $E_m$  stabilisieren und damit Änderungen des Zellvolumens unterbinden. Darüber hinaus modulieren sie die Erregungsweiterleitung, indem sie die Auslösung von Aktionspotentialen unterbinden (Dryer 1994, Bischoff et al. 1998).

#### 4.5 Schlussbetrachtung

Für das Überleben von Zellen ist es notwendig, dass starke Änderungen des Zellvolumens vermieden werden, um die strukturelle Integrität und ein konstantes intrazelluläres Milieu zu gewährleisten. Insbesondere bei Neuronen sind Änderungen des Zellvolumens verheerend, da die Ionengradienten über der Plasmamembran und die strukturelle Integrität der Zellen Grundvoraussetzungen für die Aufrechterhaltung der Signalübertragung sind. Die Untersuchung der ionalen Änderungen bei Volumenänderungen und der daran beteiligten Transportsysteme ist daher für das Verständnis der Ursachen, die zu Zellvolumenänderungen führen, von entscheidender Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter isotonischen Bedingungen eine Zellschwellung bei Retzius- und P-Neuronen auf einer elektroneutralen NaCl-Aufnahme beruht und eine Zellschrumpfung auf einer elektroneutralen KCl-Abgabe. In beiden Vorgängen ist  $Cl^-$  involviert, und folglich spielt  $[Cl^-]_i$  bei der Regulation des

Zellvolumens eine entscheidende Rolle. Eine geringe  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran, wie sie bei P-Neuronen besteht, hat einen stabilisierenden Einfluss auf das Zellvolumen, indem sie  $\text{Cl}^-$ -Flüsse über die Plasmamembran verlangsamt und begrenzt. Darüber hinaus konnte bei P-Neuronen gezeigt werden, dass ein stabilisierender Einfluss auf  $E_m$ , wie durch die beschriebenen  $\text{Na}^+$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanäle, das Zellvolumen trotz massiver Störung des Fliessgleichgewichts konstant hält und somit das Überleben von Neuronen unter Stressbedingungen ermöglicht. Die Desensitivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren, wie sie bei Glutamat-Rezeptoren nach Aktivierung durch den physiologischen Agonisten L-Glutamat bei Retzius-Neuronen beobachtet wurde, stellt ebenfalls einen Schutzmechanismus gegen Zellvolumenänderungen dar, da sie eine längerfristige  $E_m$ -Änderung verhindert und somit einer Änderung des intrazellulären Milieus vorbeugt.

## 5. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurden ionale Mechanismen von Zellvolumenänderungen unter isotonischen Bedingungen bei Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems untersucht. Hierzu wurden mit Hilfe ionensensitiver Zweikanal- oder Dreikanal-Glasmikroelektroden die intrazellulären Konzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$ ,  $[\text{Cl}^-]_i$ ) sowie das Membranpotential ( $E_m$ ) gemessen. Das Zellvolumen wurde unter der Verwendung von organischen Volumenmarkern entweder mit Hilfe der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden oder der Mikrofluorimetrie ermittelt. Darüber hinaus wurde der Eingangswiderstand ( $R_{\text{Input}}$ ) der Neuronen mit der Current-Clamp Methode bestimmt, wobei gelegentlich elektrolytgefüllte und ionensensitive Mehrkanal-Glasmikroelektroden in den Messungen kombiniert wurden. Die Untersuchungen wurden bei Retzius-, P- (pressure), N1- (noxious), AP- (anterior pagoda) und Leydig -Neuronen durchgeführt.
2. Das  $E_m$  der Blutegel-Neuronen lag unter physiologischen Bedingungen zwischen  $-36$  und  $-43$  mV,  $R_{\text{Input}}$  zwischen 10 und 39  $\text{M}\Omega$ . Für die intrazellulären Ionenkonzentrationen wurden für  $\text{K}^+$  Werte zwischen 60 und 90 mM, für  $\text{Na}^+$  zwischen 6 und 12 mM und für  $\text{Cl}^-$  zwischen 11 und 17 mM bestimmt. Eine Abhängigkeit der intrazellulären Ionenkonzentrationen von  $E_m$  bestand bei allen Neuronen nur für  $\text{Cl}^-$ , wobei  $[\text{Cl}^-]_i$  umso kleiner, je negativer  $E_m$  war. Bei Retzius-Neuronen war  $[\text{Na}^+]_i$  ebenfalls umso kleiner, je negativer  $E_m$  war, während bei P-Neuronen  $[\text{Na}^+]_i$  unabhängig von  $E_m$  war.
3. Die Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker  $\text{TMA}^+$  erfolgte durch extrazelluläre  $\text{TMA}^+$ -Applikation (5 mM). Alle Neuronen zeigten vergleichbare  $\text{TMA}^+$ -Aufnahmeraten von  $\sim 0,3$  mM/min. Die  $\text{TMA}^+$ -Applikation führte über die Aktivierung von Acetylcholin-Rezeptoren zu  $E_m$ - und  $R_{\text{Input}}$ -Änderungen, die innerhalb von Minuten reversibel waren. Die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme bei Retzius-Neuronen wurde weder durch die Entfernung des extrazellulären  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Cl}^-$ , noch durch Verstellung des extrazellulären pH-Werts beeinflusst.

4. Bei allen Neuronen war  $\text{Cl}^-$  aktiv verteilt, so dass eine in das Neuron gerichtete elektromotorische Kraft für  $\text{Cl}^-$  ( $\text{EMK}_{\text{Cl}}$ ) bestand. Die aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei Retzius- und P-Neuronen wird primär durch einen  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter bewirkt. Die Plasmamembran der Retzius-Neuronen besitzt unter Ruhebedingungen eine relativ hohe  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit, da zum einen die unspezifische Hemmung von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen durch die Applikation von DIDS zu einer Zunahme von  $R_{\text{Input}}$  um  $> 20\%$  führte. Zum anderen fiel  $[\text{Cl}^-]_i$  nach Entzug des extrazellulären  $\text{Cl}^-$  bei Retzius-Neuronen mit  $\sim 3,3\text{ mM/min}$  rasch ab. P-Neuronen zeigten dagegen eine geringe  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit, da DIDS nur einen  $R_{\text{Input}}$ -Anstieg um  $\sim 5\%$  bewirkte und die  $[\text{Cl}^-]_i$ -Abnahme in  $\text{Cl}^-$ -freier Badlösung mit  $\sim 1,3\text{ mM/min}$  langsamer abfiel.
5. Bei Retzius-Neuronen führte die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe durch Ouabain zu einer Membrandepolarisation in drei Stufen, einem  $[\text{Na}^+]_i$ - und  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg, einer  $[\text{K}^+]_i$ -Abnahme und zur Zellschwellung. Die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe durch die Applikation einer  $\text{K}^+$ -freien Badlösung führte dagegen zu einer Membranhyperpolarisation, einem  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg, einer  $[\text{K}^+]_i$ - und  $[\text{Cl}^-]_i$ -Abnahme, die auf eine verstärkte Aktivität des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zurückgeht und zur Zellschrumpfung. Die Abschätzung der Ionenflüsse über die Plasmamembran ergab für die Zellschwellung eine elektroneutrale  $\text{NaCl}$ -Aufnahme und für die Zellschrumpfung eine elektroneutrale  $\text{KCl}$ -Abgabe.
6. Bei P-Neuronen führte die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe durch Ouabain bzw. durch  $\text{K}^+$ -freie Badlösung grundsätzlich zu den gleichen Veränderungen wie bei Retzius-Neuronen, jedoch variierten die experimentellen Daten erheblich stärker. Auffällig war zum einen, dass Ouabain häufig  $E_m$  und  $[\text{Cl}^-]_i$  nicht beeinflusste und  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{K}^+]_i$  geringer verändert wurden als bei Retzius-Neuronen. Zum anderen führte die Applikation  $\text{K}^+$ -freier Badlösung trotz erheblicher Schwächung des  $\text{K}^+$ -Gradienten häufig zu einer ausgeprägten Membranhyperpolarisation. Die ungewöhnlichen  $E_m$ -Änderungen bei P-Neuronen nach Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe lassen sich durch die Aktivierung von  $\text{Na}^+$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanälen erklären.

7. Die Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren bei Retzius-Neuronen durch die Glutamat-Agonisten Kainat und AMPA führte zu Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen sowie zur Zellschwellung, während L-Glutamat die Ionenkonzentrationen und das Zellvolumen kaum beeinflusste. Die Aktivierung der 5-HT-Rezeptoren bei P-Neuronen führte ebenfalls zu Ionenkonzentrationsänderungen sowie zur Zellschwellung. Dabei zeigte sich insgesamt, dass zwischen  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen ein enger Zusammenhang besteht, wobei eine  $[Cl^-]_i$ -Änderung um  $\sim 1$  mM eine Volumenänderung um  $\sim 1$  % verursachte.
  
8. Bei P-Neuronen wurde ein enger Zusammenhang zwischen  $[Na^+]_i$  und  $R_{Input}$  nachgewiesen. Mit zunehmender  $[Na^+]_i$  nahm  $R_{Input}$  um bis zu 95 % ab und kehrte mit abnehmender  $[Na^+]_i$  wieder auf seinen Ausgangswert zurück. Zusammen mit früheren Befunden kann damit die Existenz von  $Na^+$ -aktivierten  $K^+$ -Kanälen bei P-Neuronen als gesichert angesehen werden. Diese Kanäle führen bei einem  $[Na^+]_i$ -Anstieg zu einer  $E_m$ -Stabilisierung und wirken damit auch stabilisierend auf das Zellvolumen.
  
9. Insgesamt zeigen die Befunde, dass unter isotonischen Bedingungen eine Schwellung von Blutegel-Neuronen auf einer  $NaCl$ -Aufnahme und eine Schrumpfung auf einer  $KCl$ -Abgabe beruht. Offenbar wird die Richtung der Volumenänderung von der  $E_m$ -Änderung bestimmt, die vorgibt, ob  $Cl^-$  in das Neuron hinein oder aus dem Neuron heraus fließt. Eine geringe  $Cl^-$ -Leitfähigkeit sowie Mechanismen, die zu einer Stabilisierung von  $E_m$  beitragen, reduzieren daher die Anfälligkeit der Neuronen gegenüber Zellvolumenänderungen.

## 6. Anhang

Nachfolgend wird die Verwendung von  $\text{TMA}^+$  als Volumenmarker zur Messung des Zellvolumens mit Hilfe der Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden eingehend behandelt.  $\text{TMA}^+$  wird von den Neuronen aktiv aufgenommen und nach Entfernung aus dem Extrazellulärraum auch wieder abgegeben. Die Geschwindigkeiten dieser  $\text{TMA}^+$ -Bewegungen wurden bestimmt und ergänzende Versuche zur Charakterisierung des  $\text{TMA}^+$ -Aufnahmemechanismus vorgenommen. Außerdem wird die Wirkung von  $\text{TMA}^+$ , einem unspezifischen Agonisten sowohl von muskarinischen (mAChR) als auch von nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR; Papke et al. 1996, Shi et al. 1999), auf das Membranpotential ( $E_m$ ) und den Eingangswiderstand ( $R_{\text{Input}}$ ) der Neuronen beschrieben.

### 6.1 Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker $\text{TMA}^+$

Alle hier untersuchten Neuronen (Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen) können  $\text{TMA}^+$  aus der Badlösung aufnehmen (Neumann et al. 2001). In den Versuchen wurden die Zellen durch extrazelluläre Applikation von 5 mM TMA-Cl mit  $\text{TMA}^+$  beladen. Die intrazelluläre  $\text{TMA}^+$ -Konzentration ( $[\text{TMA}^+]_i$ ) stieg bei den verschiedenen Neuronen mit maximalen Raten zwischen 0,30 und 0,35 mM/min praktisch gleich schnell an (Tabelle 22). In  $\text{TMA}^+$ -freier Lösung verloren alle Neuronen ihr aufgenommenes  $\text{TMA}^+$ , wobei die Rate der  $\text{TMA}^+$ -Abgabe um einen Faktor 3-4 langsamer war als die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme. Bei P-Neuronen war die  $\text{TMA}^+$ -Abgaberate signifikant kleiner als bei Retzius-Neuronen, während die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahmerate bei beiden Neuronentypen praktisch gleich war. Entsprechend war bei P-Neuronen die  $\text{TMA}^+$ -Abgabe um einen Faktor 5-6 langsamer als die der  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme. Die Ergebnisse stimmen mit den Daten früherer Arbeiten gut überein (Neumann 2000, 2003, Neumann et al. 2001, Klees 2002, Dierkes et al. 2002, 2003). Eine  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme aus dem Extrazellulärraum wurde auch bei Neuropil-Gliazellen beschrieben (Ballanyi & Schlue 1998), die im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme- bzw.  $\text{TMA}^+$ -Abgaberate lag bei Neuropil-Gliazellen jedoch um etwa eine Größenordnung höher als bei den Neuronen (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Maximale Raten der TMA<sup>+</sup>-Aufnahme und TMA<sup>+</sup>-Abgabe**

Zelltyp	TMA <sup>+</sup> -Aufnahme (mM/min)	TMA <sup>+</sup> -Abgabe (mM/min)
<b>Retzius</b>	0,33 ± 0,19 n = 49	0,11 ± 0,09 n = 44
<b>P</b>	0,34 ± 0,26 n = 36	0,06 ± 0,04 *
<b>N1</b>	0,30 ± 0,22 n = 24	0,08 ± 0,05 n = 24
<b>AP</b>	0,32 ± 0,20 n = 15	0,08 ± 0,06 n = 15
<b>Leydig</b>	0,32 ± 0,30 n = 21	0,09 ± 0,09 n = 21
<b>Neuropil-Gliazelle</b>	4,2 ± 1,1 ** n = 6	0,5 ± 0,3 ** n = 4

Mittelwerte ± S.D aus n = 4-49 Versuchen. Die Aufnahmeraten wurden während der Applikation von 5 mM TMA-Cl bestimmt, die Abgaberaten nach Wegnahme des TMA-Cl. Die bei den verschiedenen Zelltypen ermittelten TMA<sup>+</sup>-Aufnahme- bzw. TMA<sup>+</sup>-Abgaberaten wurden jeweils auf signifikante Unterschiede zu den Werten bei Retzius-Neuronen überprüft (\*, p ≤ 0,05; \*\*, p ≤ 0,01).

TMA<sup>+</sup>-Aufnahme und -Abgabe unterschieden sich erheblich von Neuron zu Neuron. Beispielsweise variierte bei Retzius-Neuronen die TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate zwischen 0,07 und 0,74 mM/min und die -Abgaberate zwischen 0,01 und 0,45 mM/min. Eine ähnliche Variabilität wurde auch bei den anderen Neuronen gefunden. Die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme- und -Abgaberaten waren vom E<sub>m</sub> der Neuronen unabhängig (Abb. 31 A,B), jedoch war der untersuchte E<sub>m</sub>-Bereich von -55 bis -35 mV gering, so dass eine Spannungsabhängigkeit nicht sicher ausgeschlossen ist. Es zeigte sich, dass Neuronen mit einer hohen TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate auch eine hohe TMA<sup>+</sup>-Abgaberate besaßen, während Neuronen mit niedriger TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate eine niedrige TMA<sup>+</sup>-Abgaberate aufwiesen (Abb. 31 C). Dieses lässt vermuten, dass die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme und -Abgabe über denselben Mechanismus erfolgen könnten.

## 6.2 Charakterisierung des TMA<sup>+</sup>-Aufnahmemechanismus

Der TMA<sup>+</sup>-Aufnahmemechanismus von Blutegel-Neuronen ist bisher unbekannt. Die Vorstellung, dass TMA<sup>+</sup> durch aktivierte nAChR in die Neuronen gelangen könnte (Creese et al. 1977, Dwyer et al 1980, Ballanyi & Schlue 1989), ist wohl auszuschließen, da die

TMA<sup>+</sup>-Aufnahme von Retzius-Neuronen bei Hemmung der AChR mit d-Tubocurarin unbeeinflusst war (Neumann 2000).

Die im Vergleich zu Neuropil-Gliazellen langsame TMA<sup>+</sup>-Aufnahme durch die Neuronen könnte auf unterschiedliche Mechanismen des TMA<sup>+</sup>-Transportes hindeuten. Es erscheint jedoch eher wahrscheinlich, dass beide Zelltypen ein und denselben Transporter exprimieren, da Retzius-Neuronen und Neuropil-Gliazellen auch andere quaternäre Ammoniumionen aufnehmen können, wie beispielsweise Cholin<sup>+</sup> oder TEA<sup>+</sup> (Ballanyi & Schlue 1989, Neumann 2000, Neumann et al. 2001, Dierkes et al. 2002a, 2003). Die hohe TMA<sup>+</sup>-Transportrate bei den Neuropil-Gliazellen könnte auf dem großen Oberflächen-Volumenverhältnis beruhen oder einfach auf einer stärkeren Expression des Transportsystems.

Der TMA<sup>+</sup>-Aufnahmemechanismus wurde bei Retzius-Neuronen näher untersucht. Bei diesen Neuronen stieg die TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate mit der TMA<sup>+</sup>-Konzentration in der Badlösung an (Tabelle 23). Bei Anwendung des Michaelis-Menten-Formalismus auf die experimentellen Daten ließ sich der K<sub>m</sub>-Wert der TMA<sup>+</sup>-Aufnahme zu 1,7 mM abschätzen. Um nähere Informationen über den Transportmechanismus zu erhalten, wurde zusätzlich die Konzentrationsabhängigkeit der TEA<sup>+</sup>-Aufnahme bestimmt. Retzius-Neuronen nahmen TEA<sup>+</sup> deutlich langsamer auf als TMA<sup>+</sup>, der K<sub>m</sub>-Wert der TEA<sup>+</sup>-Aufnahme wurde zu 4,3 mM abgeschätzt.

**Tabelle 23: Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von TMA<sup>+</sup> bzw. TEA<sup>+</sup> bei Retzius-Neuronen**

TMA <sup>+</sup> - bzw. TEA <sup>+</sup> - Konzentrationen (mM)	TMA <sup>+</sup> -Aufnahme (mM/min)	TEA <sup>+</sup> -Aufnahme (mM/min)
0,25	0,01 ± 0,007	n.b.
0,5	0,04 ± 0,018	0,001 ± 0,001
2	0,19 ± 0,066	0,015 ± 0,021
5	0,28 ± 0,113	0,042 ± 0,042
10	0,34 ± 0,150	0,063 ± 0,052
15	n.b.	0,074 ± 0,071

Mittelwerte ± S.D. aus n = 4-8 Messungen (n.b. = nicht bestimmt). Um die Osmolarität der Badlösungen konstant zu halten, wurde NaCl durch die entsprechende Menge TMA-Cl bzw. TEA-Cl ersetzt.

Der Transport von  $\text{TMA}^+$ ,  $\text{TEA}^+$  und anderer quaternärer Ammoniumionen könnte durch organische Kationentransporter vermittelt werden, die bei zahlreichen Präparaten beschrieben wurden und dort die Aufnahme dieser Substanzen bewerkstelligen (Villalobos 1998, Koepsell 1999, Yabuuchi 1999, Dresser et al. 2000). Viele organische Kationentransporter sind  $\text{H}^+$ -Antiporter oder  $\text{Na}^+$ -Cotransporter, die auch eine  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit und/oder Spannungsabhängigkeit aufweisen können (Villalobos & Braun 1998, Kekuda et al. 1998, Rossum & Boyd 1998, Okuda et al. 1999, Gründemann et al. 1999, Yabuuchi et al. 1999, Villalobos et al. 1999, Wagner et al. 2000). Aus diesem Grund wurde bei Retzius-Neuronen die Abhängigkeit der  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme vom extrazellulären pH-Wert und der  $\text{Na}^+$ - bzw.  $\text{Cl}^-$ -Konzentration untersucht (Abb. 32).

Die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme bei Retzius-Neuronen ist pH-unabhängig, da sie weder durch extrazelluläre Ansäuerung auf  $\text{pH} = 6,2$  noch durch Alkalisierung auf  $\text{pH} = 8,2$  beeinflusst wurde. Außerdem wurde die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme weder durch den Ersatz des extrazellulären  $\text{Na}^+$  durch  $\text{NMDG}^+$  noch durch den Austausch des extrazellulären  $\text{Cl}^-$  gegen  $\text{SO}_4^{2-}$  beeinflusst (Abb. 32).

Aufgrund dieser Befunde ist auszuschließen, dass die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme bei Retzius-Neuronen durch ein dem hochaffinen Cholin-Transporter (CHT1) verwandtes System erfolgt, da dieser Transporter  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -abhängig arbeitet. Der CHT1 zeigt Homologien zur Familie der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glucose-Transporter, die über zwölf membrandurchspannende,  $\alpha$ -helicale Regionen verfügen (Okuda et al. 2000, Koepsell et al. 2003).

Für die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme kommen eher die „klassischen“ organischen Kationentransporter (OCT, „organic cation transporter“) in Frage. Diese gehören alle zu einer Transporterfamilie, deren Mitglieder sich in ihrer Aminosäuresequenz nur wenig voneinander unterscheiden und ebenfalls über zwölf membrandurchspannende,  $\alpha$ -helicale Regionen verfügen (Koepsell et al. 1999, Burckhardt & Wolff 2000, Dresser et al. 2000). Bei Vertebraten wurden OCTs in vielen Organen, unter anderem auch im Gehirn, nachgewiesen und sind dort für den Transport von  $\text{TMA}^+$ ,  $\text{TEA}^+$  und anderen quaternären Ammoniumionen verantwortlich (Villalobos 1998, Koepsell 1999, Yabuuchi 1999, Dresser et al. 2000).

Die OCTs der Untergruppe OCTN1-2 zeigen alle einen  $\text{Na}^+$ - oder pH-abhängigen Transport (Koepsell et al. 1998, Yabuuchi et al. 1999) und kommen daher für die  $\text{TMA}^+$ - bzw.  $\text{TEA}^+$ -Aufnahme bei Blutegel-Neuronen nicht in Frage. Zudem ist die Affinität dieser Transporter für  $\text{TEA}^+$  mit  $K_m$ -Werten zwischen 0,2-0,4 mM (Wagner et al. 2000, Koepsell et al. 2003) sehr viel höher als die des  $\text{TEA}^+$ -Transports bei Retzius-Neuronen (4,3 mM).

Die OCTs der Untergruppen OCT1-2 und OCT3 zeigen einen  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Cl}^-$ - und pH-unabhängigen Transport (Busch et al. 1996, Gorboulev et al. 1997, Kekuda et al. 1998, Koepsell et al. 2003). Der Transport von organischen Kationen wie  $\text{TEA}^+$  ist jedoch spannungsabhängig (Gründemann et al. 1994, Dresser et al. 2000, Arndt et al. 2001). Da ein spannungsabhängiger  $\text{TMA}^+$ -Transport bei Retzius-Neuronen nicht ausgeschlossen werden konnte, könnte einer dieser Transporter für den  $\text{TMA}^+$ -Transport in Frage kommen. OCT1 wurde bisher noch nicht im Gehirn nachgewiesen und ist hauptsächlich in Niere, Leber und Darm lokalisiert, OCT2 und OCT3 kommen dagegen auch im Gehirn vor. Der  $K_m$ -Wert für den  $\text{TEA}^+$ -Transport durch den OCT3 beträgt 2,5 mM und liegt damit im Bereich des  $K_m$ -Werts bei Retzius-Neuronen, wohingegen die  $K_m$ -Werte für den  $\text{TEA}^+$ -Transport durch OCT1 und OCT2 um das 20-fache höher liegen (Koepsell et al. 2003). Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass von den bislang bei Vertebraten beschriebenen OCTs am ehesten der OCT3 für die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme bei Blutegel-Neuronen in Frage kommt.

### **6.3 Wirkung von $\text{TMA}^+$ als AChR-Agonist bei Blutegel-Neuronen**

Im Blutegel-ZNS sind bei vielen Neuronen ionotrope AChR nachgewiesen worden, die zum einen  $\text{Cl}^-$ -permeable Kanäle und zum anderen unspezifische Kationenkanäle sind (Ballanyi & Schlue 1989, Bigiani & Pellegrino 1990, Schmidt & Calabrese 1992, Kristan et al. 1993, Szczupak et al. 1993, 1998). In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung von  $\text{TMA}^+$  auf die verschiedenen Blutegel-Neuronen untersucht und mit der Wirkung von Carbachol verglichen, ebenfalls ein Agonist von mAChR und nAChR.

Die  $E_m$ -Änderungen, die bei den verschiedenen Neuronen durch die Applikation von  $\text{TMA}^+$  ausgelöst wurden, waren hinsichtlich ihrer Polarität und Amplitude sehr unterschiedlich (Abb. 33). Bei Retzius-Neuronen induzierte 5 mM  $\text{TMA}^+$  eine schnelle,

transiente Membrandepolarisation ( $6,1 \pm 3,5$  mV,  $n = 38$ ), nach der  $E_m$  entweder auf den Ausgangswert zurückkehrte ( $n = 6$ ) oder eine langanhaltende Membrandepolarisation oder -hyperpolarisation folgte ( $5,3 \pm 3,9$  mV,  $n = 15$ ;  $-4,5 \pm 2,6$  mV,  $n = 16$ ). Leydig-Neuronen antworteten ebenfalls mit einer transienten Membrandepolarisation vergleichbarer Amplitude ( $5,8 \pm 3,8$  mV,  $n = 15$ ), nach der jedoch fast immer eine langanhaltende Membrandepolarisation auftrat ( $5,0 \pm 3,5$  mV,  $n = 15$ ). Bei P- und N1-Neuronen wurde  $E_m$  kaum durch  $TMA^+$  beeinflusst. Beide Zelltypen reagierten meistens nur mit einer geringen, transienten Membrandepolarisation (P:  $2,4 \pm 1,8$  mV,  $n = 19$ ; N1:  $3,2 \pm 2,9$  mV,  $n = 15$ ). Bei AP-Neuronen induzierte  $TMA^+$  eine schnelle Membranhyperpolarisation ( $-9,5 \pm 5,0$  mV,  $n = 16$ ), die nachfolgend kontinuierlich abnahm und nach einigen min einen stationären Wert erreichte ( $-5,6 \pm 5,3$  mV).

Die Carbachol-Applikation, führte bei allen untersuchten Neuronen zu ähnlichen  $E_m$ -Änderungen wie  $TMA^+$ . Retzius-Neuronen reagierten auf die Gabe von 0,5 mM Carbachol mit einer transienten Membrandepolarisation ( $11,7 \pm 4,2$  mV,  $n = 13$ ), auf die stets eine langanhaltende Membrandepolarisation folgte ( $3,5 \pm 2,6$  mV). Leydig-Neuronen antworteten wie Retzius-Neuronen, nur waren die Amplituden der transienten bzw. langanhaltenden Membrandepolarisation geringer ( $5,8 \pm 1,0$  mV,  $n = 4$  bzw.  $2,9 \pm 1,6$  mV,  $n = 3$ ). Bei P- und N1-Neuronen übte Carbachol praktisch keine Wirkung auf  $E_m$  aus (P:  $0,0 \pm 1,7$  mV,  $n = 9$ ; N1:  $1,6 \pm 1,5$  mV,  $n = 4$ ). Bei AP-Neuronen löste Carbachol eine Membranhyperpolarisation aus ( $-9,8 \pm 5,3$  mV,  $n = 5$ ), deren Amplitude nachfolgend abnahm und am Ende der 5-minütigen Applikation  $-4,5 \pm 4,7$  mV betrug. Die Wirkung von Carbachol bei verschiedenen Blutegel-Neuronen auf zelluläre Parameter, wie  $E_m$ , Aktionspotentialaktivität,  $[Ca^{2+}]_i$  und  $[Na^+]_i$  wurde schon von Dierkes (1998) ausführlich beschrieben, dessen Befunde mit den hier erhaltenen Ergebnissen übereinstimmen.

Um die Wirkung von  $TMA^+$  und Carbachol genauer zu charakterisieren, wurde deren Wirkung auf den Eingangswiderstand ( $R_{Input}$ ) von Retzius-, P- und AP-Neuronen untersucht (Abb. 34, 35). Diese Neuronen wurden ausgewählt, weil sich ihre  $E_m$ -Antworten auf die  $TMA^+$ - bzw. Carbachol-Applikation stark unterschieden (siehe Abb. 33).  $R_{Input}$  wurde anhand der  $E_m$ -Änderung bei Injektion von hyperpolarisierenden Strompulsen bestimmt. Bei allen drei Neuronen führte die Applikation von 5 mM  $TMA^+$  bzw. 0,5 mM Carbachol zu einer Abnahme von  $R_{Input}$  (Tabelle 24, Abb. 34, 35), wobei die Abnahme bei Retzius-

und AP-Neuronen deutlich größer war als bei P-Neuronen. Bei AP-Neuronen konnte kein Unterschied zwischen der durch  $\text{TMA}^+$  bzw. Carbachol induzierten  $R_{\text{Input}}$ -Abnahme festgestellt werden, während bei Retzius- und P-Neuronen die durch  $\text{TMA}^+$  ausgelöste Abnahme um  $\sim 50\%$  größer war als die durch Carbachol verursachte Abnahme. Die Wirkung von  $\text{TMA}^+$  und Carbachol auf die  $R_{\text{Input}}$ -Abnahme war bei allen 3 untersuchten Neuronen vollständig reversibel.

**Tabelle 24: Wirkung von  $\text{TMA}^+$  und Carbachol auf  $R_{\text{Input}}$  bei Retzius, P- und AP-Neuronen**

Agonist	Zelltyp	$R_{\text{Input}}$ ( $\text{M}\Omega$ )	min. $R_{\text{Input}}$ ( $\text{M}\Omega$ )	$\Delta R_{\text{Input}}$ (%)
<b>5 mM <math>\text{TMA}^+</math></b>	<b>Retzius</b> (n = 9)	$9,3 \pm 2,8$	$1,5 \pm 0,8$	-84
	<b>AP</b> (n = 3)	$22,9 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,4$	-79
	<b>P</b> (n = 4)	$20,7 \pm 2,4$	$11,1 \pm 2,2$	-46
<b>0,5 mM Carbachol</b>	<b>Retzius</b> (n = 13)	$9,4 \pm 2,4$	$5,4 \pm 1,0$	-41
	<b>AP</b> (n = 4)	$21,6 \pm 2,8$	$4,0 \pm 0,4$	-81
	<b>P</b> (n = 3)	$23,3 \pm 3,8$	$17,3 \pm 2,6$	-24

Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus n = 3-13 Messungen. Angegeben sind  $R_{\text{Input}}$  vor der Applikation von 5 mM  $\text{TMA}^+$  bzw. 0,5 mM Carbachol, der minimale (min.)  $R_{\text{Input}}$  in Gegenwart der Substanzen und die Änderung von  $R_{\text{Input}}$  in Prozent des Ausgangswerts.

Möglicherweise spiegelt die unterschiedliche Wirkung von  $\text{TMA}^+$  und Carbachol auf die verschiedenen Neuronen die unterschiedliche Expression von AChRs wider. Bei Retzius-Neuronen wurden drei ionotrope AChRs beschrieben, zwei Kationenkanäle, von denen einer schnell desensitiviert, während der andere anhaltend aktiv ist, sowie ein langsam desensitivierender  $\text{Cl}^-$ -Kanal (Szczupak et al. 1993, 1998). Offenbar sind die schnell desensitivierenden Kationenkanäle für die transiente Membrandepolarisation verantwortlich, während die nicht bzw. langsam desensitivierenden Kationen- bzw.  $\text{Cl}^-$ -Kanäle das  $E_m$  bei längerer Applikation der Agonisten bestimmen, wobei bei einigen Zellen der Einfluss der Kationenkanäle überwiegt und bei anderen der Einfluss der  $\text{Cl}^-$ -Kanäle. Leydig-Neuronen reagierten auf  $\text{TMA}^+$  und Carbachol ähnlich wie Retzius-Neuronen, was auf eine ähnliche AChR-Ausstattung hinweist. Allerdings ist der Einfluss des langsam desensitivierenden  $\text{Cl}^-$ -Kanals bei Leydig-Neuronen anscheinend schwächer, da auf die transiente Membrandepolarisation immer eine anhaltende Membrandepolarisation folgte. Bei AP-Neuronen wurde nur ein nicht desensitivierender,  $\text{Cl}^-$ -permeabler AChR beschrieben (Pellegrino &

Simonneau 1984), der offensichtlich für die Membranhypolarisation verantwortlich ist. Bei P- und N1-Neuronen wurden bisher keine AChRs gefunden. Die geringe, transiente Membrandepolarisation dieser Zellen könnte entweder durch die Aktivierung eines schnell desensitivierenden unspezifischen Kationenkanals oder auch durch exzitatorischen Eingang über synaptische Verbindungen bedingt sein.

Insgesamt gesehen induzierte  $\text{TMA}^+$  bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen ähnliche  $E_m$ -Antworten wie Carbachol, so dass zu vermuten ist, dass  $\text{TMA}^+$  ausschließlich AChR aktiviert. Wichtig für die Verwendung von  $\text{TMA}^+$  als Volumenmarker ist, dass dessen Wirkung auf  $E_m$  und  $R_{\text{Input}}$  reversibel war und somit die  $\text{TMA}^+$ -Beladung die elektrophysiologischen Eigenschaften der Neuronen nicht langfristig beeinflusste.

## 7. Literaturverzeichnis

Adorante J.S., Miller S.S. (1990) Potassium-dependent volume regulation in retinal pigment epithelium is mediated by Na, K, Cl cotransport. *J. Gen. Physiol.* **96**: 1153-1176

Agre P. (2004) Aquaporin water channels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**: 4278-4290

Alvarez-Leefmans F.J., Gamino S.M., Reuss L. (1992) Cell volume changes upon sodium-pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **458**: 603-619

Ammann D. (1986) Ion-Selective Microelectrodes. *Springer-Verlag, Berlin*

Angstadt J.D. (1999) Persistent inward currents in cultured Retzius cells of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A* **184**: 49-61

Armstrong C.M. (2003) The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 6257-6262

Ballanyi K., Schlue W.-R. (1989) Electrophysiological characterization of a nicotinic acetylcholine receptor on leech neuropile glial cells. *Glia* **2**: 330-345

Ballanyi K., Dörner R., Schlue W.-R. (1989) Glutamate and kainate increase intracellular sodium activity in leech neuropile glial cells. *Glia* **2**: 51-54

Ballanyi K., Schlue W.-R. (1990) Intracellular chloride activity in glial cells of the leech central nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* **420**: 325-336

Ballanyi K., Grafe P., Serve G., Schlue W.-R. (1990) Electrophysiological measurements of volume changes in leech neuropile glial cells. *Glia* **3**: 151-158

Bancel F., Salmon J.-M., Vigo J., Vo-Dinh T., Viallet P. (1992) Investigation of non-calcium interactions of Fura-2 by classical and synchronous fluorescence spectroscopy. *Anal. Biochem.* **204**: 231-238

- Beck A., Lohr C., Nett W., Deitmer J.W. (2001) Bursting activity in leech Retzius neurons induced by low external chloride. *Pflügers Arch.* **442**: 263-72
- Behnam-Motlagh P., Engstrom K.G. Henriksson R., Grankvist K. (1999) Serotonergic modulation of cell volume response to estramustine: an image-analysis study on perfused individual glioma cells. *Eur. J. Cancer* **35**: 145-153
- 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
- Bettler B., Mülle C. (1995) Review neurotransmitter receptors II: AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* **34**: 123-139
- Bevensee M.O., Bashi E., Schlue W.-R., Boyarsky G., Boron W.F. (1999) Shrinkage-induced activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **276**: C674-C688
- Bigini A., Pellegrino M. (1990) Reduction in extrasynaptic acetylcholine sensitivity of axotomized anterior pagoda neurones in the leech. *J. Exp. Biol.* **151**: 423-34
- Bischoff U., Vogel B., Safronov B.V. (1998) Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J. Physiol. (Lond.)* **510**: 743-754
- Bleakman D., Lodge D. (1998) Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* **37**: 1187-1204
- Brodfehrer P.D., Cohen A.H. (1990) Initiation of swimming activity in the medicinal leech by glutamate, quisqualate and kainate. *J. Exp. Biol.* **154**: 567-572
- Brown E., Kendall D.A., Nahorski S.R. (1984) Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices: receptor characterization. *J. Neurochem.* **42**: 1379-1387

- Burckhardt G., Wolff N.A. (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol.* **278**: F853-F866
- Coles J.A., Tsacopoulos M. (1977) A method of making fine double-barrelled potassium-sensitive micro-electrodes for intracellular recording. *J. Physiol. (Lond.)* **270**: 12P-14P
- Coulon P., Klees G., Dierkes P.W., Schlue W.-R. (2003) Effect of hyposmotic conditions on cell volume and electrophysiological properties of leech Retzius neurons. In: *Elsner N., Zimmermann H. (Hrsg.), The Neurosciences from Basic Research to Therapy. Proceedings of the 29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference and the 5<sup>th</sup> Meeting of German Neuroscience Society, Georg Thieme Verlag Stuttgart* p. 795
- Colwell C.S., Levine M.S. (1996) Glutamate receptor-induced toxicity in neostriatal cells. *Brain Res.* **724**: 205-212
- Crees R., Franklin G.I., Mitchell L.D. (1977) Sodium entry in rat diaphragm induced by depolarizing drugs. *J. Physiol. (Lond.)* **272**: 295-316
- Crowe W.E., Altamirano J., Huerto L., Alvarez-Leefmans F.J. (1995) Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* **6**: 283-296
- Churchwell K.B., Wright S.H., Emma F., Rosenberg P.A., Strange K. (1996) NMDA receptor activation inhibits neuronal volume regulation after swelling induced by veratridine-stimulated Na<sup>+</sup> influx in rat cortical cultures. *J. Neurosci.* **16**: 7447-7457
- Deitmer J. W., Schlue W.-R. (1981) Measurements of the intracellular potassium activity of Retzius cells in the leech central nervous system. *J. Exp. Biol.* **91**: 87-101
- Deitmer J.W., Schlue W.-R. (1983) Intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in leech Retzius neurones during inhibition of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump. *Pflügers Arch.* **397**: 195-201

- Dick D.A.T. (1970) Water movements in cells. In: *Bitton E.E. (Ed.), Membranes and Ion Transport, Vol.3, Wiley Intersc. Lond.* pp. 211-250
- Dierkes P.W., Hochstrate P., Schlue W.-R. (1996) Distribution and functional properties of glutamate receptors in the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.* **75**: 2312-2321
- Dierkes P.W. (1998) Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren in Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Dierkes P.W., Coulon P., Neumann S., Schlue, W.-R. (2002a) Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations under voltage-clamp conditions in invertebrate nerve cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 762-766
- Dierkes P.W., Neumann S., Klees G., Hochstrate P., Schlue W.-R. (2002b) Ionic mechanism of cell swelling induced by activation of glutamate receptors in leech Retzius neurones. *Pflügers Arch.* **443**: S 230
- Dierkes P.W., Neumann S., Müller A., Günzel D., Schlue W.-R. (2002c) Simultaneous measurement of changes in cell volume, membrane potential and intracellular ion concentrations in invertebrate nerve cells by multi-barrelled ion-selective microelectrodes. In: *Schultze J.W., Datta M., Osaka T. (Ed.), Electrochemical Microsystem Technologies, Taylor & Francis*, pp. 526-540
- Dierkes P.W., Neumann S., Klees G., Schlue W.-R. (2003) Multi-barrelled ion-selective microelectrodes as tools for the investigation of volume regulation mechanisms in invertebrate nerve cells under hyperosmotic conditions. *Electrochim. Acta* **48**: 3373-3380
- Dörner R., Ballanyi K., Schlue W.-R. (1990) Glutaminergic responses of neuropile glial cells and Retzius neurones in the leech central nervous system. *Brain Res.* **523**: 111-116

- Drapeau P., Sanchez-Armass S. (1988) Selection of postsynaptic serotonin receptors during reinnervation of an identified leech neuron in culture. *J. Neurosci.* **8**: 4718-4727
- Dresser M.J., Leabman M.K., Giacomini K.M. (2001) Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.* **90**: 397-421
- Dryer S.E. (1994) Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: a new family of large-conductance ion channels. *Trends Neurosci.* **17**:155-160
- Dryer S.E. (2003) Molecular identification of the Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **37**: 727-730
- Dwyer T.M., Adams D.J., Hille B. (1980) The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J. Gen. Physiol.* **75**: 469-492
- Eisenman G. (1962) Cation-selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* **2**: 259-323
- Eveloff J.L., Warnock D.G. (1987) Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.* **252**: F1-F10
- Ferrer-Martinez A., Casado F.J., Felipe A., Pastor-Anglada M. (1996) Regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter in the renal epithelial cell line NBL 1 under osmotic stress. *Biochem. J.* **319**: 337-342
- Gerard E. (2003) Elektrophysiologische Eigenschaften und Modulation hyperpolarisations-aktivierter Kationenkanäle im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Gründemann D., Liebich G., Kiefer N., Köster S. Schömig E. (1999) Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol. Pharmacol.* **56**: 1-10

- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450
- Günzel D., Zimmermann F., Durry S., Schlue W.-R. (2001) Apparent intracellular  $\text{Mg}^{2+}$  buffering in neurons of the leech *Hirudo medicinalis*. *Biophys. J.* **80**: 1298-1310
- Hansson E., Ronnback L. (1992) Receptor-mediated volume regulation in astrocytes in primary culture. *Neuropharmacology* **31**: 85-87
- Häussinger D., Stoll B., von Dahl S., Theodoropoulos P.A., Markogiannakis E., Gravanis A., Lang F., Stournaras C. (1994) Effect of the hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels. *Biochem. Cell. Biol.* **72**: 12-19
- Häussinger D. (1996) The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J.* **313**: 697-710
- Headley M.P., Grillner S. (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 205-211
- Hebert S.C., Mount D.B., Gamba G. (2004) Molecular physiology of cation-coupled  $\text{Cl}^-$  cotransport: the SLC12 family. *Pflügers Arch.* **447**: 580-593
- Hernández J.A., Cristina E. (1998). Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells: the roles of the  $\text{Na}^+$  pump and of cotransport systems. *Am. J. Physiol.* **275**: C1067-C1080
- Hintz K. (1999) Elektrophysiologische Charakterisierung der  $\text{Mg}^{2+}$ -Regulation bei identifizierten Neuronen und Neuropil-Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hintz K., Günzel D., Schlue W.-R. (1999)  $\text{Na}^+$ -dependent regulation of free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration in neuropile glial cells and P neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *Pflügers Arch.* **437**: 354-362

- Hochstrate P., Schlue W.-R. (1994)  $\text{Ca}^{2+}$  influx into leech glial cells and neurones caused by pharmacologically distinct glutamate receptors. *Glia* **12**: 268-280
- Hochstrate P., Piel C., Schlue W.-R. (1995) Effect of extracellular  $\text{K}^+$  on the intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in leech glial cells and Retzius neurones. *Brain Res.* **696**: 231-241
- Hochstrate P., Schlue W.-R. (2001) The ouabain-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase in leech Retzius neurones is mediated by voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Brain Res.* **892**: 248-254
- Hoffmann E. K. (1986) Anion transport systems in the plasma membrane of vertebrate cells. *Biochim. Biophys. Acta* **864**: 1-3
- Hoffmann E.K. (2001) The pump and leak steady-state concept with a variety of regulated leak pathways. *J. Membr. Biol.* **184**: 321-330
- Humphrey P.P.A., Hartig P., Hoyer D. (1993) A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 233-236
- Idriss H.T., Hannun Y.A., Boulpaep E., Basavappa S. (2000) Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! *J. Physiol. (Lond.)* **524**: 629-636
- James V.A., Walker R.J. (1978) The ionic mechanism responsible for L-glutamate excitation of leech Retzius cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **64**: C261-265
- James V.A., Walker R.J., Wheal H.V. (1980a) Structure-activity studies on an excitatory receptor for glutamate on leech Retzius neurones. *Br. J. Pharmacol.* **68**: 711-717
- James V.A., Sharma R-P., Walker R.J., Wheal H.V. (1980b) Actions of glutamate, kainate, dihydrokainate and analogues on leech neurone acidic amino acid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **62**: 35-39

- Juhaszova M., Blaustein M. (1997) Na pump low and high ouabain affinity subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1800-1805
- Kekuda R., Prasad P.D., Wu X., Wang H., Fei Y., Leibach F.H., Ganapathy V. (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J. Biol. Chem.* **273**: 1571-1579
- Kilb W. (1994) Modulation der pH-Regulation durch Neurotransmitter bei identifizierten Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kilb W., Schlue W.R. (1999) Mechanism of the kainate-induced intracellular acidification in leech Retzius neurons. *Brain Res.* **824**: 168-182
- Kirk K. (1997) Swelling-activated organic osmolyte channels. *J. Membr. Biol.* **158**: 1-16
- Klees G. (2002) Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Volumenänderungen identifizierter Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Klees G., Neumann S., Dierkes P.W., Schlue W.-R. (2002) Volume changes of leech Retzius neurons *in situ* and after isolation from adjacent cells. *Pflügers Arch.* **443**: S 236
- Koepsell H., Gorboulev V., Arndt P. (1999) Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J. Membr. Biol.* **167**: 103-117
- Koepsell H., Schmitt B.M., Gorboulev V. (2003) Organic cation transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**: 36-90
- Kristan Jr., W.B., French A.K., Szczupak, L. (1993) Developmental regulation of segment-specific cholinergic receptors on Retzius neurons in the medicinal leech. *J. Neurosci.* **13**: 1577-1587

- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Völkl H., Waldegger S., Gulbins E., Häussinger D. (1998a) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**: 247-306
- Lang F., Busch G.L., Völkl H. (1998b) The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.* **8**: 1-45
- Lauf P.K., Adragna N.C. (2000) K-Cl cotransport: Properties and molecular mechanism. *Cell. Physiol. Biochem.* **10**: 341-354
- Lawrence C.L., Rodrigo G.C. (2001) The Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel contributes to K<sup>+</sup> efflux in Na<sup>+</sup>-loaded guinea-pig but not rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **442**: 595-602
- Lent C.M., Dickinson M.H. (1984) Serotonin integrates the feeding behavior of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A* **154**: 457-471
- Ling G., Gerard R.W. (1949) The normal membrane potential of frog sartorius fiber. *Cell. Comp. Physiol.* **34**: 383-396
- Löhrke S., Deitmer J.W. (1996) Kainate responses of leech Retzius neurons *in situ* and *in vitro*. *J. Neurobiol.* **31**: 345-358
- Lucht M. (1997) Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren und second-messenger-Kaskaden bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Nervensystems. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Lucke B., McCutcheon M. (1932) The living cell as an osmotic system and its permeability to water. *Physiol. Rev.* **12**: 68-139
- Macagno E.R. (1980) Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J. Comp. Neurol.* **190**: 283-302

- Macknight A.D.C. (1987) Volume maintenance in isosmotic conditions. *In: Current Topics in Membranes and Transport*, Vol. 30, Part I, pp. 3-38
- Mann K.H. (1962) Leeches (*Hirudinea*) - Their Structure, Physiology, Ecology and Embryology. *Pergamon Press, New York, Oxford, London, Paris*
- Mat Jais A.M., Kerkut G.A., Walker R.J. (1983) The ionic mechanism associated with the biphasic glutamate response on leech Retzius cells. *Comp. Biochem. Physiol. C* **77**: 115-126
- Mat Jais A.M., Kerkut G.A., Walker R.J. (1984) The ionic mechanism associated with the response of kainate, L-glutamate, quisqualate, ibotenate, AMPA and methyltetrahydrofolate on leech Retzius cells. *Comp. Biochem. Physiol. C* **74**: 425-432
- McManus M. L., Churchwell K. B. (1994) Clinical significance of cellular osmoregulation. In: Stange, K. (ed.) *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. *CRC Press London* pp. 63-77
- Muallem S., Zhang B.-X., Loessberg P. A., Star R.A. (1992) Simultaneous recording of cell volume changes and intracellular pH or  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in single osteosarcoma cells UMR-106-01. *J. Biol. Chem.* **267**: 17658-17664
- Muller K.J., Nicholls J.G., Stent G.S. (1981) *Neurobiology of the Leech*. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*
- Müller A. (2000) Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung der Wirkung glutamaterger Stimulation auf  $\text{Mg}^{2+}$ -Einstrom und  $\text{Mg}^{2+}$ -Regulation in Retzius-Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystem. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Müller A., Günzel D., Schlue W.R. (2003) Activation of AMPA/kainate Receptors but not acetylcholine receptors causes  $\text{Mg}^{2+}$ -influx into Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J. Gen. Physiol.*: **122**: 727-739

Munsch T., Schlue W.-R. (1993) Intracellular chloride activity and the effect of 5-hydroxytryptamine on the chloride conductance of leech Retzius neurons. *Eur. J. Neurosci.* **5**: 1551-1557

Munsch T., Reusch M., Deitmer J.W. (1995) Intracellular chloride activity of leech neurones and glial cells in physiological, low chloride saline. *J. Comp. Physiol. A* **176**: 273-280

Nakanishi S., Nakajima Y., Masu M., Ueda Y., Nakahara K., Watanabe D., Yamaguchi S., Kawabata S., Okada, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Rev.* **26**: 230-235

Neher E., Lux H.D. (1973) Rapid changes of potassium concentration at the outer surface of exposed single neurons during membrane current flow. *J. Gen. Physiol.* **61**: 385-399

Neumann S. (2000) Potentiometrische Messungen zur Volumenregulation im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Neumann S., Dierkes P.W., Schlue W.-R. (2001) Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations in leech Retzius neurones. *Electrochim. Acta* **47**: 309-317

Neumann S. (2003) Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Neurotransmitter- und K<sup>+</sup>-induzierten Volumenänderungen bei Retzius- und P-Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Nicolson G.L., Singer S.J. (1972) Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **195**: 368-75

Nilius B., Eggermont J., Voets T., Droogmans G. (1996) Volume-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Gen. Pharmacol.* **27**: 1131-1140

- Ohno K., Okada M., Tsutsumi R., Kohara A., Yamaguchi, T. (1997) Kainate excitotoxicity is mediated by AMPA- but not kainate-preferring receptors in embryonic rat hippocampal cultures. *Neurochem. Int.* **31**: 715-722
- O'Neill W.C. (1999) Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am. J. Physiol.* **276**: C995-C1011
- Okuda M., Urakami Y., Saito H., Inui K. (1999) Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1417**: 224-231
- Okuda T., Haga T., Kanai Y., Endou H., Ishihara T., Katsura I. (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci.* **3**: 120-125
- Orlowski J., Grinstein S. (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Arch.* **447**: 549-565
- Owen C.S. (1991) Spectra of intracellular Fura-2. *Cell Calcium* **12**: 385-393
- Papke R.L., Bencherif M., Lippiello P. (1996) An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci. Lett.* **213**: 201-204
- Pasantes-Morales H., Franco R., Torres-Marquez M.E., Hernández-Fonseca K., Ortega A. (2000) Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.* **10**: 361-370
- Pellegrino M., Simonneau M. (1984) Distribution of receptors for acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on identified leech neurones growing in culture. *J. Physiol. (Lond.)* **352**: 669-684
- Pellegrino M., Pellegrini M., Simoni A., Gargini C. (1990) Stretch-activated cation channels with large unitary conductance in leech central neurons. *Brain Res.* **525**: 322-326

- Perry P.B., O'Neill W.C. (1993) Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am. J. Physiol.* **265**: C763-C769
- Penniston J.T., Enysdi A. (1998) Modulation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. *J. Membr. Biol.* **165**: 101-109
- Pershad Singh H.A., McDonald J.M. (1980) A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent adenosine triphosphase in rat adipocyte plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **255**: 4087-4093
- Pierce P.A., Xie G.X., Levine J.D., Peroutka S.J. (1996) 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* **70**: 553-559
- Reuss L. (1985) Changes in cell volume measured with an electrophysiologic technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6014-6018
- Riehl B., Schlue W.-R. (1990) Localization of carbonic anhydrase in identified glial cells of the leech central nervous system: application of histochemical and immunocytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* **38**: 1173-1178
- Roberts C.J., Nielsen E., Krogsgaard-Larsen P., Walker R.J. (1982) The actions of ibotenate, homoibotenate analogues and AMPA on central neurons of *Hirudo*, *Limulus* and *Helix*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **73**: 439-444
- Rossum G.D.V., Boyd C.A.R. (1998) Sodium-dependent and -independent choline uptake by type II epithelia cells from rat lung. *J. Membr. Biol.* **162**: 147-156
- Russel J.M. (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.* **80**: 211-276
- Sarkadi B., Parker J.C. (1991) Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 407-427

- Scheiner-Bobis G., Schoner W. (2001) A fresh facet for ouabain action. *Nat. Med.* **12**: 1288-1289
- Scheller D., Tegtmeyer F., Schlue W.-R. (1998) Dose-dependent effects of tetramethylammonium on circling spreading depressions in chicken retina. *J. Neurosci. Res.* **51**: 85-89
- Schloss P., Williams D.C. (1998) The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *J. Psychopharmacol.* **12**: 115-121
- Schlue W.-R., Deitmer J.W. (1980) Extracellular potassium in neuropile and nerve cell body region of the leech central nervous system. *J. Exp. Biol.* **87**: 23-43
- Schlue W.-R. (1987) Methodik und Anwendungsmöglichkeit ionen-selektiver Mikroelektroden. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **80**: 129-139
- Schlue W.-R., Deitmer J.W. (1984) Potassium distribution and membrane potential of sensory neurons in the leech nervous system. *J. Neurophysiol.* **51**: 689-704
- Schlue W.-R., Walz W. (1984) Electrophysiology of neuropil glial cells in the central nervous system of the leech: a model system for potassium homeostasis in the brain. *Cell. Neurobiol.* **5**: 143-175
- Schlue W.-R. (1991) Effects of ouabain on intracellular ion activities of sensory neurons of the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.* **65**: 736-746
- Schlue W.-R., Kilb W., Günzel D. (1997) Ultramicroelectrodes for membrane research. *Electrochim. Acta* **42**: 3197-3205
- Schmidt J., Calabrese R.L. (1992) Evidence that acetylcholine is an inhibitory transmitter of heart interneurons in the leech. *J. Exp. Biol.* **171**: 329-347

- Shi H., Wang H., Wang, Z. (1999) Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. *Mol. Pharmacol.* **55**: 497-507
- Singer S.J., Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- Strange K. (1993) Maintenance of cell volume in the central nervous system. *Pediatr. Nephrol.* **7**: 689-697
- Strehler E.E., Treiman M. (2004) Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr. Mol. Med.* **4**: 323-335
- Szczupak L., Jordan S., Kristan W.B. Jr. (1993) Segment-specific modulation of the electrophysiological activity of leech Retzius neurons by acetylcholine. *J. Exp. Biol.* **183**: 115-135
- Szczupak L., Edgar J., Peralta M.L., Kristan W.B. Jr. (1998) Long-lasting depolarization of leech neurons mediated by receptors with a nicotinic binding site. *J. Exp. Biol.* **201**: 1895-1906
- Teitler M., Herrick-Davies K. (1994) Multiple serotonin receptor subtypes: molecular cloning and functional expression. *Crit. Rev. Neurobiol.* **8**: 175-188
- Theodoropoulos P.A., Stournaras C., Stoll B., Markogiannakis E., Lang F., Gravanis A., Häussinger D. (1992) Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-/total actin ratio and increases actin mRNA levels. *FEBS Lett.* **311**: 241-245
- Thorogood M.S.E., Brodfuehrer P.D. (1995) The role of glutamate in swim initiation in the medicinal leech. *Invert. Neurosci.* **1**: 223-233
- Tsien R.Y. (1989) Fluorescent probes of cell signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**: 227-253

- Villalobos A.R., Braun E.J. (1998) Substrate specificity of organic cation/H<sup>+</sup> exchanger in avian renal brush-border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**: 944-951
- Villalobos A.R., Parmelee J.T., Renfo J.L. (1999) Choline uptake across the ventricular membrane of neonate rat choroids plexus. *Am. J. Physiol.* **276**: C1288-C1296
- Wagner C.A., Lükewille U., Kaltenbach S., Moschen I., Bröer A., Risler T., Bröer S., Lang F. (2000) Functional and pharmacological characterization of human Na<sup>+</sup>-carnitine cotransporter hOCTN2. *Am. J. Physiol.* **279**: F584-F591
- Walker J.L. Jr. (1971) Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes. *Anal. Chem.* **A 43**: 89-93
- Wallace B.G., Gillon J.W. (1982) Characterization of acetylcholinesterase in individual neurons in the leech central nervous system. *J. Neurosci.* **2**: 1108-1118
- Wehner F., Tinel H. (1998) Role of Na<sup>+</sup> conductance, Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange, and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> symport in the regulatory volume increase of rat hepatocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **506**: 127-142
- Wüsten H.J. (2000) Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen von Volumenänderungen bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Wüsten H.J., Dierkes P.W., Schlue W.-R. (2000) Measurement of cell volume changes in leech neurons with microfluorimetric and morphometric methods. *Pflügers Arch.* **439**: R 442
- Wüsten H.J. (2004) Zellvolumen-Regulation und Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen in Retzius- und P-Neuronen des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Yabuuchi H., Tamai I., Nezu J., Sakamoto K., Oku A., Stimane M., Sai Y. Tsuji A. (1999) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**: 768-773

Yuan A., Santi C.M., Wei A., Wang Z., Pollak K., Nonet M., Kaczmarek L., Crowder C.M., Salkoff L. (2003) The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* **37**: 765-773

Zorumski C.F., Thio L.L. (1992) Properties of vertebrate glutamate receptors: calcium mobilization and desensitization. *Prog. Neurobiol.* **39**: 295-336

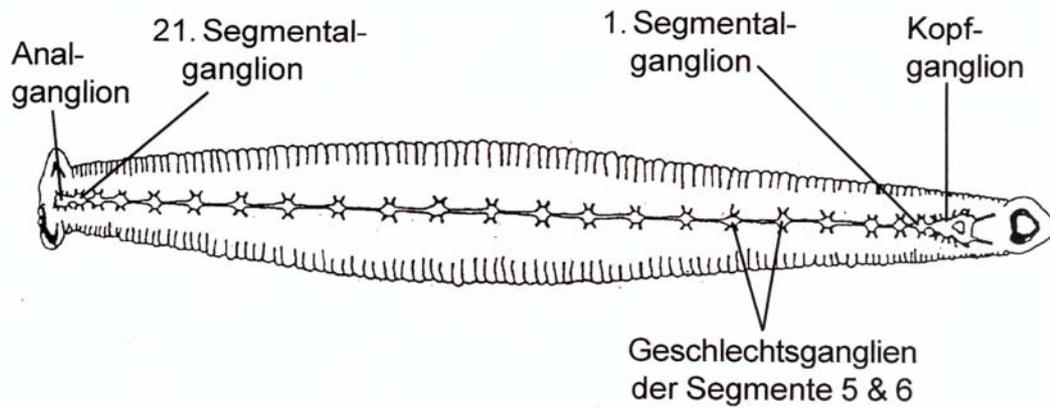
## 8. Abbildungen

A

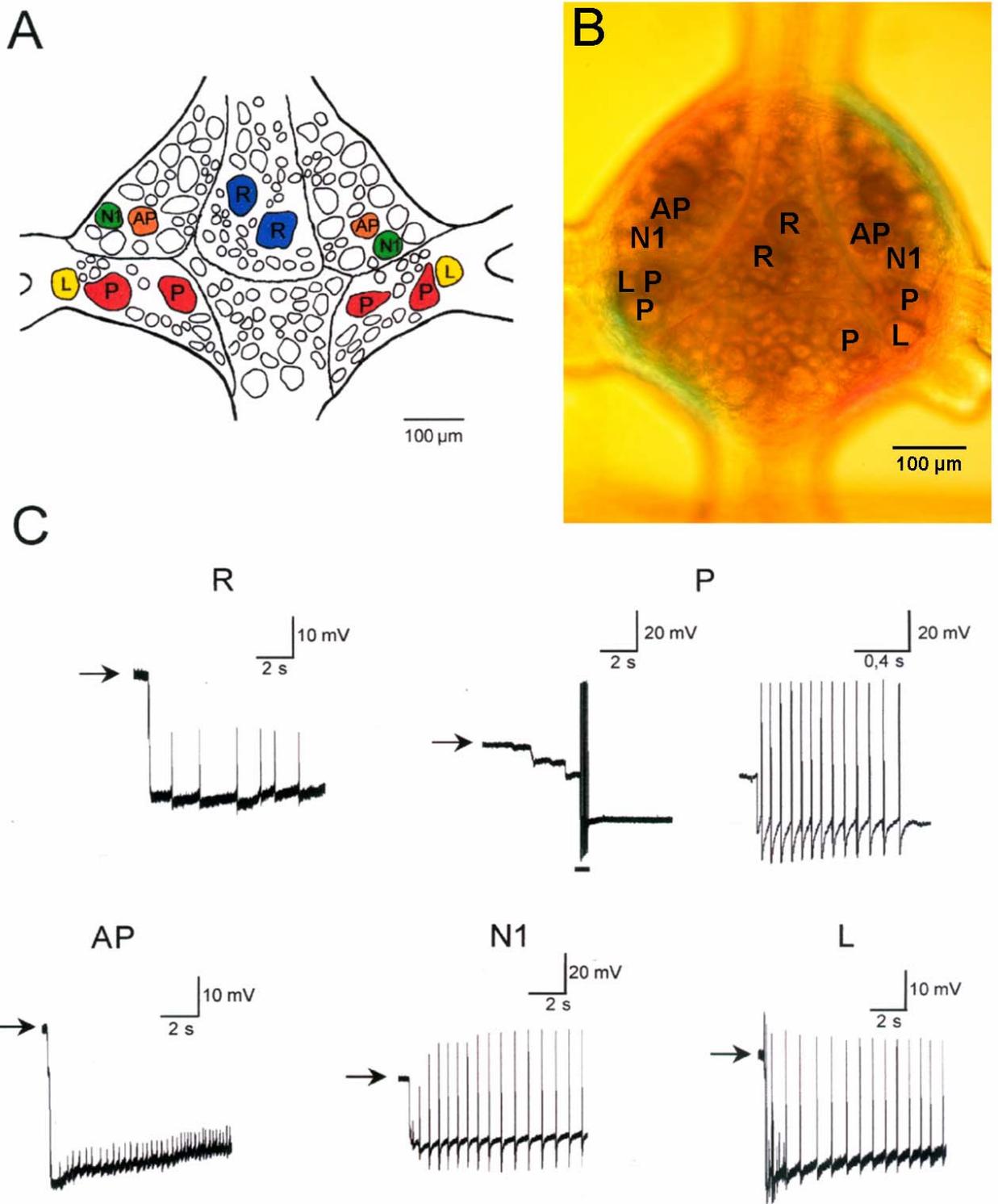


1 cm

B



**Abb. 1:** Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*  
A) Fotografische Aufnahme des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*.  
B) Schematische Darstellung des Blutegelkörpers mit dem ventral liegenden Zentralnervensystem (Riehl & Schlue 1990).

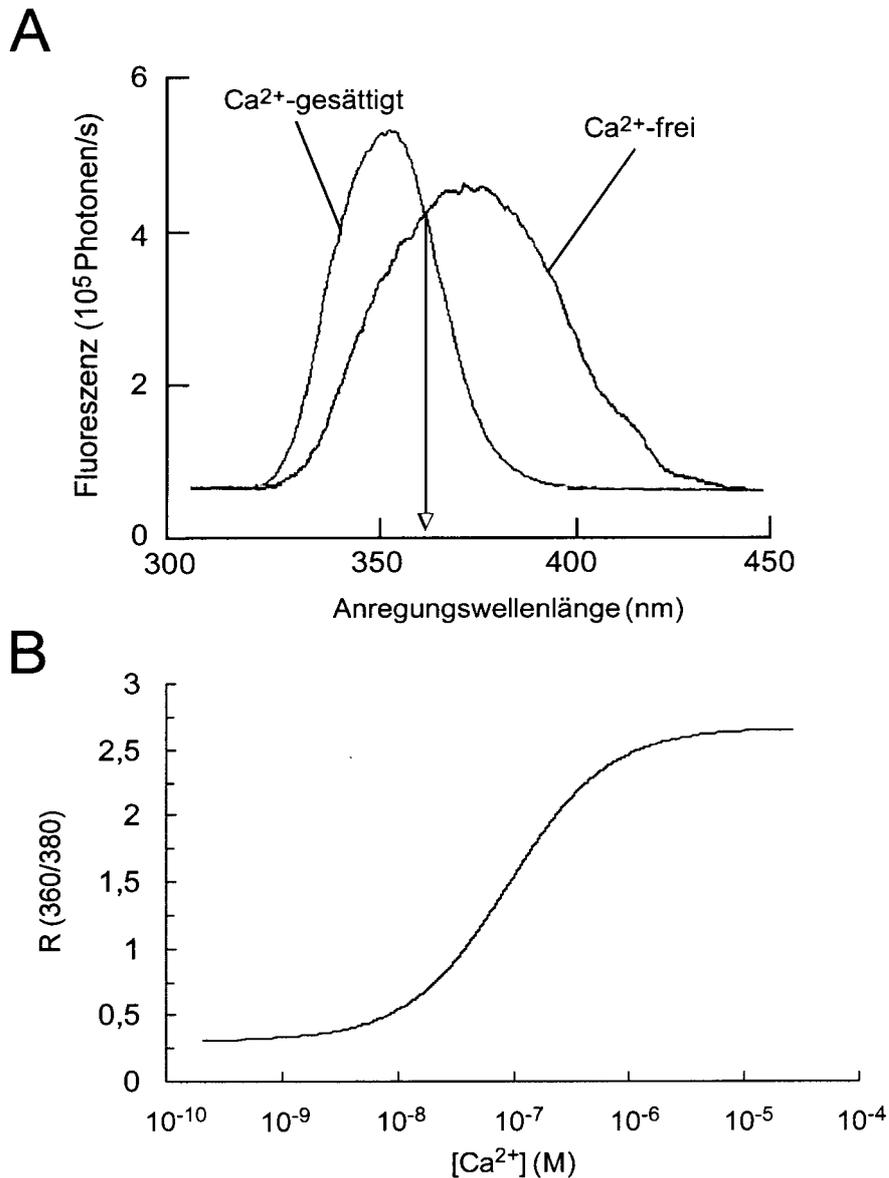


**Abb. 2:** Identifizierung der untersuchten Blutegel-Neuronen: Lage der Zellkörper im Segmentalganglion und elektrophysiologische Charakteristika

A) Schematische Darstellung der Ventralansicht eines Segmentalganglions (nach Muller et al. 1981). Die untersuchten Neuronen wurden farblich hervorgehoben und mit ihren üblichen Abkürzungen gekennzeichnet (R, Retzius; L, Leydig).

B) Fotografische Aufnahme der Ventralansicht eines Segmentalganglions im Durchlicht (Abkürzungen siehe A).

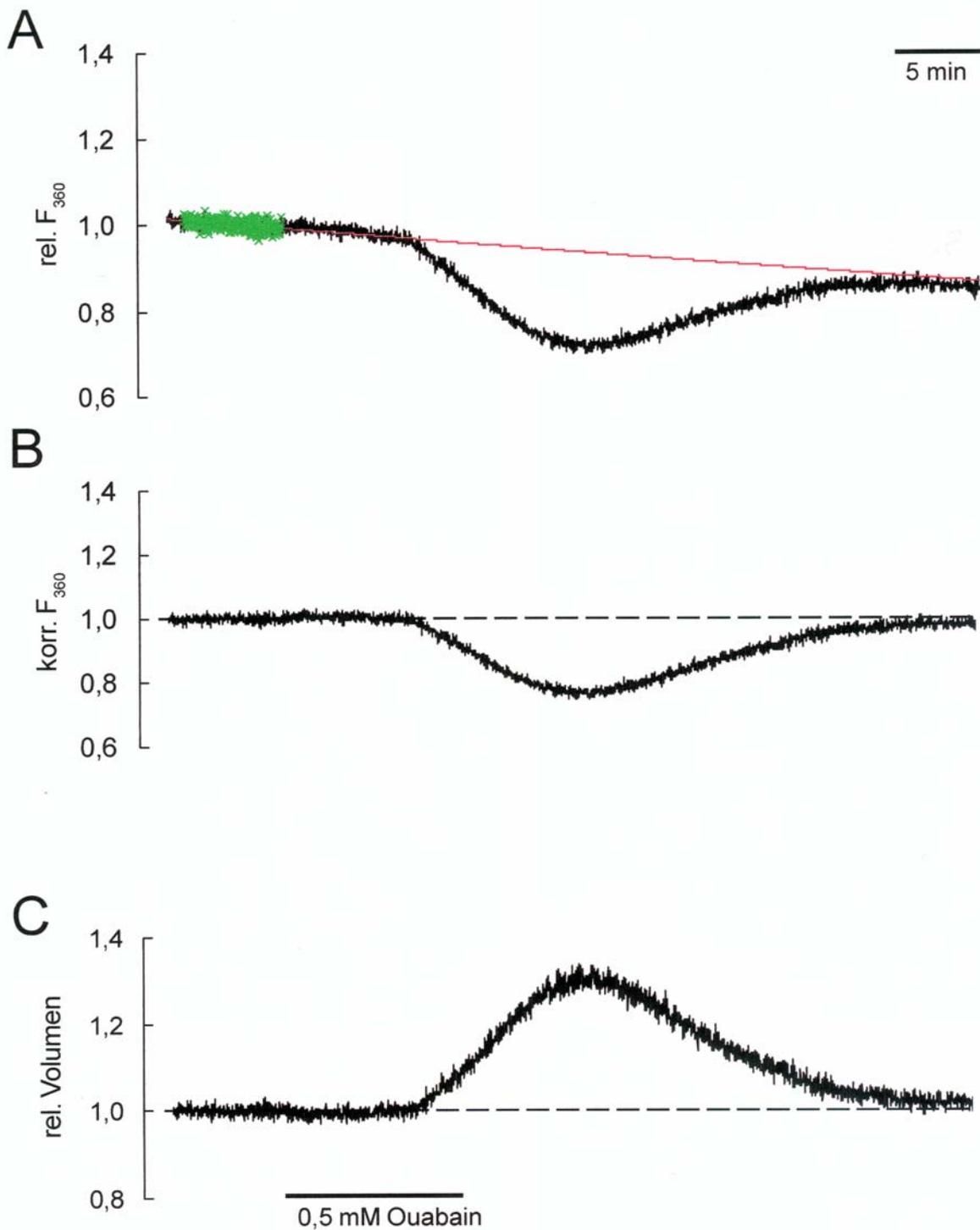
C) Typische Aktionspotentiale der untersuchten Neuronen nach dem Einstich einer Glasmikroelektrode. Pfeile markieren das Elektrodenpotential vor dem Elektrodeneinstich. Der Bereich starker Aktionspotential-Aktivität bei P-Neuronen (Balken) wurde ergänzend in gedehnter Zeitskala dargestellt. Die variable Aktionspotential-Amplitude bei dem N1-Neuron ist aufzeichnungstechnisch bedingt.



**Abb. 3:** Eichung von Fura-2

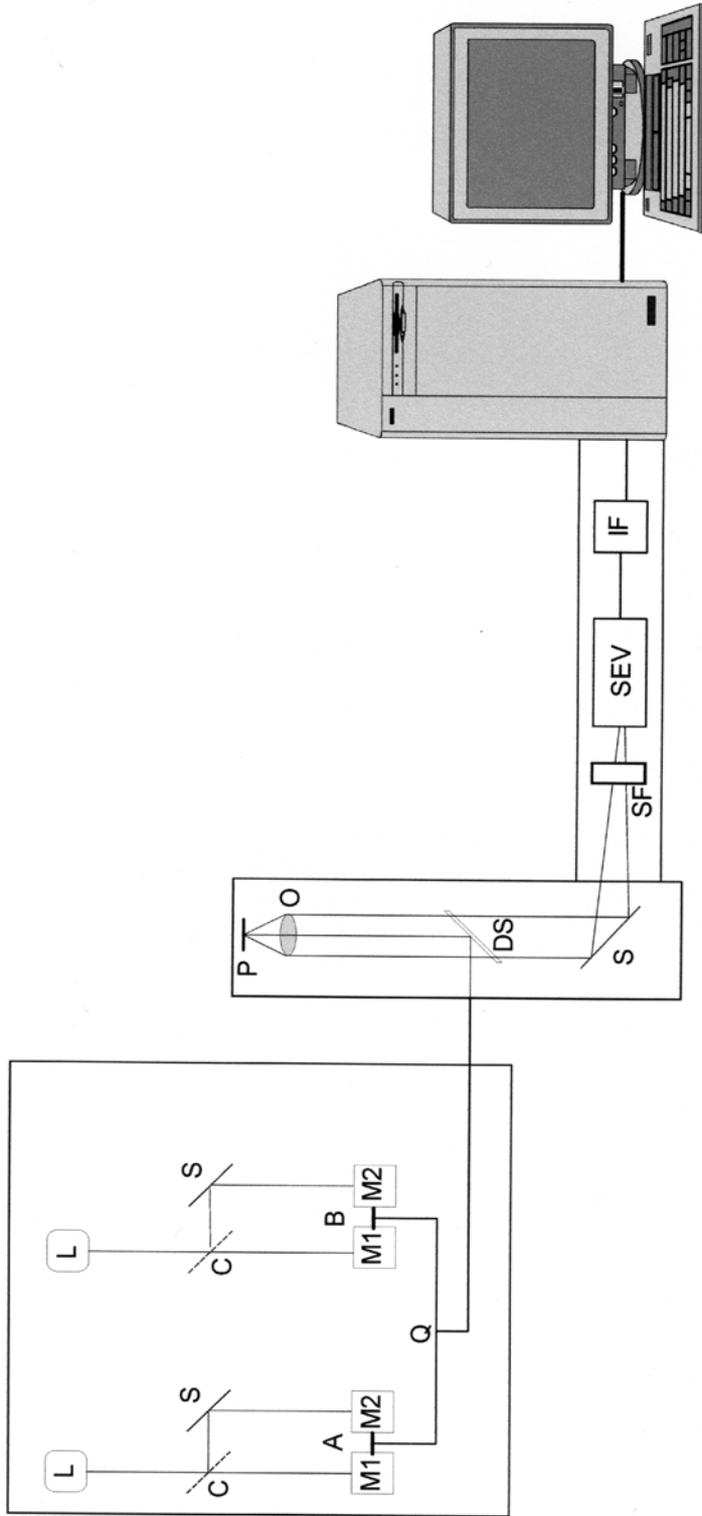
A) Anregungsspektren der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Form von Fura-2. Die Fluoreszenzintensität wurde zwischen 510 und 540 nm gemessen. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an den Farbstoff führte zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums zu kürzeren Wellenlängen. Am Isofluorpunkt bei 360 nm (Pfeil) ist die Fluoreszenzemission abhängig von der Farbstoffkonzentration, jedoch unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung. Die wiedergegebenen Anregungsspektren entsprechen nicht den exakten Spektren, da die Intensität des Anregungslichts im kurzwelligen UV-Bereich zunehmend geringer wurde (vergl. Grynkiewicz *et al.* 1985).

B) Die Eichkurve nach der Ratio-Methode gibt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 360 nm zu der mit 380 nm ( $R(360/380)$ ) in Abhängigkeit von der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder. Für diese Eichung wurden *in vitro* ermittelte Werte für  $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$  und  $S_{\text{D}}/S_{\text{b2}}$  eingesetzt und ein  $K_{\text{d}}$  von 135 nM aus der Literatur übernommen (Grynkiewicz *et al.* 1985).



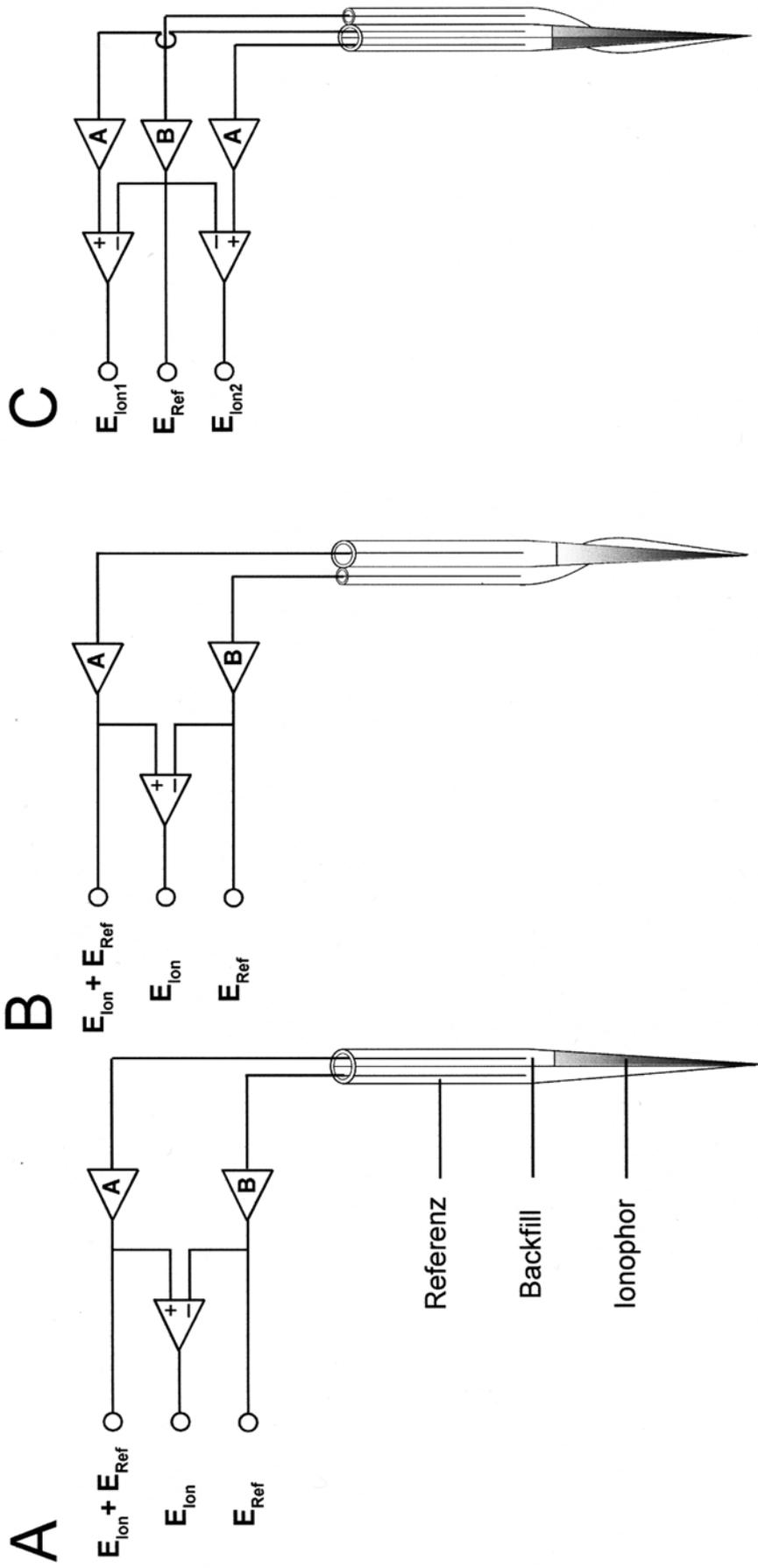
**Abb. 4:** Mikrofluorimetrische Messung des Zellvolumens mit Fura-2 als Volumenmarker bei einem P-Neuron

Die Fura-2-Fluoreszenz ( $F_{360}$ ) wurde mit Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt und innerhalb eines kleinen Messareals bestimmt, welches ca. 10 % des Zellquerschnitts einnahm. Die Applikation von 0,5 mM Ouabain führte zu einem reversiblen Abfall von  $F_{360}$  (A). Während des Experiments erfolgte ein stetiger Fluoreszenzabfall bedingt durch Farbstoffverlust, der durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden konnte (rote Linie, zugrundeliegenden Datenpunkte grün). Dies ermöglichte es, das  $F_{360}$ -Signal bezüglich des Farbstoffverlustes zu korrigieren (B). Das relative Zellvolumen entspricht dem reziproken Wert des korrigierten  $F_{360}$ -Signals (C).

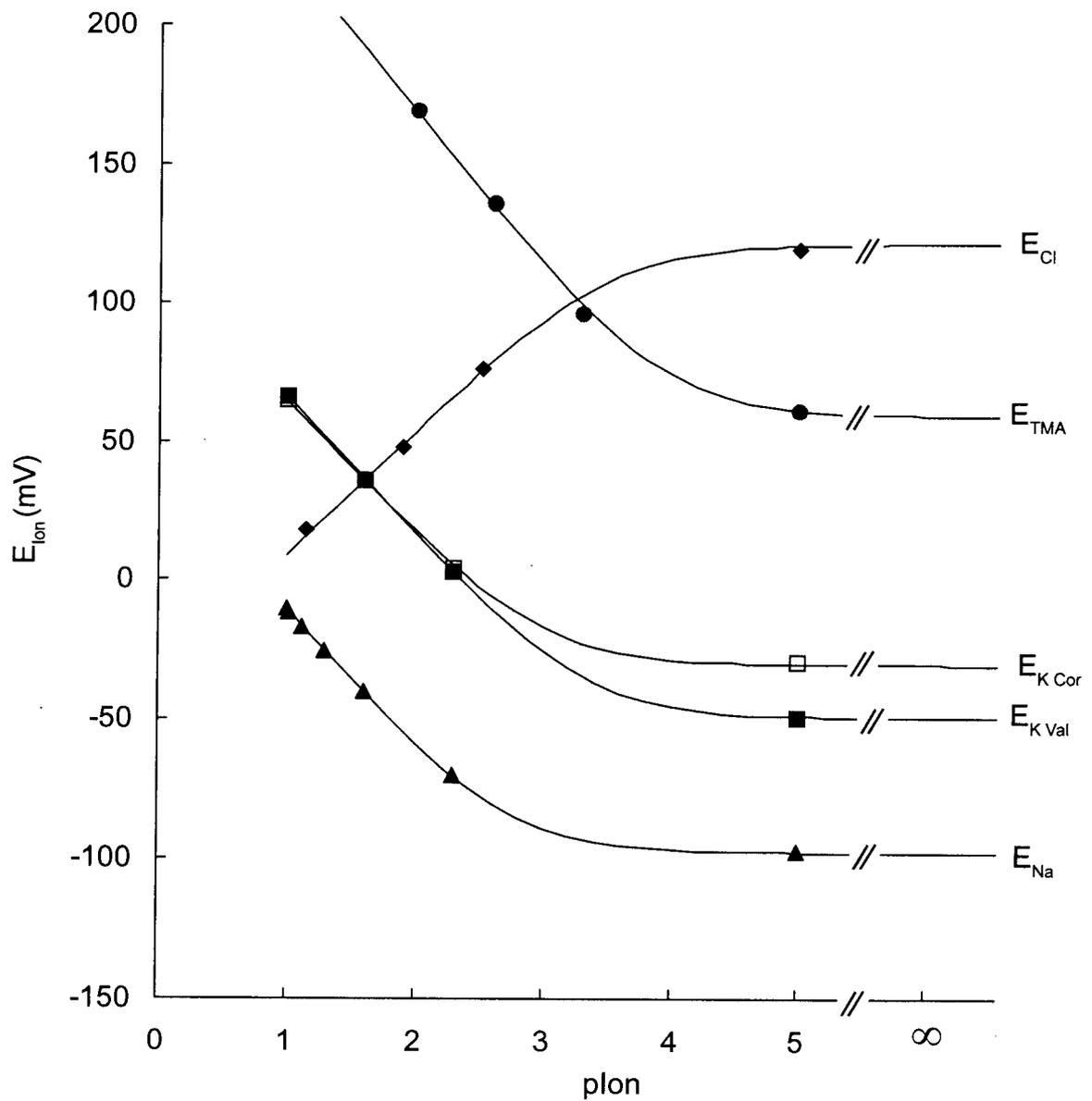


**Abb. 5:** Schematische Darstellung des Mikrofluorimeters

Das Licht der beiden Xenonlampen (L) wurde mittels zweier Chopper (C) alternierend über die beiden Spiegel (S) den jeweiligen Monochromatoren (M1, M2) zugeführt. Das die Monochromatoren verlassende Anregungslicht gelangte über einen Quarzlichtleiter (Q) in ein Umkehrmikroskop, wo es über einen dichroitischen Spiegel (DS) und das Objektiv (O) zum Präparat (P) geleitet wurde. Das vom Präparat emittierte Fluoreszenzlicht wurde vom Objektiv aufgefangen, über den DS und ein Sperrfilter (SF, 510-540 nm) zum Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) geleitet. Das SEV-Signal wurde über ein Interface (IF) mit einem Personal-Computer aufgezeichnet.

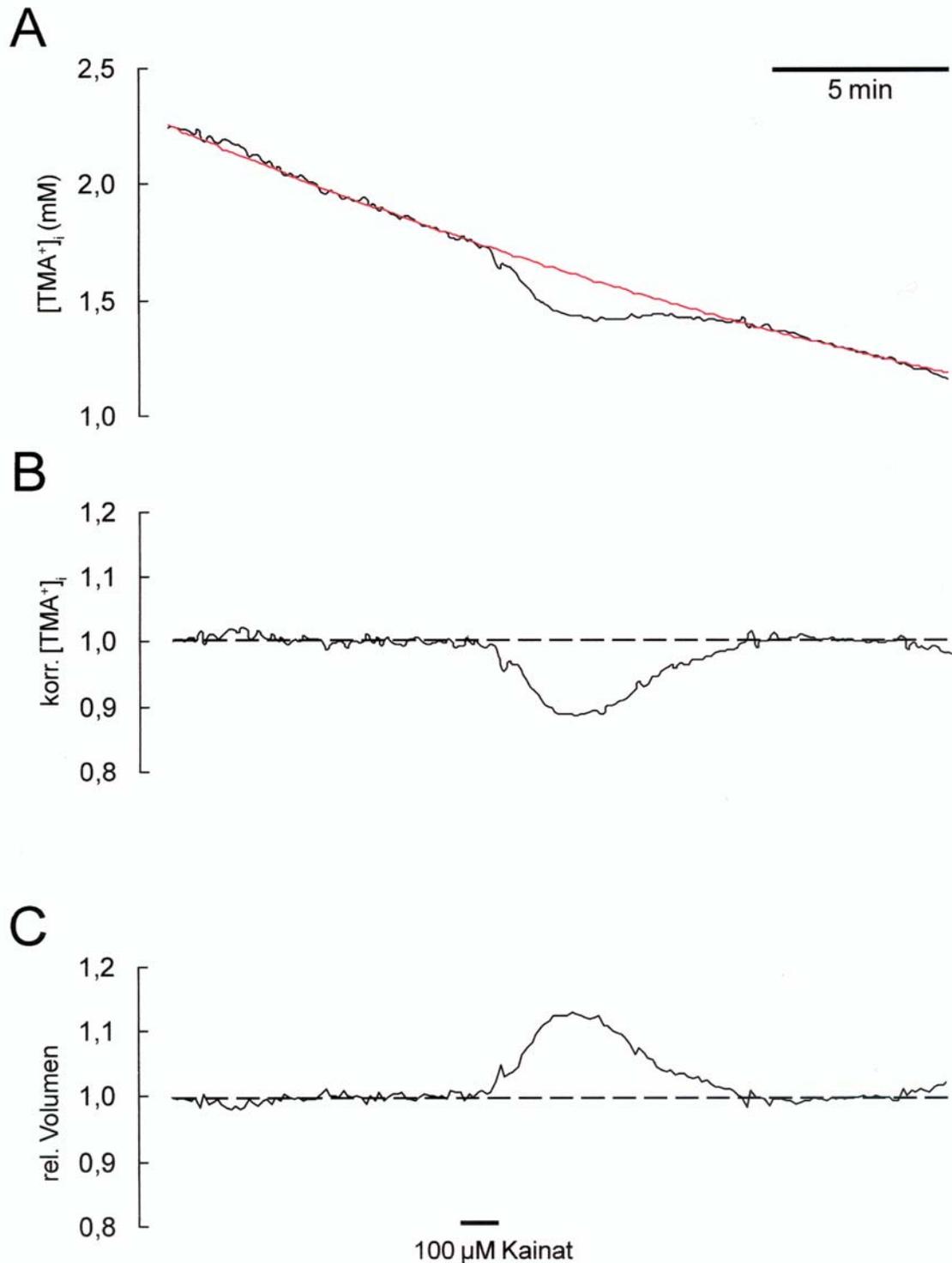


**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Verschaltung der verwendeten ionensensitiven Glasmikroelektroden. Dargestellt sind ionensensitive Zweikanal-Glasmikroelektroden des Theta-Typs (A) und des gedrehten Typs (B) sowie eine ionensensitive Dreikanal-Glasmikroelektrode des gedrehten Typs (C).

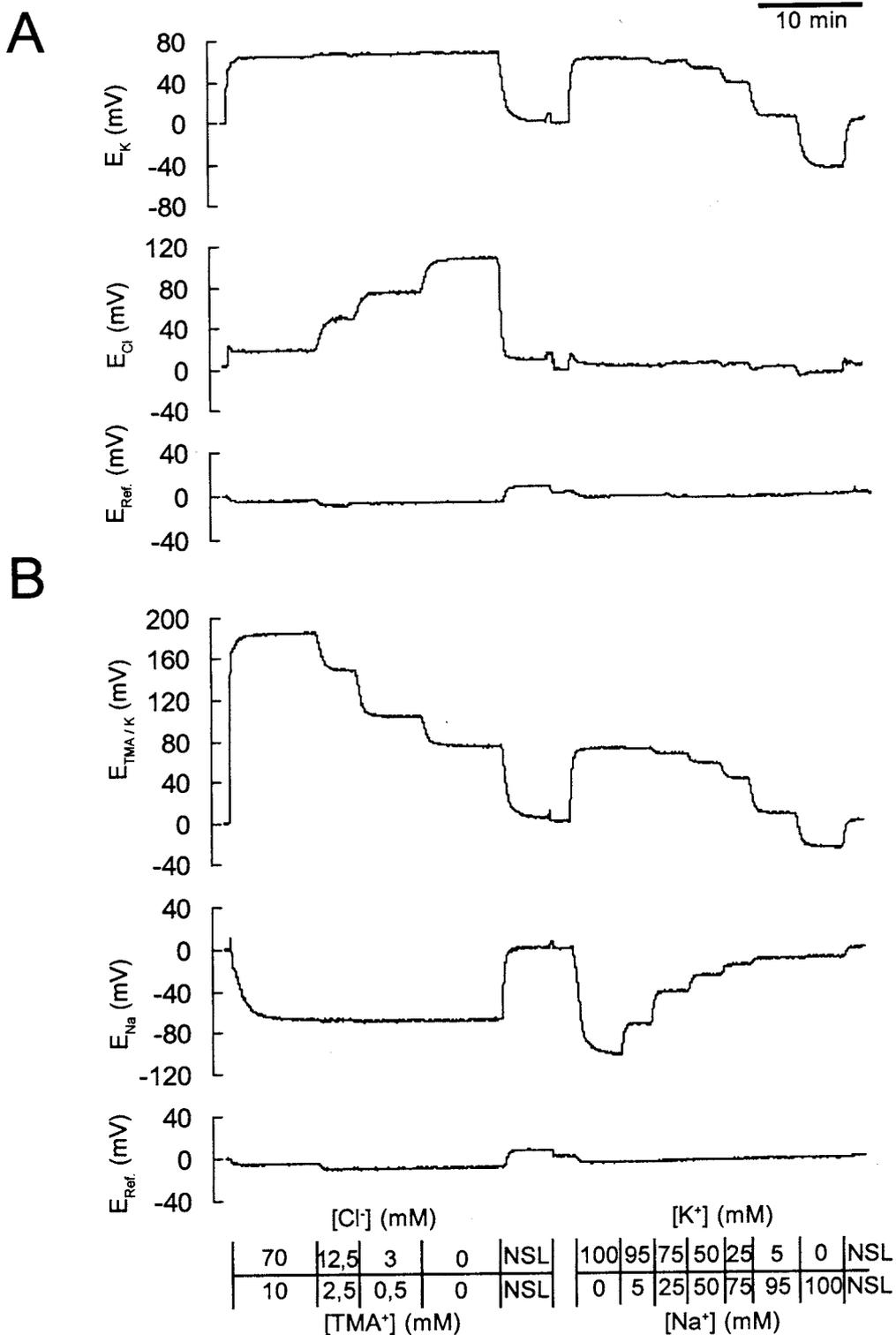


**Abb. 7:** Eichkurven verschiedener ionensensitiver Glasmikroelektroden

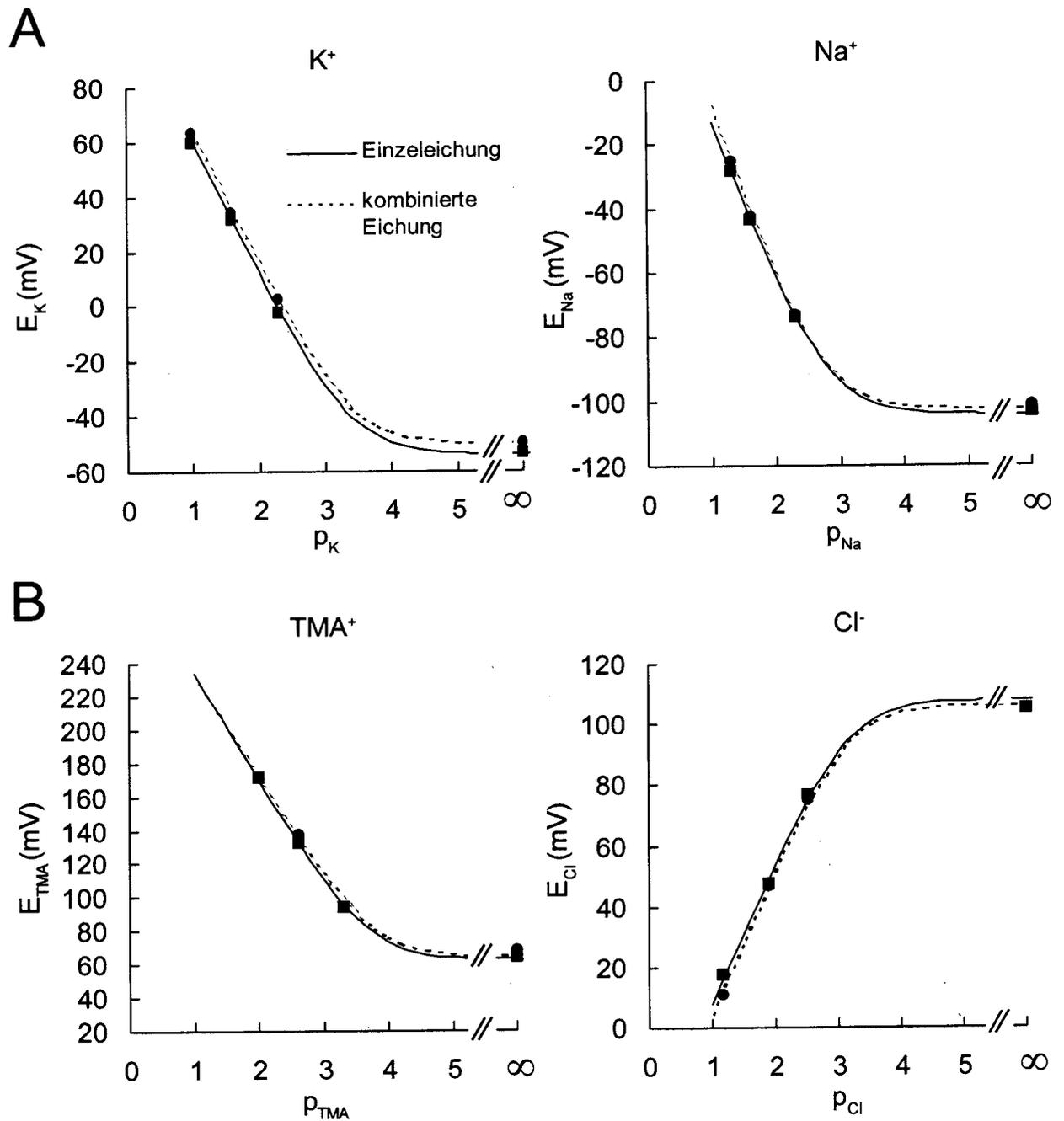
Die in den verschiedenen Eichlösungen gemessenen Ionenpotentiale ( $E_{\text{ion}}$ ) wurden gegen den negativen dekadischen Logarithmus der jeweiligen Ionenkonzentration ( $p_{\text{ion}}$ ) aufgetragen. Aus den Messpunkten (Mittelwerte aus  $n = 12-151$  Einzelwerten) wurde mittels der Nicolsky-Eisenman-Gleichung die jeweilige Eichkurve berechnet. Es wurden zwei verschiedene  $\text{K}^+$ -Sensoren verwendet, zum einen Corning 477317 (Cor) und zum anderen Valinomycin (Val).



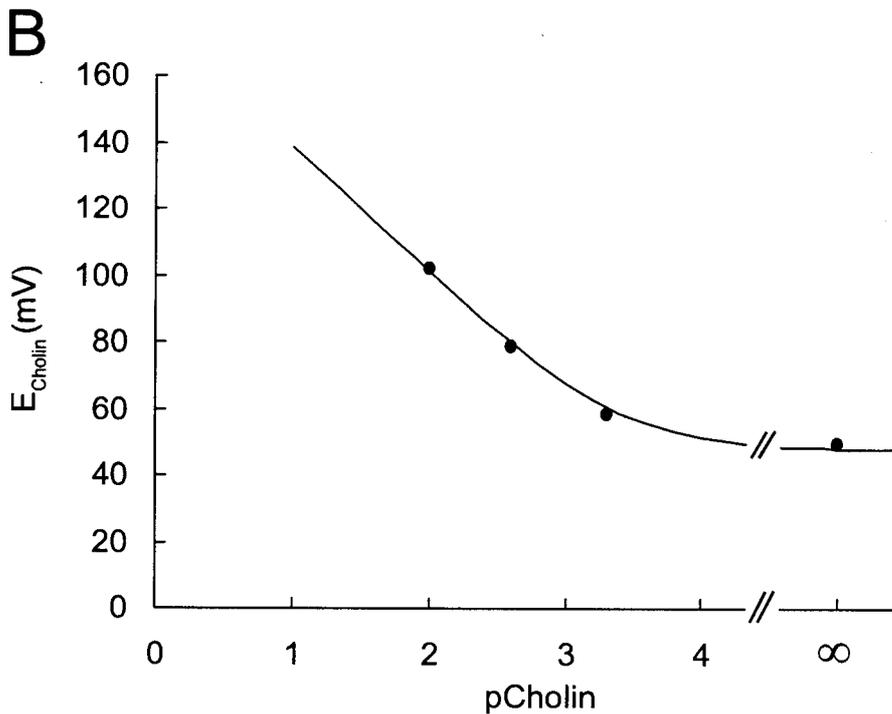
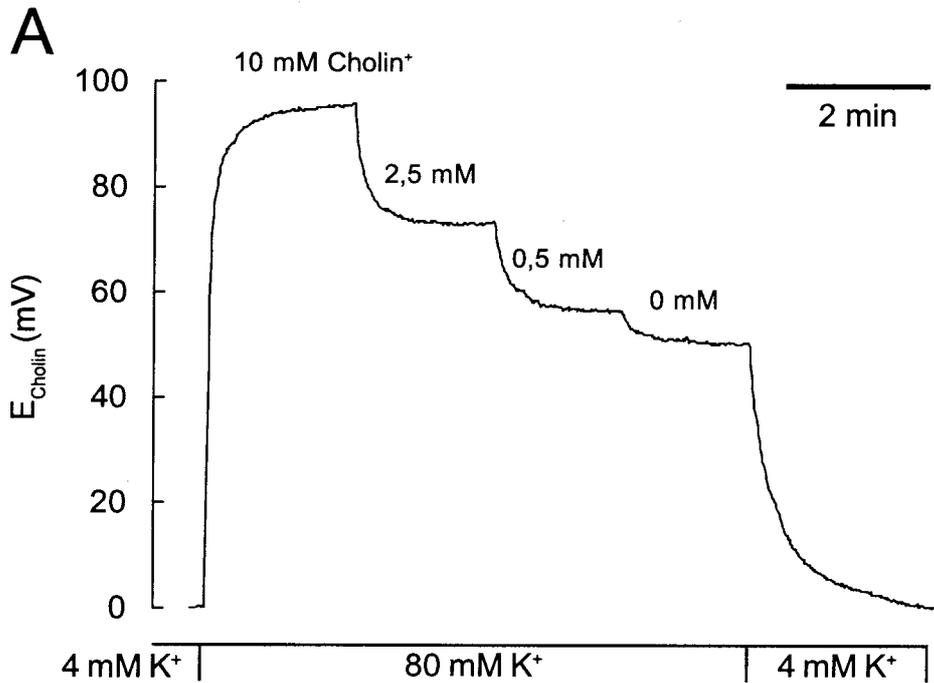
**Abb. 8:** Messung des Zellvolumens mit ionensensitiven Glasmikroelektroden mit  $TMA^+$  als Volumenmarker bei einem Leydig-Neuron  
 Die Applikation von 100  $\mu$ M Kainat führte zu einer reversiblen Abnahme der intrazellulären  $TMA^+$ -Konzentration ( $[TMA^+]_i$ ; A). Während der gesamten Messdauer war ein stetiger  $TMA^+$ -Verlust zu beobachten, der mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden konnte (rote Linie). Dies ermöglichte es, das  $[TMA^+]_i$ -Signal bzgl. des  $TMA^+$ -Verlusts zu korrigieren (B). Das relative Zellvolumen entspricht dem reziproken Wert der korrigierten  $[TMA^+]_i$  (C).



**Abb. 9:** Registrierbeispiele von simultanen Eichungen einer K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-sensitiven Dreikanal-Glasmikroelektrode (A) und einer Na<sup>+</sup>- und TMA<sup>+</sup>-sensitiven Dreikanal-Glasmikroelektrode (B). Die Ionenpotentiale ( $E_K$ ,  $E_{Cl}$  bzw.  $E_{TMA^+}$ ,  $E_{Na^+}$ ) sowie das Referenzpotential ( $E_{Ref}$ ) wurden simultan registriert. Es wurden kombinierte Eichlösungen verwendet, so dass die Eichungen für K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> bzw. für Cl<sup>-</sup> und TMA<sup>+</sup> gleichzeitig durchgeführt werden konnten (Einzelheiten siehe 2.4.6).



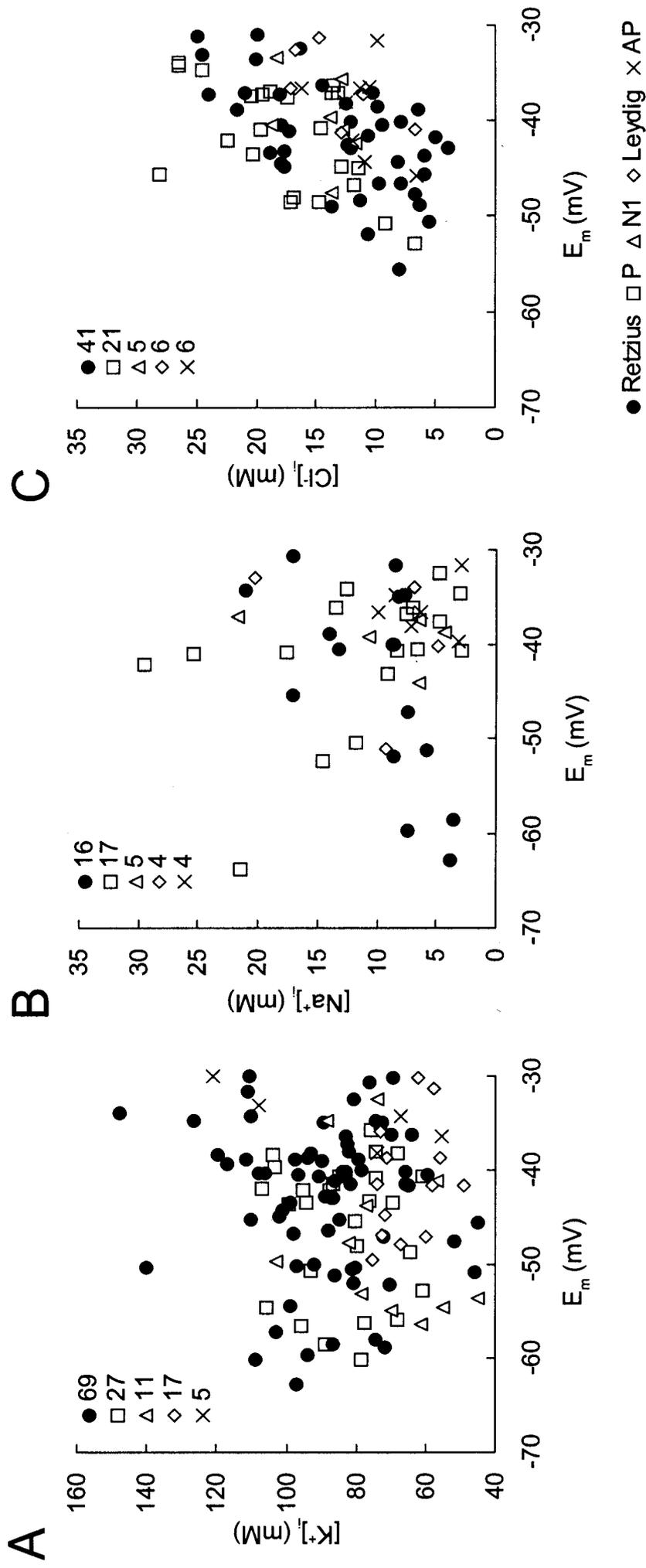
**Abb. 10:** Vergleich der mit konventionellen und kombinierten Eichlösungen erhaltenen Eichkurven. Die Eichungen mit den beiden Typen von Eichlösungen wurden bei derselben ionensensitiven Glas-mikroelektrode unmittelbar hintereinander durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Nernstschen Steigung und im Detektionslimit (siehe 2.4.6).



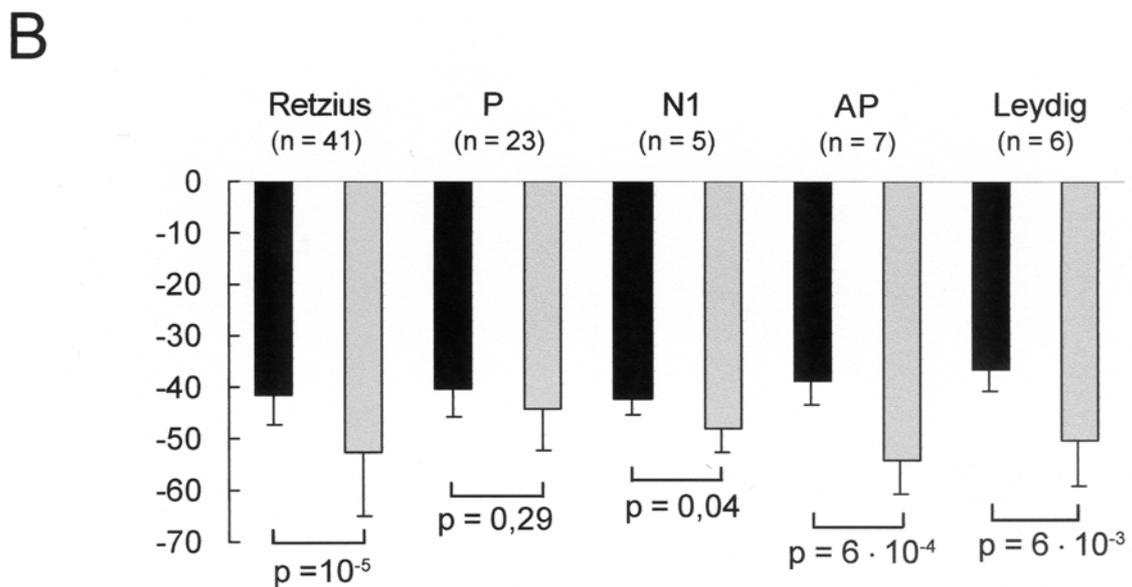
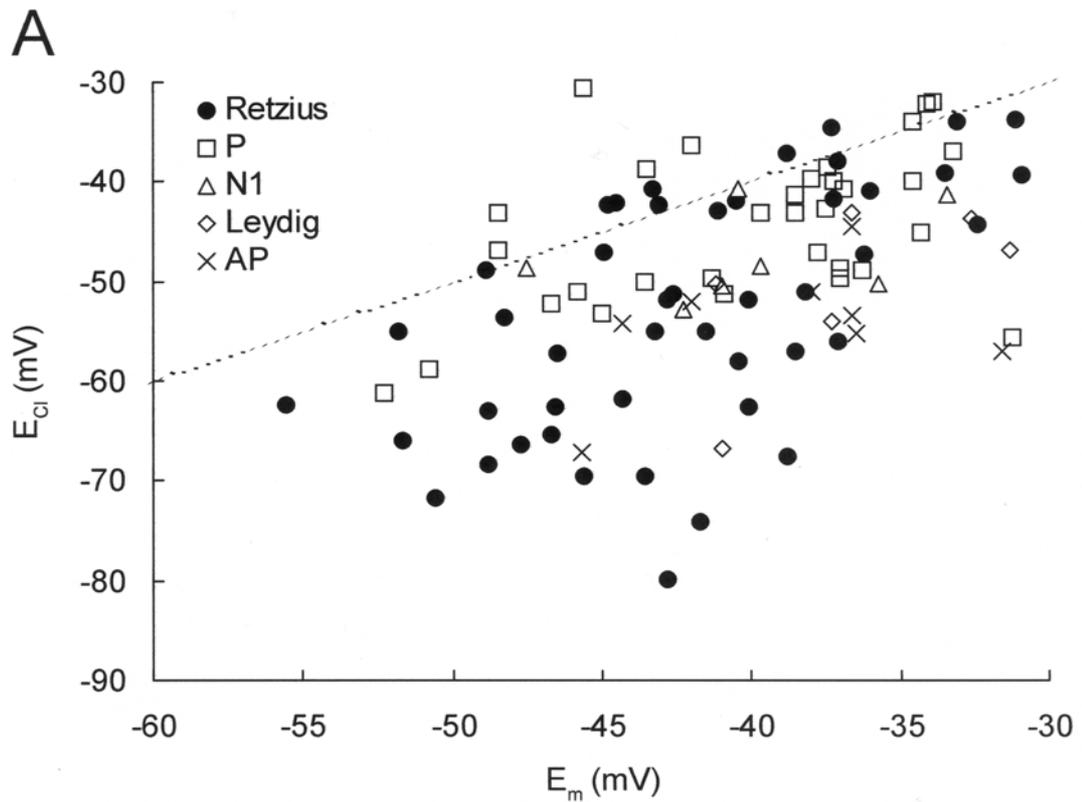
**Abb. 11:** Cholinsensitivität von Corning 477317

A) Registrierbeispiel der Eichung einer mit Corning 477317 gefüllten Zweikanal-Glasmikroelektrode. Wiedergegeben ist das Ionenpotential der Elektrode in Eichlösungen mit verschiedenen Cholin-Konzentrationen. Die Eichlösungen enthielten außerdem 80 mM K<sup>+</sup>, um die intrazellulären Verhältnisse zu imitieren.

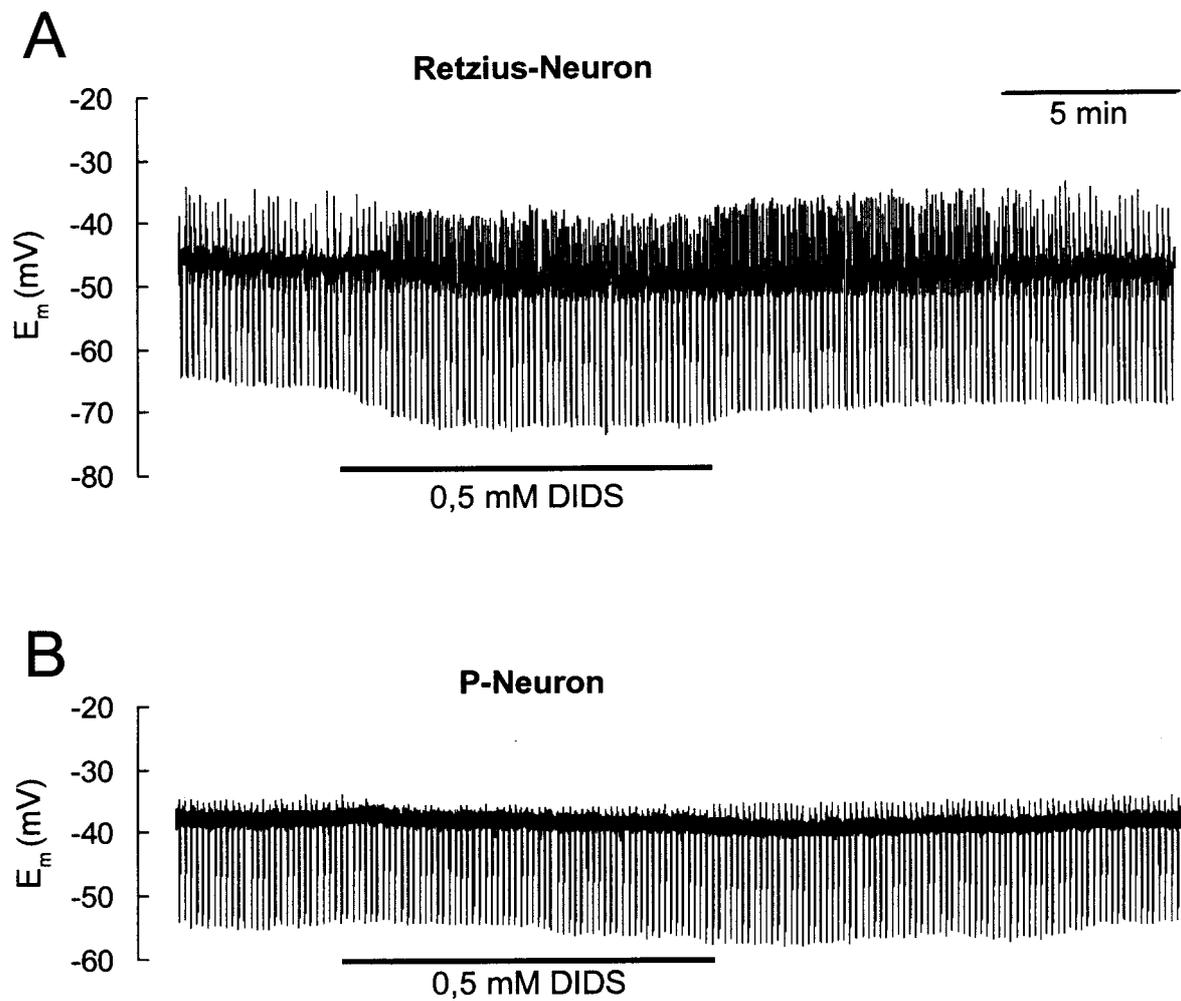
B) Abhängigkeit des Ionenpotentials vom negativen dekadischen Logarithmus der Cholin-Konzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung der Daten mit der Hilfe Nikolsky-Eisenman-Gleichung dar.



**Abb. 12:** Zusammenhang zwischen  $[K^+]_i$ ,  $[Na^+]_i$  bzw.  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  unter Ruhebedingungen. Die Messungen wurden mit ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen durchgeführt. Die Anzahl der Messungen ist jeweils angegeben.

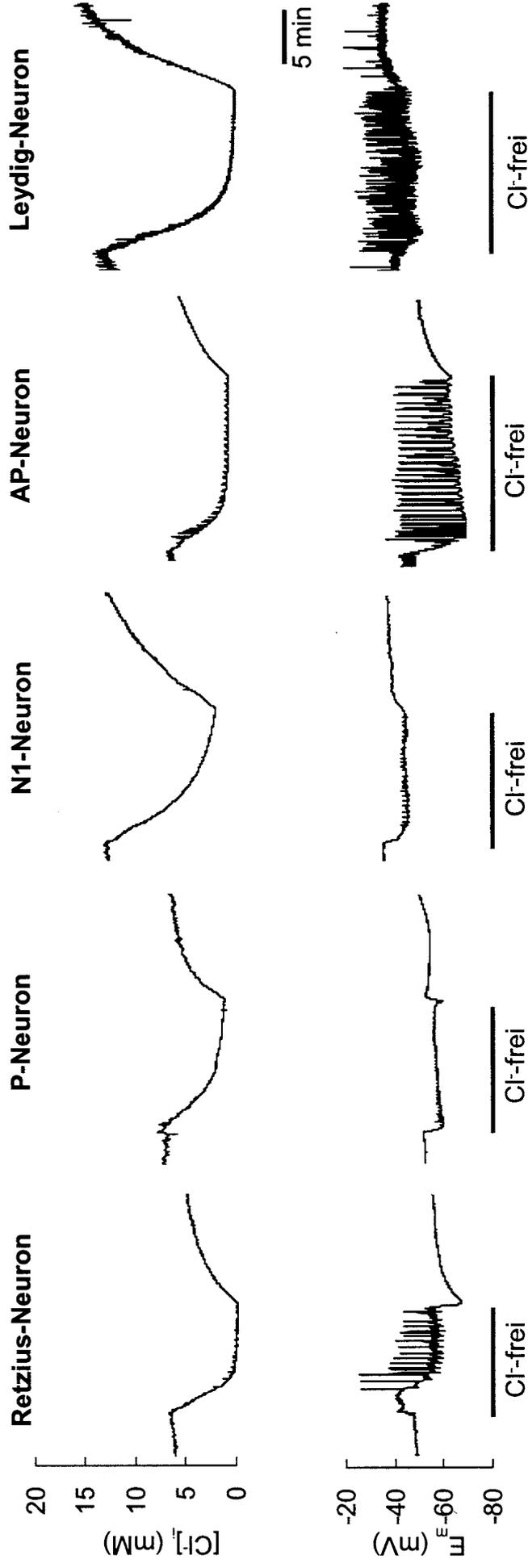


**Abb. 13:** Zusammenhang zwischen  $Cl^-$ -Gleichgewichtspotential ( $E_{Cl}$ ) und  $E_m$  in Ruhe  
A) Einzelwerte. Die Experimente wurden mit  $Cl^-$ -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen vorgenommen. Die Zahl der Messpunkte ist angegeben. Die gestrichelte Linie gibt den Zusammenhang zwischen  $E_{Cl}$  und  $E_m$  wieder, der bei passiver  $Cl^-$ -Verteilung zu erwarten ist ( $E_{Cl} = E_m$ ). Zahl der Messpunkte siehe B.  
B) Statistik. Vergleich der Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) von  $E_m$  (schwarze Balken) und  $E_{Cl}$  (graue Balken). Bei allen fünf Zelltypen war  $E_{Cl}$  negativer als  $E_m$ .

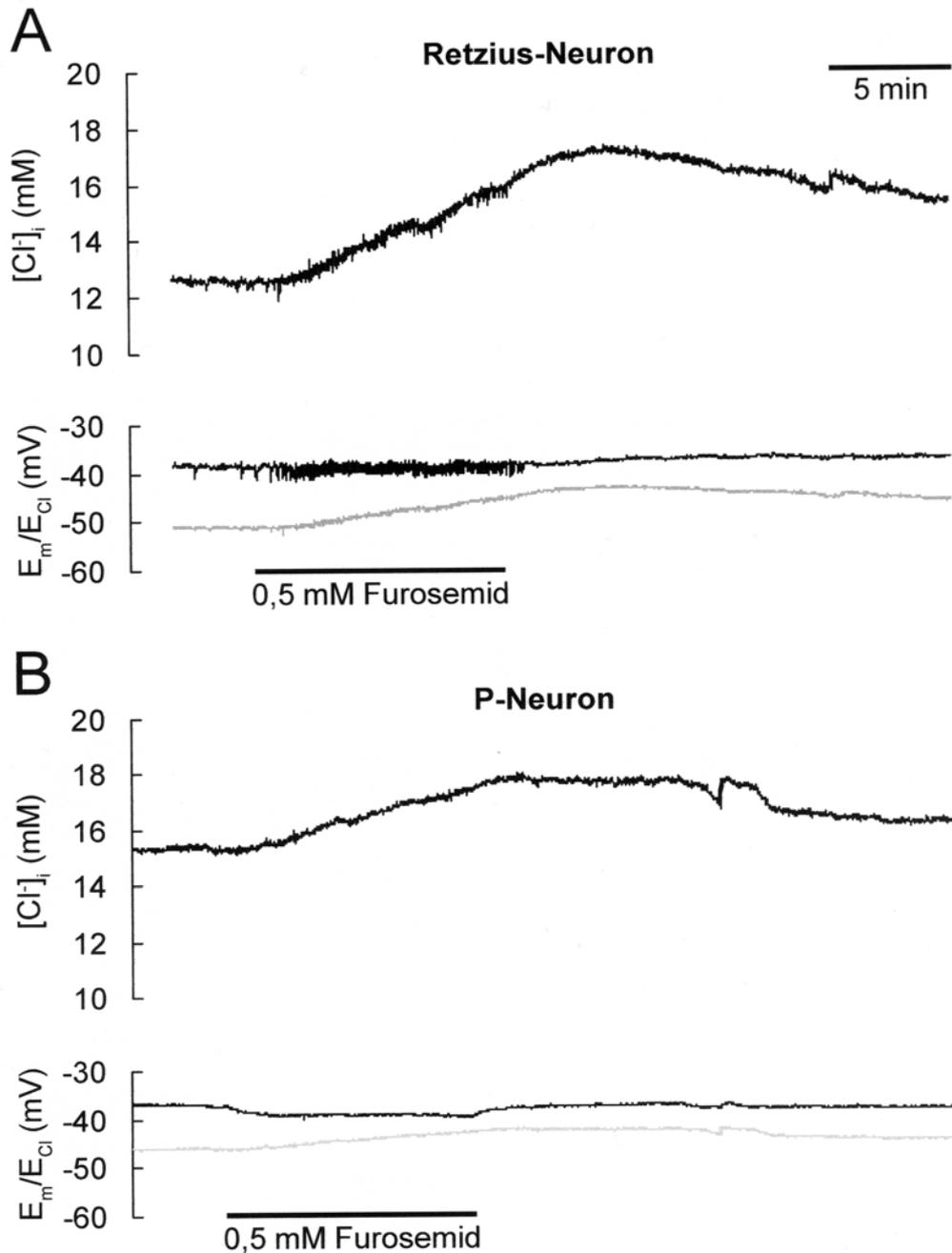


**Abb. 14:** Wirkung von DIDS auf  $E_m$  und  $R_{input}$  bei Retzius- und P-Neuronen

$R_{input}$  wurde anhand der  $E_m$ -Verschiebungen ermittelt, die durch Injektion eines negativen Strompulses hervorgerufen wurden (Retzius: -3 nA, P: -1 nA, Pulsdauer 1 s, Pulsabstand 10 s). Bei Retzius-Neuronen (A) führte 0,5 mM DIDS zu einer Zunahme von  $R_{input}$  um  $23 \pm 5\%$  ( $n = 6$ ), bei P-Neuronen (B) um  $5 \pm 3\%$  ( $n = 5$ ). Die DIDS-induzierten Änderungen von  $R_{input}$  waren nur partiell reversibel.  $E_m$  wurde durch DIDS nicht beeinflusst.



**Abb. 15:** Registrierbeispiele zur Wirkung  $Cl^-$ -freier Lösung auf  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  Messungen mit  $Cl^-$ -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen. Der Entzug des extrazellulären  $Cl^-$  führte bei allen Neuronen zur Abnahme von  $[Cl^-]_i$  (obere Spuren). Die  $[Cl^-]_i$ -Abnahme erfolgte bei Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen schneller als bei P- und N1-Neuronen. Der Entzug des extrazellulären  $Cl^-$  führte bei allen Neuronen zu einer meist reversiblen Membranhyperpolarisation (untere Spuren). Bei Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen verursachte der  $Cl^-$ -Entzug die verstärkte Generierung von Aktionspotentialen.

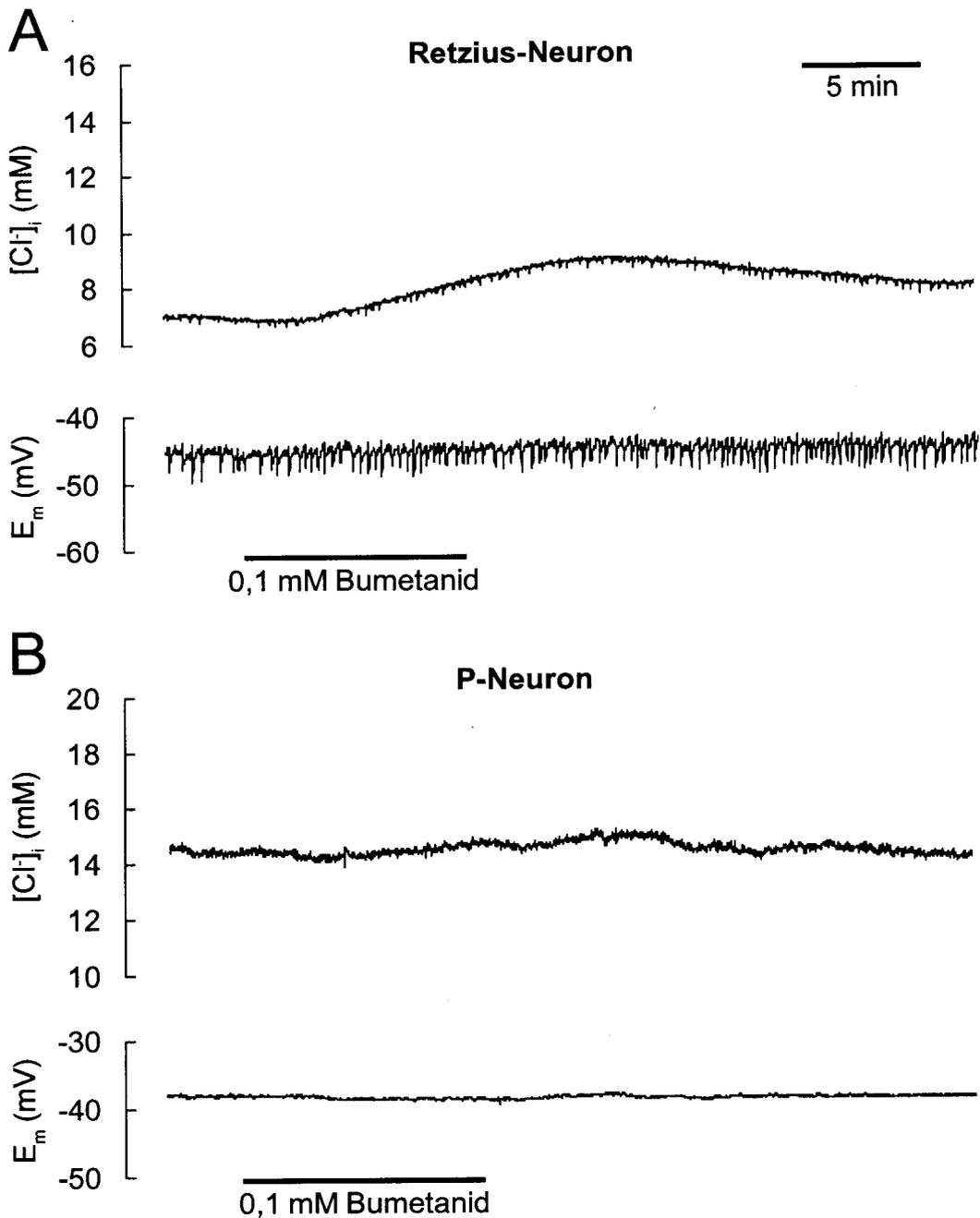


**Abb. 16:** Wirkung von Furosemid auf  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$  bei Retzius- und P-Neuronen

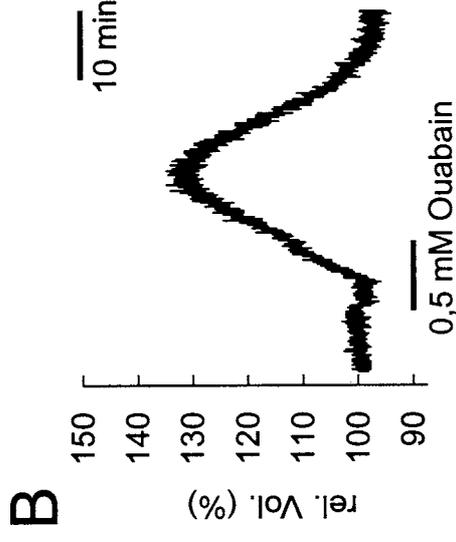
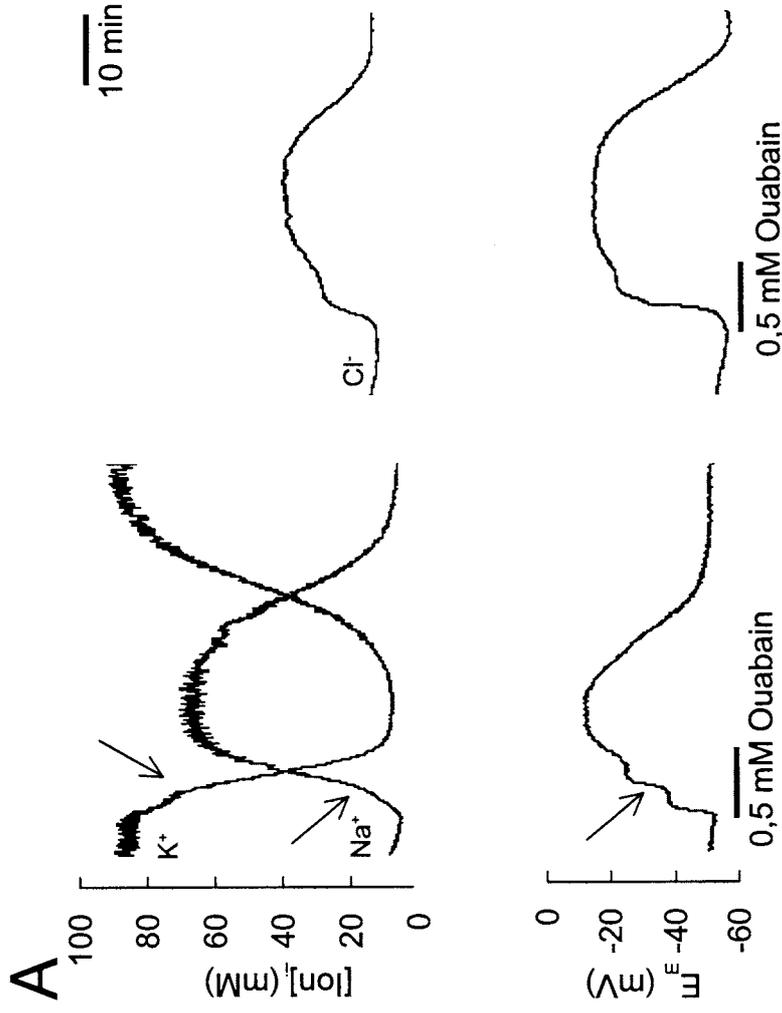
A) Bei Retzius-Neuronen verursachte die Applikation von 0,5 mM Furosemid einen Anstieg von  $[Cl^-]_i$ , während  $E_m$  leicht in depolarisierende Richtung verschoben wurde.

B) Bei P-Neuronen verursachte Furosemid ebenfalls einen  $[Cl^-]_i$ -Anstieg. Dagegen wurde  $E_m$  leicht in hyperpolarisierende Richtung verschoben.

Die Furosemid-induzierten Verschiebungen von  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  führten bei beiden Neuronen zu einer Annäherung von  $E_{Cl}$  (graue Linie) und  $E_m$ , d.h. zu einer Schwächung der aktiven  $Cl^-$ -Verteilung.



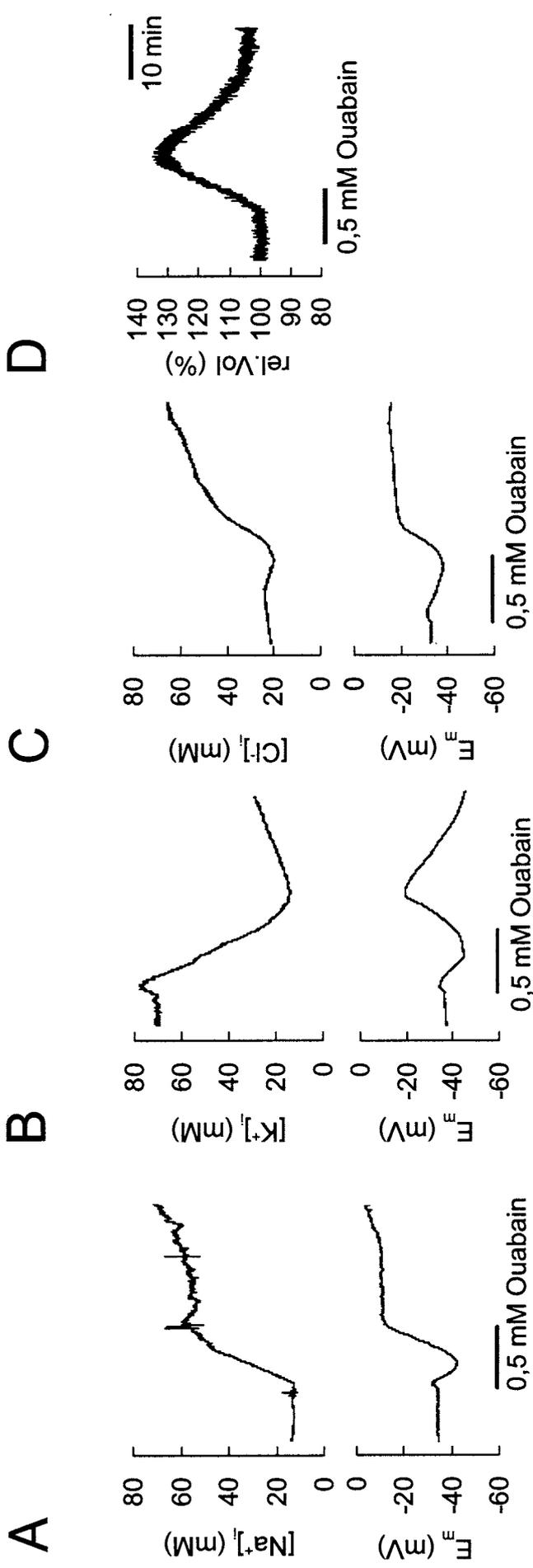
**Abb. 17:** Wirkung von Bumetanid auf  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$  bei Retzius- und P-Neuronen  
 A) Bei Retzius-Neuronen verursachte die Applikation von 0,1 mM Bumetanid einen geringen, reversiblen Anstieg von  $[Cl^-]_i$ , während  $E_m$  nicht beeinflusst wurde.  
 B) Bei P-Neuronen hatte Bumetanid keinen Einfluss auf  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$ .



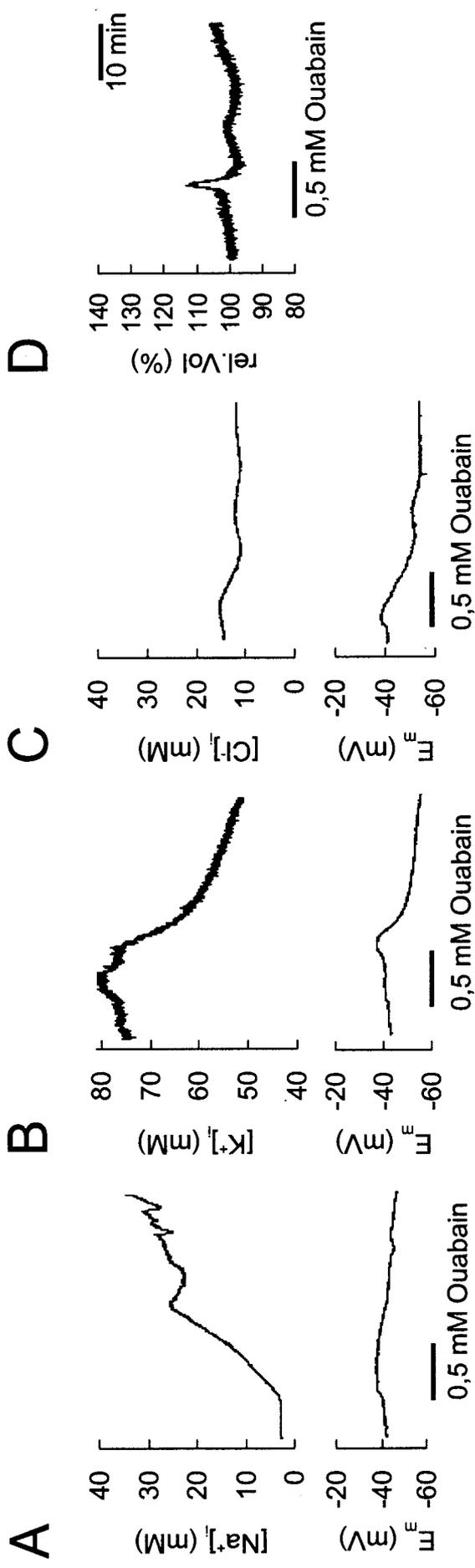
**Abb. 18:** Wirkung von Ouabain auf  $E_m$ ,  $[Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  (A) sowie auf das Zellvolumen (B) von Retzius-Neuronen

A) Die Registrierungen wurden mit einer  $Na^+$ - und  $K^+$ -sensitiven Dreikanal-Glasmikroelektrode (links) bzw. mit einer  $Cl^-$ -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode aufgenommen. Die Applikation von 0,5 mM Ouabain verursachte eine mehrstufige Membrandepolarisation, eine Abnahme von  $[K^+]_i$  sowie eine Zunahme von  $[Na^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$ . Die Änderungen von  $[Na^+]_i$  und  $[K^+]_i$  erfolgten anfänglich langsam und wurden ~5 min nach Beginn der Ouabain-Applikation deutlich schneller (Pfeile). Dieser Übergang korrelierte mit der zweiten Phase der Membrandepolarisation. Der Zeitverlauf des Ouabain-induzierten  $[Cl^-]_i$ -Anstiegs entsprach dem Zeitverlauf der Membrandepolarisation.

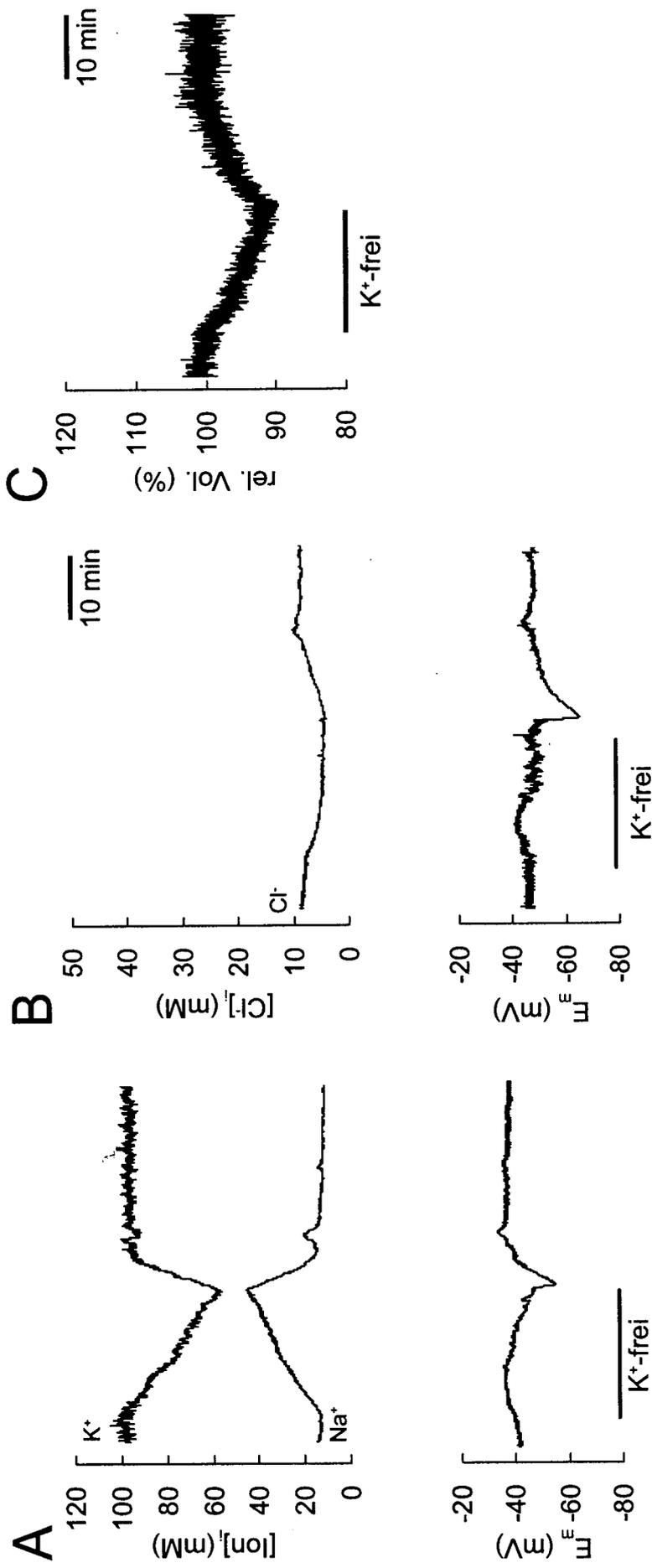
B) Die Registrierung des Zellvolumens wurde mikrofluorimetrisch mit Fura-2 als Volumenmarker vorgenommen. Ouabain verursachte eine Zellschwellung. Die Ouabain-induzierten Änderungen von  $E_m$ ,  $[Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  sowie die des Zellvolumens waren alle innerhalb von 20-30 min reversibel.



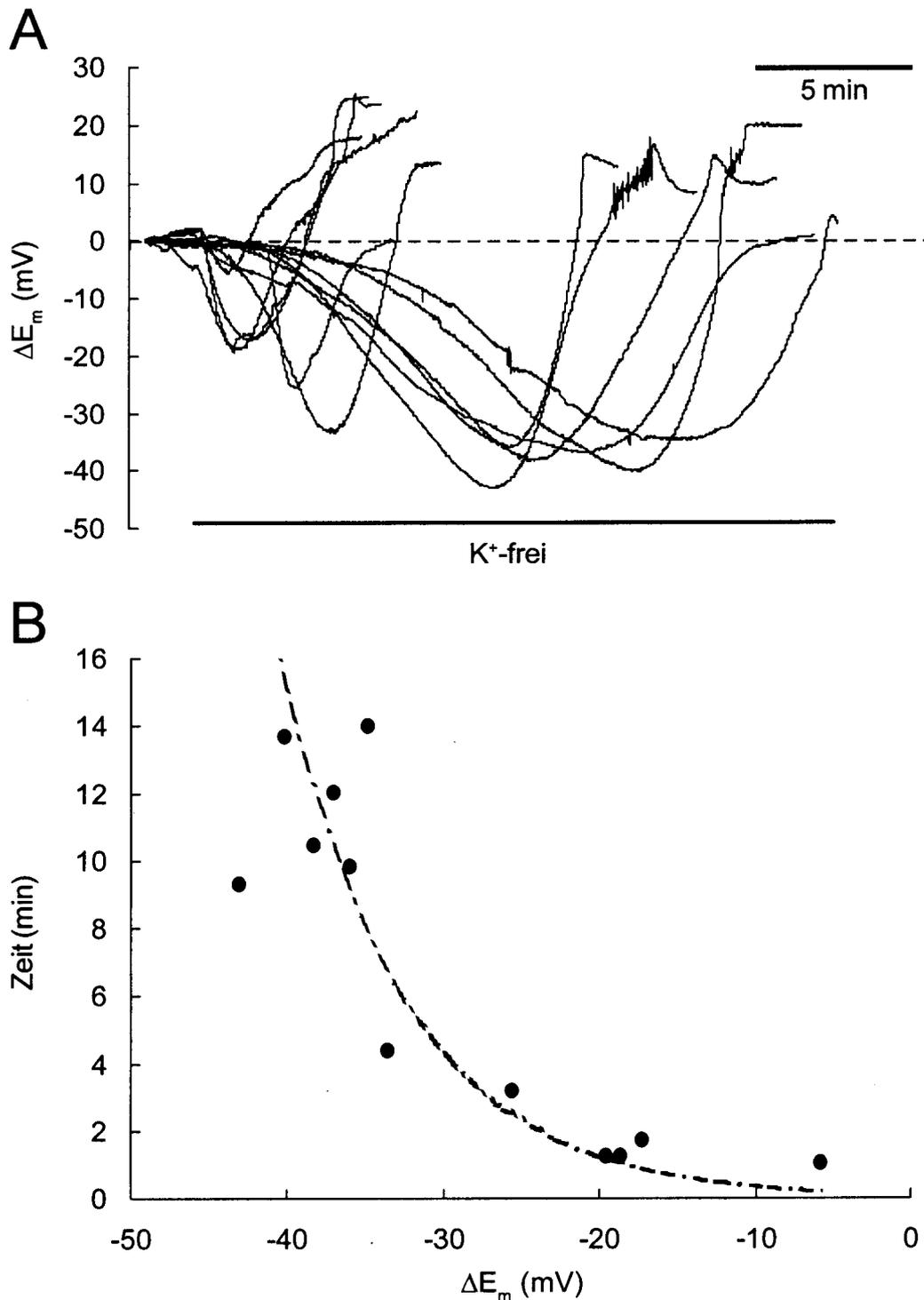
**Abb. 19:** Wirkung von Ouabain auf  $E_m$ ,  $[Na^+]_p$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  sowie auf das Zellvolumen von P-Neuronen: Zellen mit starker  $E_m$ -Verschiebung A-C) Die Registrierungen wurden mit ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden durchgeführt. Die Applikation von 0,5 mM Ouabain verursachte eine Zunahme von  $[Na^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  (A,C) sowie eine Abnahme von  $[K^+]_i$  (B). Ouabain verursachte bei 9 von insgesamt 17 untersuchten Neuronen zuerst eine Membranhyperpolarisation, die später in eine Depolarisation überging. Die Membrandepolarisation war nur bei 6 dieser 9 Neuronen vollständig reversibel. D) Die Registrierung des Zellvolumens wurde mikrofluometrisch mit Fura-2 als Volumenmarker vorgenommen. Ouabain löste bei 5 von 6 Neuronen eine Schwellung aus. Bei einem Neuron blieb das Volumen unverändert, bei einem anderen ging der Schwellung eine Schrumpfung voraus. Die Ouabain-induzierten Änderungen des Zellvolumens waren in allen Experimenten innerhalb von 20-30 min reversibel.



**Abb. 20:** Wirkung von Ouabain auf  $E_m$ ,  $[Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  sowie auf das Zellvolumen von P-Neuronen: Zellen mit geringer  $E_m$ -Verschiebung (A-C) Die Registrierungen wurden mit ionensensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode durchgeführt. Die Applikation von 0,5 mM Ouabain beeinflusste bei 8 der 17 untersuchten Neuronen das  $E_m$  nur geringfügig. Nach Auswaschen des Ouabains blieb eine anhaltende Membranhypolarisation bestehen. Ouabain verursachte eine Zunahme von  $[Na^+]_i$  (A), und eine Abnahme von  $[K^+]_i$  (B), während  $[Cl^-]_i$  nur geringfügig beeinflusst wurde (C). D) Die Registrierung des Zellvolumens wurde mikrofluorimetrisch mit Fura-2 als Volumenmarker vorgenommen. Ouabain hatte bei diesem Neuron nur wenig Einfluss auf das Zellvolumen.



**Abb. 21:** Wirkung von K<sup>+</sup>-freier Badlösung auf E<sub>m</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>p</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> sowie auf das Zellvolumen bei Retzius-Neuronen. Die Ionenkonzentrationen und E<sub>m</sub> wurden mit einer Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-sensitiven Dreikanal-Glasmikroelektrode (A) bzw. einer Cl<sup>-</sup>-sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode registriert. Das Zellvolumen wurde mikrofluorimetrisch mit Fura-2 als Volumenmarker gemessen (C). Der Entzug des extrazellulären K<sup>+</sup> verursachte eine Membrandepolarisation, die in eine Membranhypolarisation überging, eine Zunahme von [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> sowie eine Abnahme von [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>. Nach Wiedertzugabe des extrazellulären K<sup>+</sup> erfolgte eine schnelle transiente Membranhypolarisation. Der K<sub>+</sub>-Entzug verursachte außerdem eine Abnahme des Zellvolumens um ca. 7%. Die durch den Entzug des extrazellulären K<sup>+</sup> hervorgerufenen Änderungen von E<sub>m</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>p</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> sowie des Zellvolumens waren alle innerhalb von 10-20 min reversibel.



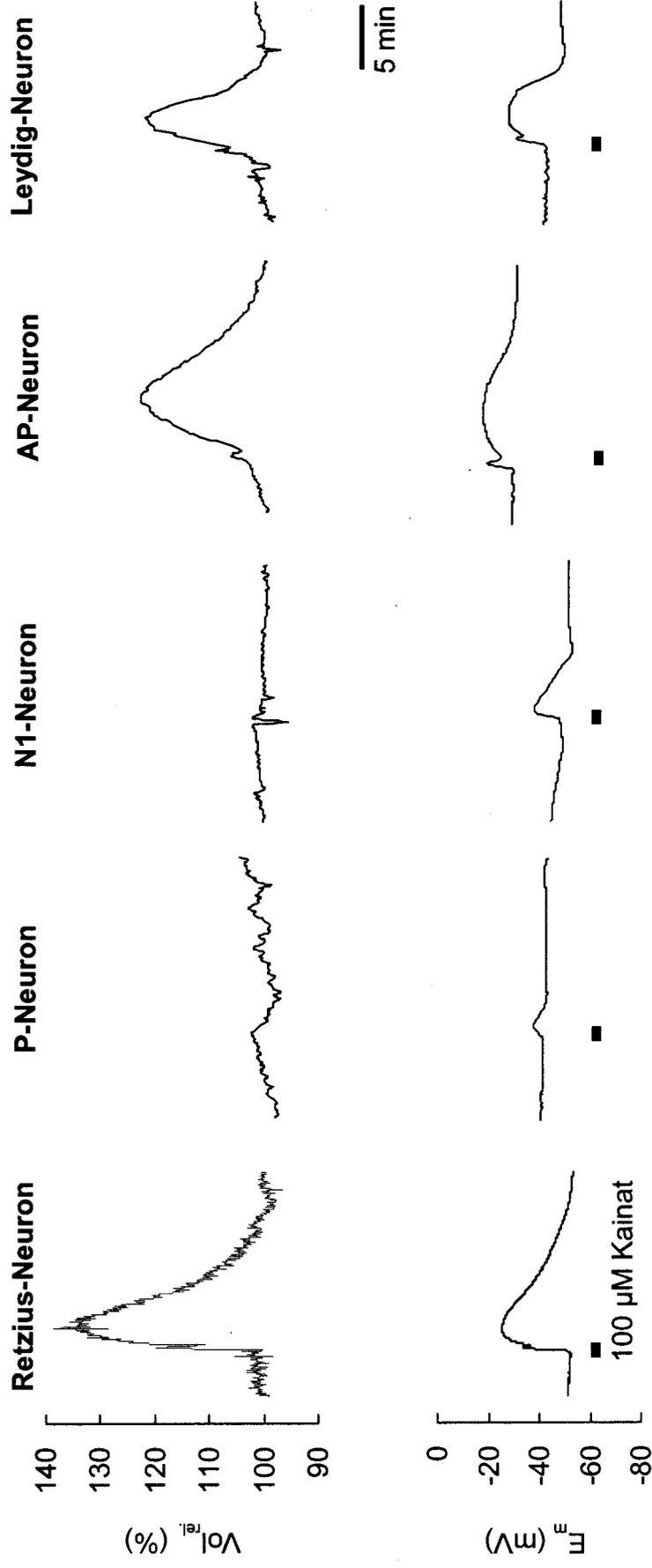
**Abb. 22:** Wirkung von  $K^+$ -freier Badlösung auf das  $E_m$  von P-Neuronen

A) Überlagerte  $E_m$ -Antworten von 12 P-Neuronen auf den 20-minütigen Entzug des extrazellulären  $K^+$ . Der  $K^+$ -Entzug verursachte eine Membranhypolarisation, die hinsichtlich Amplitude und Zeitverlauf sehr variabel war. Die Membran repolarisierte in den meisten Fällen noch in Abwesenheit des  $K^+$ , wobei es bei einigen Neuronen zum Zusammenbruch des  $E_m$  kam. Vor dem  $K^+$ -Entzug betrug  $E_m$   $-40 \pm 5$  mV ( $n = 12$ ).

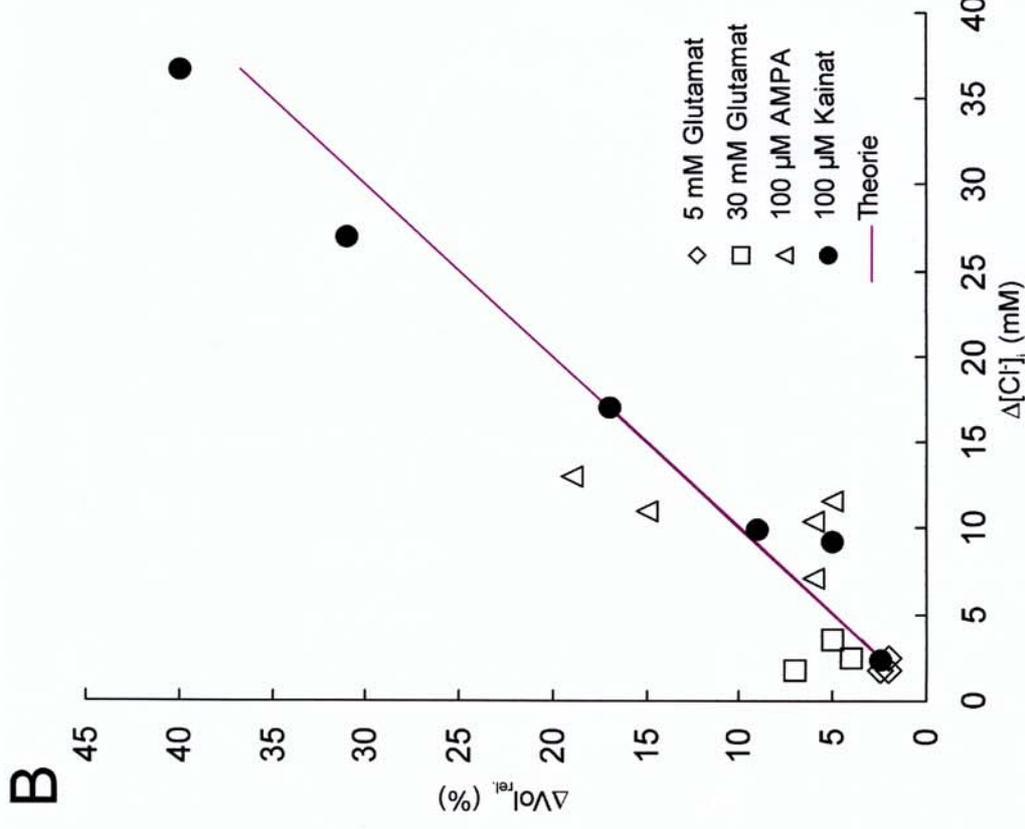
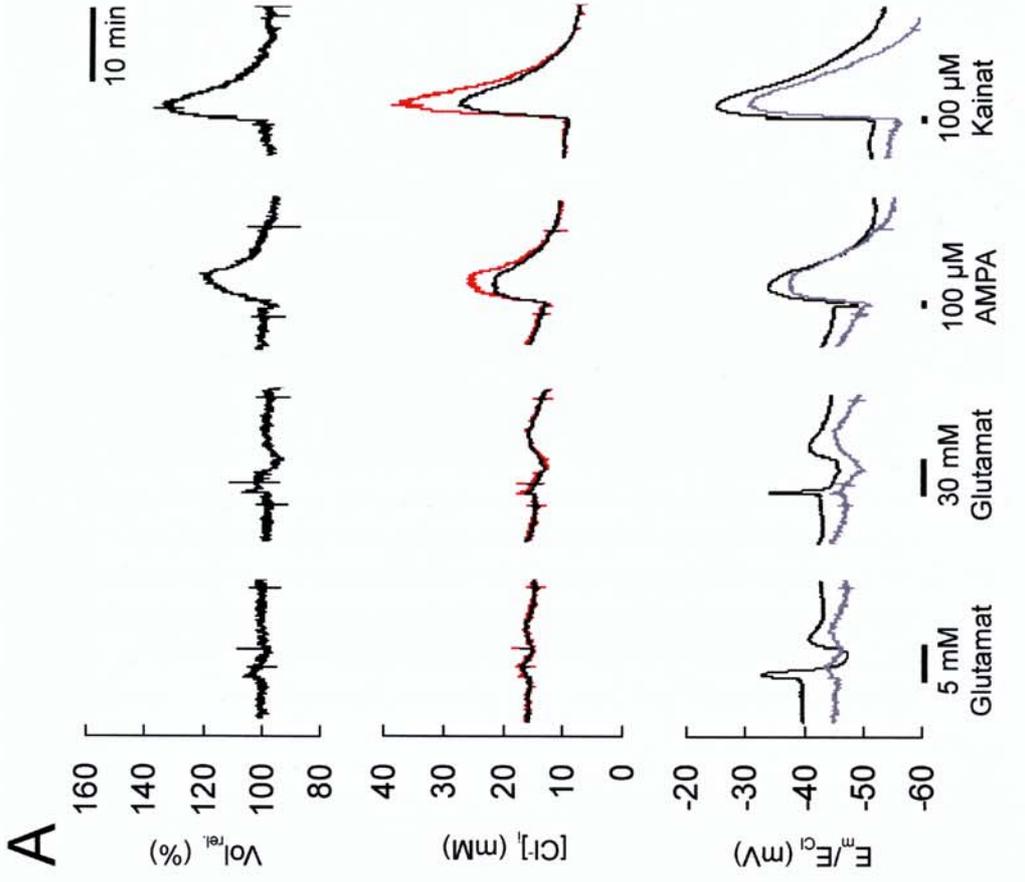
B) Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Hyperpolarisationsmaximums und der Amplitude der Hyperpolarisation. Auswertung der in A wiedergegebenen Registrierungen. Je ausgeprägter die Hyperpolarisation war, umso später wurde das Maximum erreicht. Zwischen den beiden Parametern besteht offenbar ein nichtlinearer Zusammenhang, wie die strichpunktierte Linie andeutet.



**Abb. 23:** Wirkung von  $K^+$ -freier Lösung auf  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$  von P-Neuronen. Die Registrierungen wurden bei 3 verschiedenen Neuronen (A, B, C) mit  $Cl^-$ -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektroden durchgeführt. In der oberen Teilabbildung ist jeweils  $[Cl^-]_i$  in der unteren Teilabbildung das zugeordnete  $E_m$  dargestellt. Die durch Entzug des extrazellulären  $K^+$  verursachte Membranhypopolarisation nahm nach einiger Zeit ab und ging entweder in eine Depolarisation (A, B) über, oder  $E_m$  erreichte wieder den Ausgangswert (C). Bei 3 Neuronen brach  $E_m$  vollständig zusammen (A), während bei den übrigen 5 Neuronen die Membrandepolarisation reversibel war (B). Während der Membranhypopolarisation wurde eine Abnahme von  $[Cl^-]_i$  beobachtet, während der Depolarisation ein  $[Cl^-]_i$ -Anstieg. Der  $[Cl^-]_i$ -Anstieg bei Neuronen, deren Membran irreversibel depolarisierte (A), war größer als bei Neuronen mit reversiblen Änderungen von  $E_m$  (B). Bei Neuronen, deren  $E_m$  auf das Ausgangspotential zurückkehrte, änderte sich  $[Cl^-]_i$  nur wenig (C). Von insgesamt 11 untersuchten P-Neuronen zeigten 3 das in A illustrierte Verhalten, 5 das Verhalten in B und 3 das Verhalten in C.



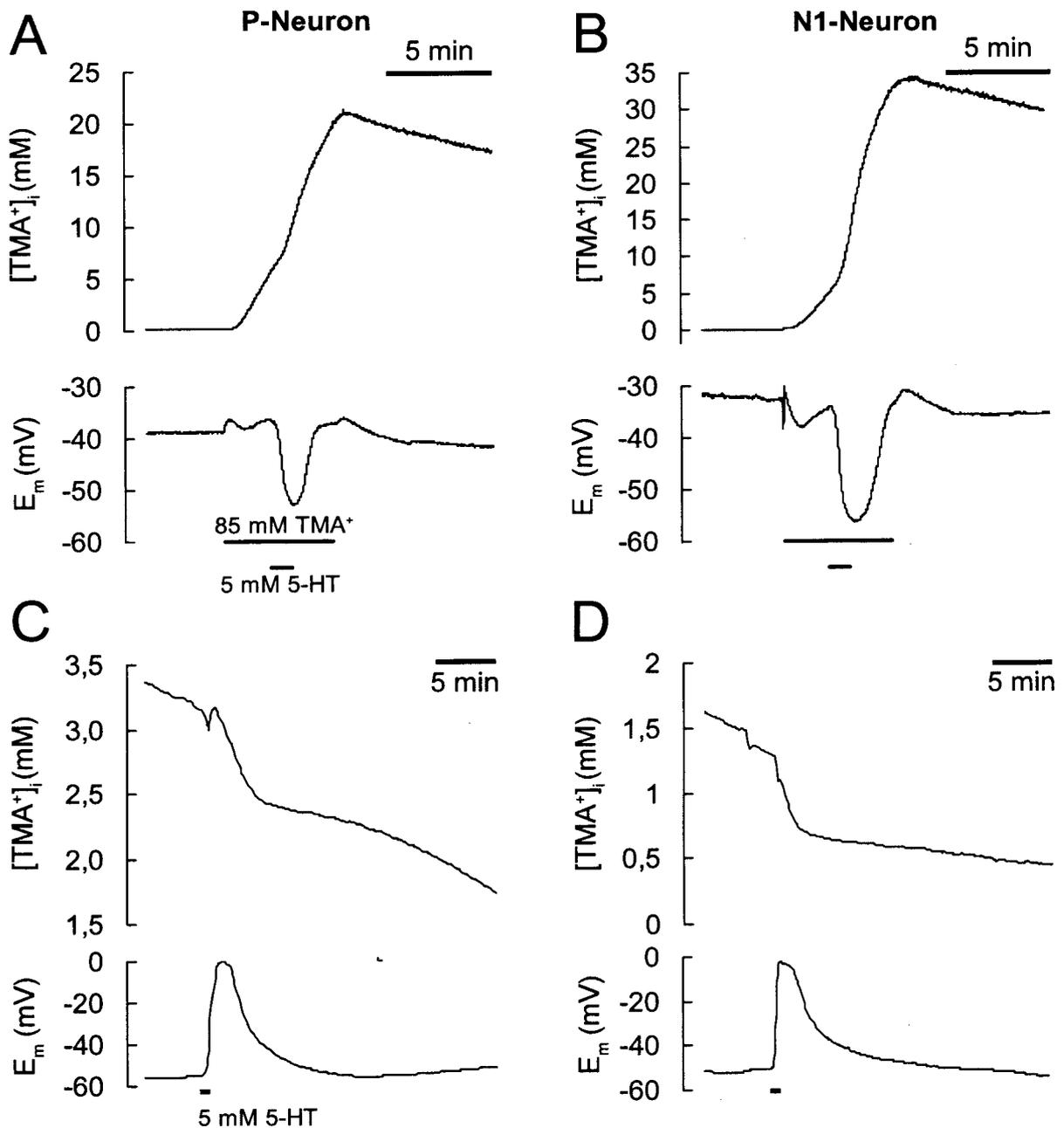
**Abb. 24:** Wirkung von Kainat auf Zellvolumen und  $E_m$  bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen. Die Registrierungen wurden mit Hilfe ionensensitiver Zweikanal-Glasmikroelektroden mit TMA<sup>+</sup> als Volumenmarker durchgeführt. Die Applikation von 100  $\mu M$  Kainat verursachte bei Retzius-, AP- und Leydig-Neuronen eine Zellschwellung sowie eine Membrandepolarisation, während bei P- und N1-Neuronen Volumen und  $E_m$  nur geringfügig beeinflusst wurden.



**Abb. 25:** Wirkung glutamaterger Agonisten auf  $E_{m, Cl}$  und das Zellvolumen von Retzius-Neuronen

A) Der physiologische Agonist Glutamat veränderte  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen kaum, während Kainat und AMPA einen Anstieg von  $[Cl^-]_i$  und eine Zellschwellung verursachten. Die roten Spuren geben die um die Volumenänderung korrigierten  $[Cl^-]_i$  an. Die durch Kainat oder AMPA induzierte Membrandepolarisation hielt deutlich länger an als die Glutamat-induzierte Membrandepolarisation. Zusätzlich ist in der unteren Teilabbildung  $E_{Cl}$  dargestellt (graue Spuren).

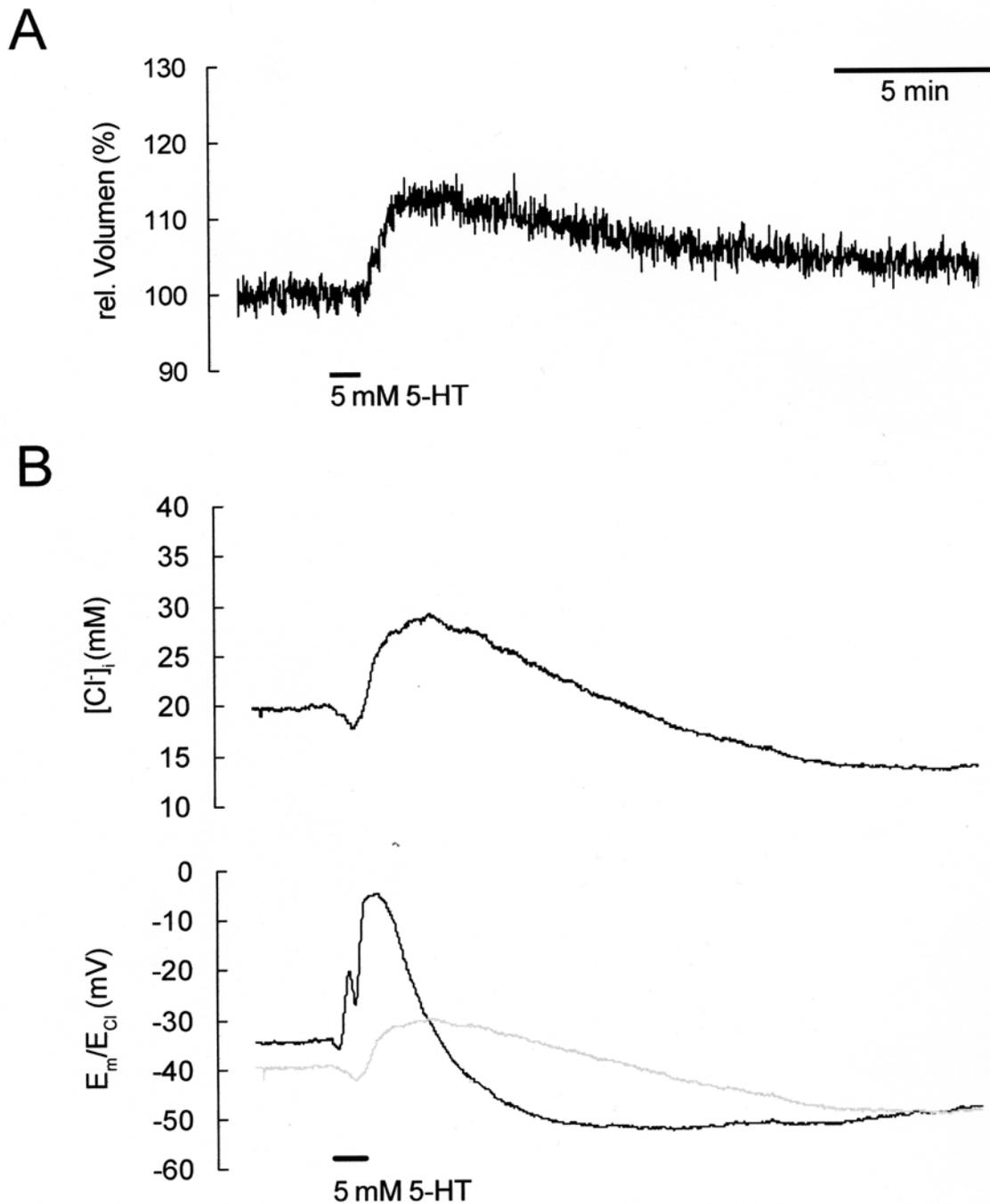
B) Zwischen der durch glutamaterge Agonisten induzierten Volumenzunahme und dem volumenkorrigierten  $[Cl^-]_i$ -Anstieg besteht ein linearer Zusammenhang, der mit den theoretischen Erwartungen übereinstimmt. Die gestrichelte Linie wurde unter der Annahme berechnet, dass eine Aufnahme von 1 mM NaCl das Zellvolumen um 1% vergrößert.



**Abb. 26:** Wirkung von 5-HT auf [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und E<sub>m</sub> bei P- und N1-Neuronen

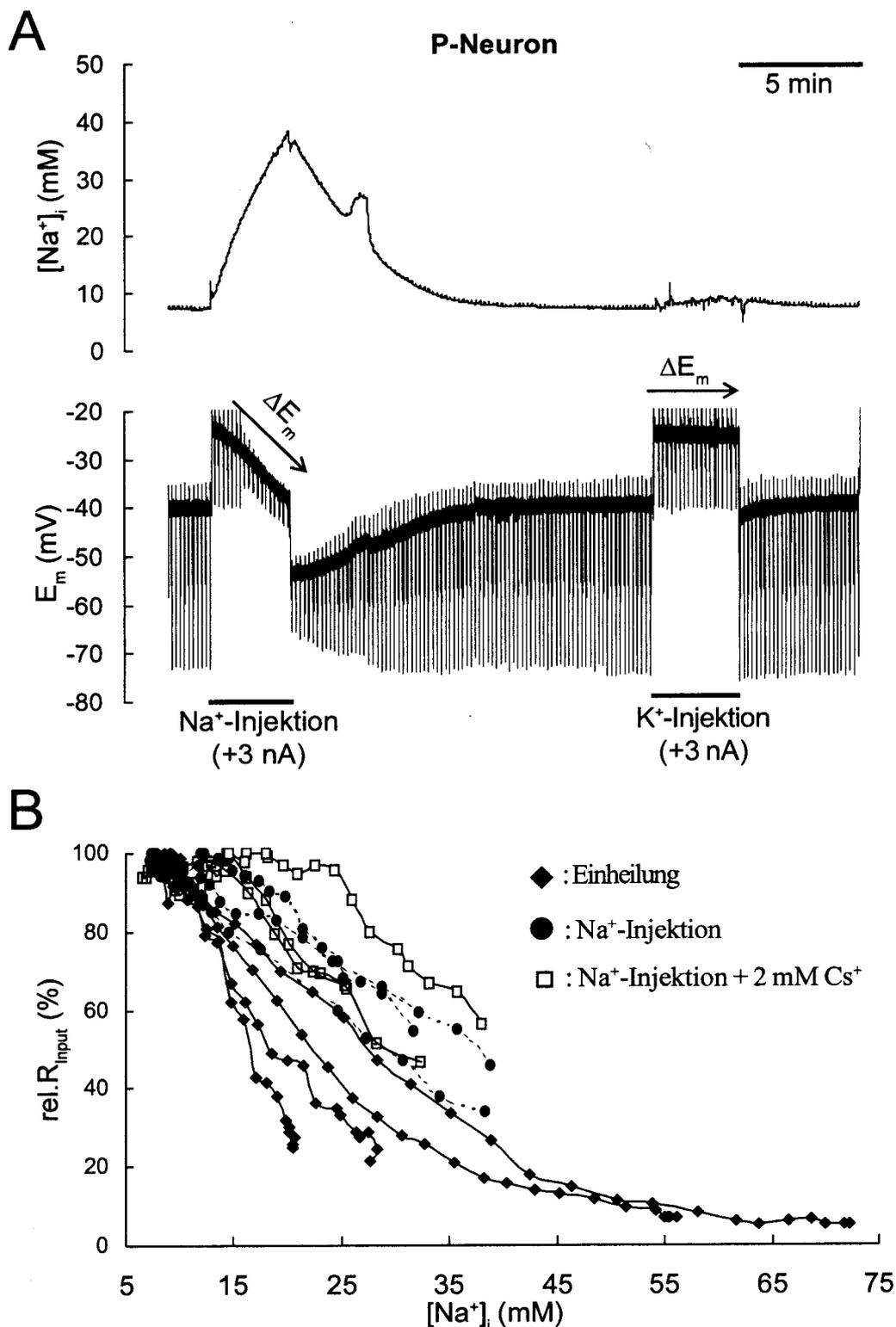
A, B) Die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme wurde durch extrazelluläre Applikation von 85 mM TMA<sup>+</sup> ausgelöst (NaCl ersetzt durch TMA-Cl). Die Applikation von 5 mM 5-HT löste bei beiden Neuronentypen eine Beschleunigung der TMA<sup>+</sup>-Aufnahme sowie eine markante Membranhyperpolarisation aus.

C, D) In TMA<sup>+</sup>-freier Lösung verursachte 5-HT eine Abnahme von [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> sowie eine ausgeprägte Membrandepolarisation. Die [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abnahme ist zum einen auf eine Zellschwellung und zum anderen auf eine gesteigerte TMA<sup>+</sup>-Abgabe zurückzuführen.



**Abb. 27:** Wirkung von 5-HT auf  $E_m$ ,  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen bei P-Neuronen

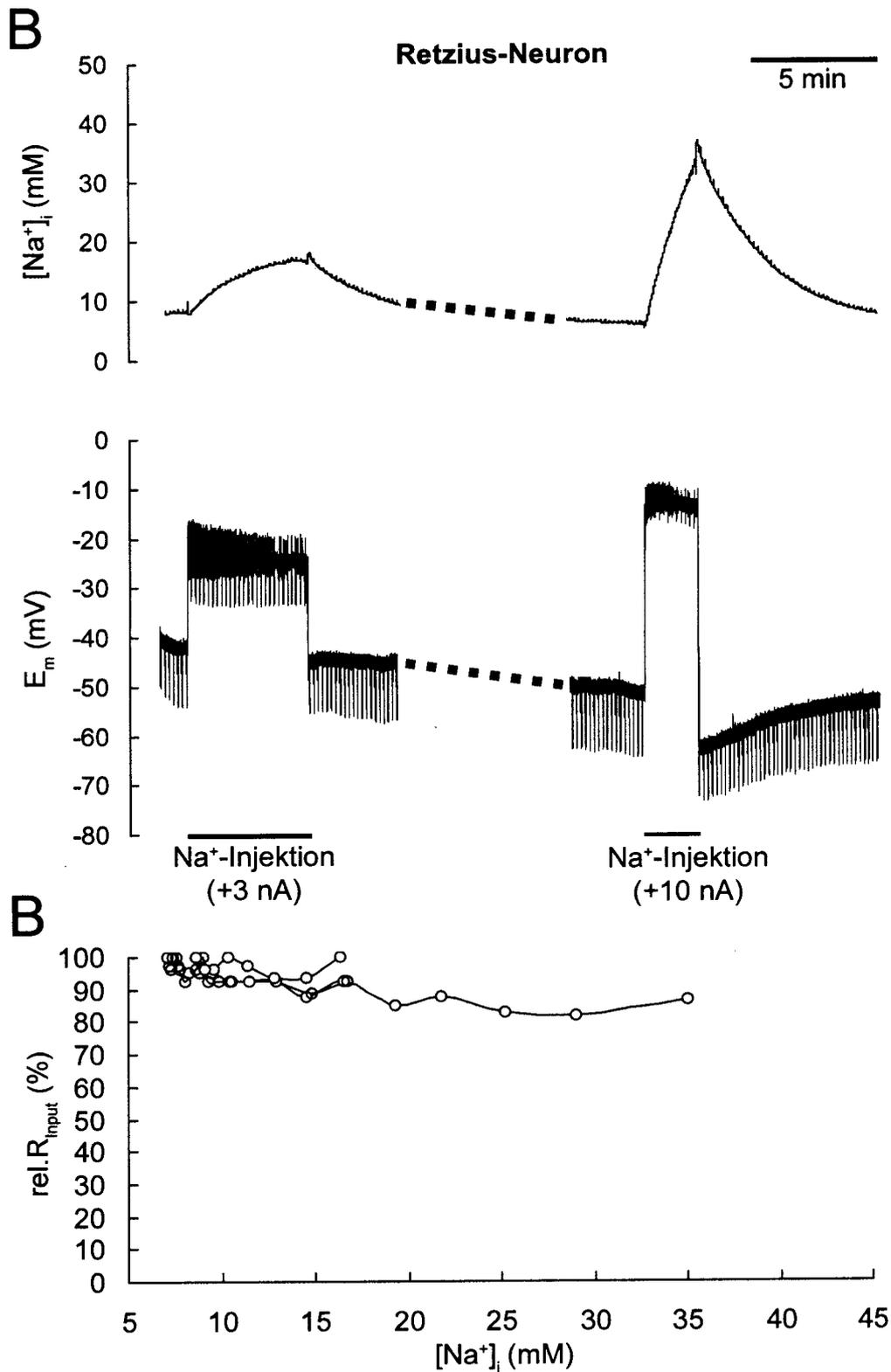
Die Registrierung des Zellvolumens wurde mikrofluorimetrisch mit Fura-2 als Volumenmarker vorgenommen (A), die Messung von  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$  erfolgte simultan mit Hilfe einer  $Cl^-$ -sensitiven Zweikanal-Glasmikroelektrode (B). Die Applikation von 5-HT verursachte eine starke Membrandepolarisation und einen Anstieg von  $[Cl^-]_i$ , sowie eine Zunahme des Zellvolumens. Auffällig war, dass Volumenänderung und  $[Cl^-]_i$ -Anstieg mit ähnlicher Kinetik erfolgten. Die Wirkung von 5-HT war nach 10-15 min vollständig reversibel. Die Erholung von  $[Cl^-]_i$  und Zellvolumen setzte erst dann ein, nachdem  $E_m$  negativer als  $E_{Cl^-}$  (graue Spur) wurde und somit eine auswärtsgerichtete EMK für  $Cl^-$  bestand. Dies lässt vermuten, dass der  $Cl^-$ -Transport primär passiv erfolgt.



**Abb. 28:** Zusammenhang zwischen  $[Na^+]_i$  und Eingangswiderstands ( $R_{Input}$ ) bei P-Neuronen

A) Registrierbeispiel zum Einfluss einer  $Na^+$ - bzw.  $K^+$ -Injektion auf  $[Na^+]_i$  (oben) und  $E_m$  bzw.  $R_{Input}$  (unten). Die Injektion von  $Na^+$  verursachte einen Anstieg von  $[Na^+]_i$ , eine Abnahme von  $R_{Input}$  und eine Membrandepolarisation, die über die Injektionsdauer kontinuierlich abnahm. Nach Beendigung der Injektion blieb  $R_{Input}$  erniedrigt und  $E_m$  war in hyperpolarisierende Richtung verschoben. Mit Wiederabnahme von  $[Na^+]_i$  kehrte auch  $E_m$  und  $R_{Input}$  auf den Ausgangswert zurück. Die  $K^+$ -Injektion hatte keinen Effekt auf  $[Na^+]_i$  und  $R_{Input}$ . Die Membrandepolarisation während der  $K^+$ -Injektion war stabil und  $R_{Input}$  konstant vermindert.

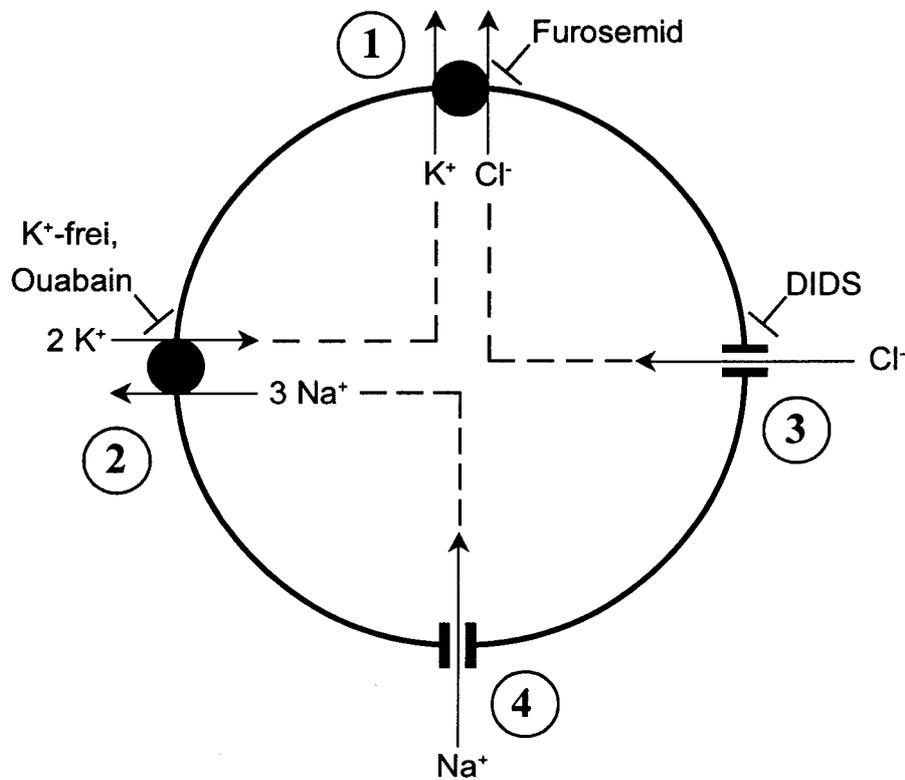
B) Zusammenhang zwischen  $R_{Input}$ , normiert auf den Ruhewert in NSL, und  $[Na^+]_i$ :  $R_{Input}$  nahm mit steigender  $[Na^+]_i$  ab. Der Zusammenhang zwischen  $[Na^+]_i$  und  $R_{Input}$  war in Gegenwart von 2 mM  $Cs^+$  unverändert, so dass ein Beitrag von  $I_h$ -Kanälen an der Abnahme von  $R_{Input}$  auszuschließen ist.



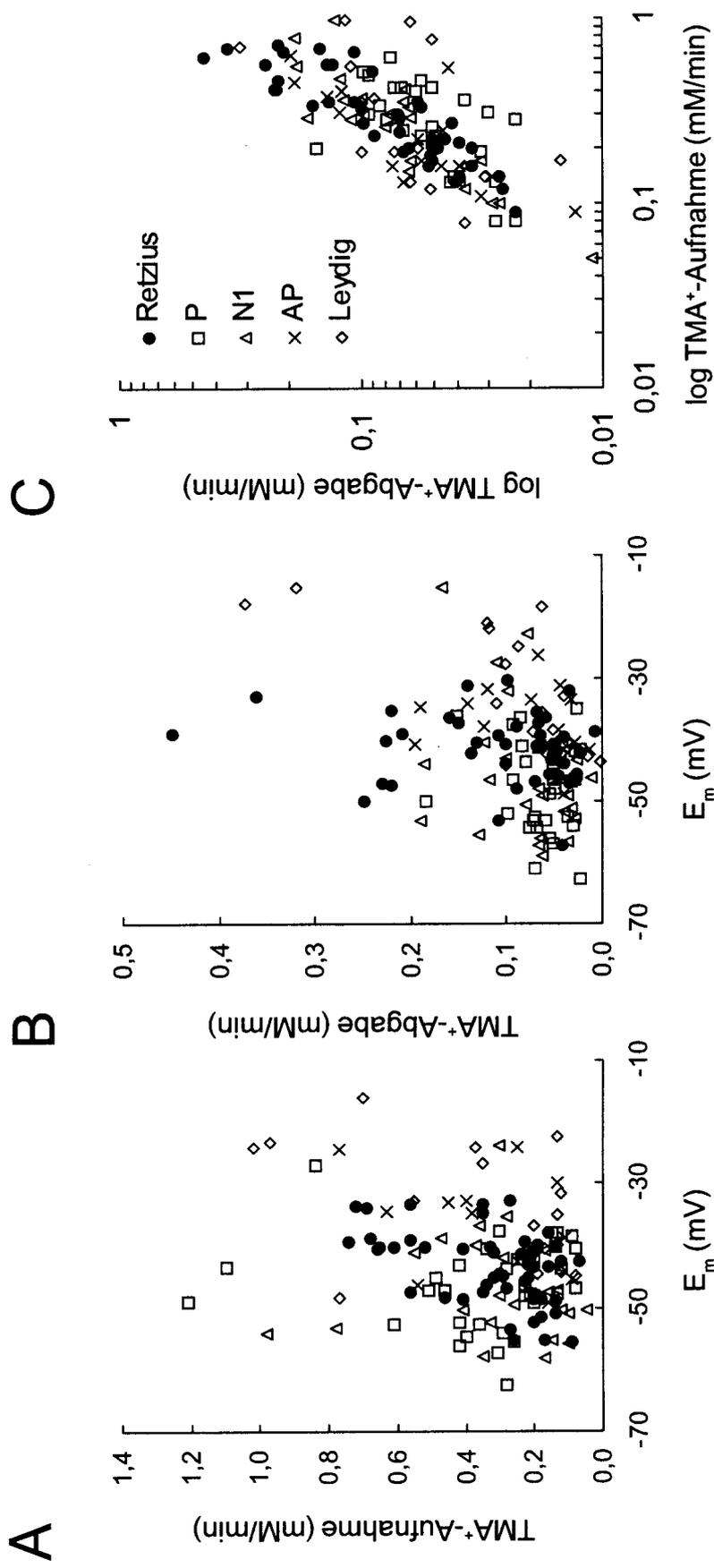
**Abb. 29:** Zusammenhang zwischen  $[Na^+]_i$  und  $R_{input}$  bei Retzius-Neuronen

A) Registrierbeispiel zum Einfluss von  $Na^+$ -Injektionen auf  $R_{input}$ . Die Erhöhung von  $[Na^+]_i$  hatte keinen anhaltenden Einfluss auf  $R_{input}$ .

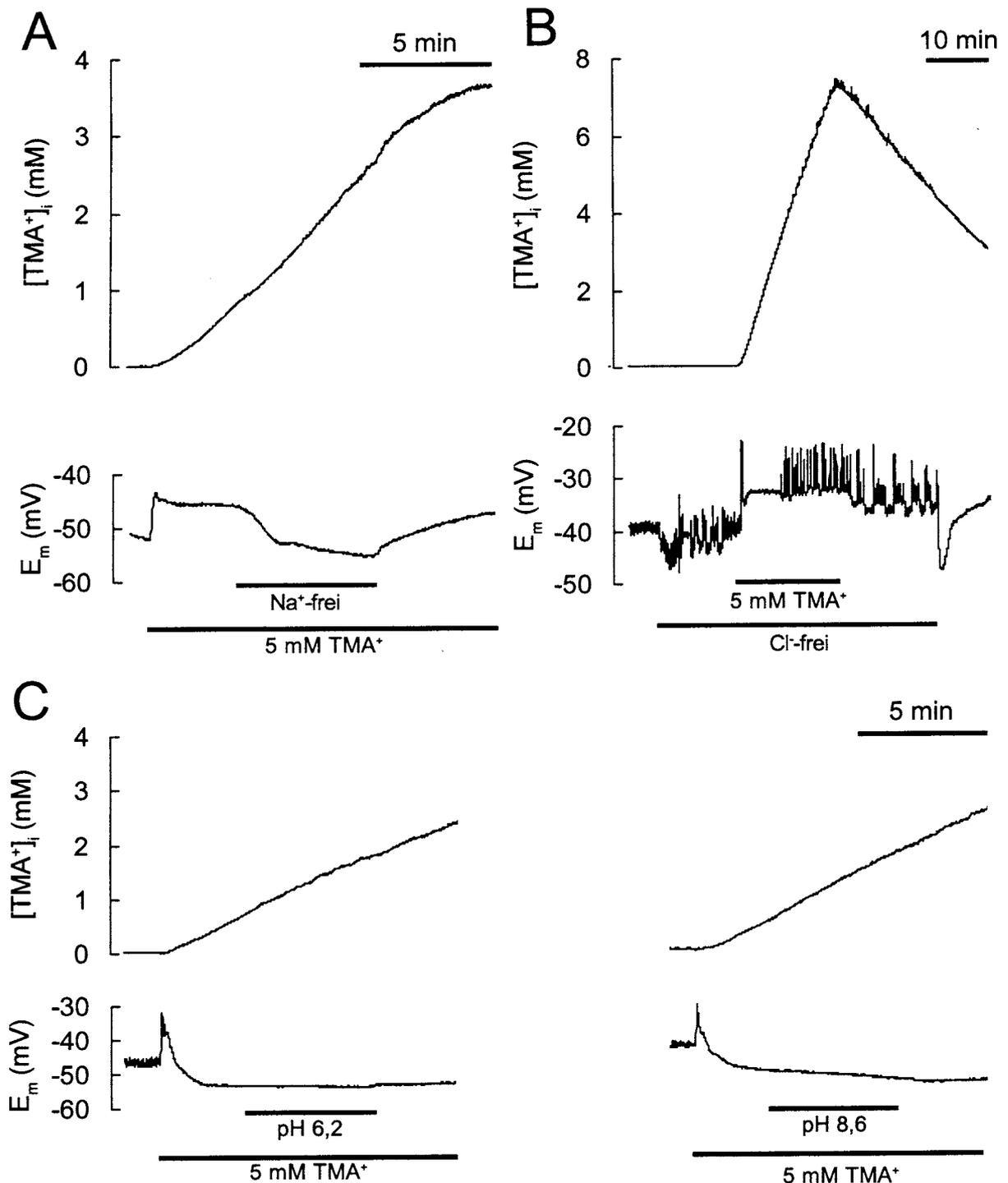
B) Zusammenhang zwischen  $R_{input}$ , normiert auf den Ruhewert in NSL, und  $[Na^+]_i$ ;  $R_{input}$  war weitgehend unabhängig von  $[Na^+]_i$ .



**Abb. 30:** Minimalschema zum Mechanismus der aktiven  $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei Blutegel-Neuronen. Für die aktive  $\text{Cl}^-$ -Verteilung bei Blutegel-Neuronen ist der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter (1) verantwortlich, der den durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe (2) aufgebauten elektrochemischen  $\text{K}^+$ -Gradienten ausnutzt, um  $\text{Cl}^-$  aus der Zelle zu entfernen. Durch die Erniedrigung von  $[\text{Cl}^-]_i$  baut sich eine einwärtsgerichtete elektromotorische Triebkraft für  $\text{Cl}^-$  auf ( $\text{EMK}_{\text{Cl}^-}$ ), so dass  $\text{Cl}^-$ -Ionen in die Zelle einströmen (3). Der  $\text{Cl}^-$ -Einstrom wird durch den  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter kompensiert, wobei pro  $\text{Cl}^-$ -Ion ein  $\text{K}^+$ -Ion die Zelle verlässt. Der  $\text{K}^+$ -Ausstrom wird unter ATP-Verbrauch durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe ausgeglichen, die pro Zyklus 2  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein transportiert und 3  $\text{Na}^+$  aus der Zelle heraus. Es muss also  $\text{Na}^+$  passiv in die Zelle strömen (4), wobei der  $\text{Na}^+$ -Einstrom  $1\frac{1}{2}$  mal so stark sein muss wie der  $\text{Cl}^-$ -Einstrom. In dem Schema sind außerdem die verschiedenen Inhibitoren der Transportsysteme angegeben, die in dieser Arbeit verwendet wurden.



**Abb. 31:** Einfluss von  $E_m$  auf die Aufnahme und Abgabe von TMA<sup>+</sup> bei Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen. Die Raten der TMA<sup>+</sup>-Aufnahme (A) und TMA<sup>+</sup>-Abgabe (B) waren bei den 5 untersuchten Neuronentypen unabhängig von  $E_m$ . In die Diagramme aufgenommen wurden auch Neuronen mit  $E_m$  positiver -30 mV, die ansonsten für weitere Untersuchungen nicht verwendet wurden. Die Raten von TMA<sup>+</sup>-Aufnahme und TMA<sup>+</sup>-Abgabe sind miteinander korreliert (C). Bei allen Neuronentypen erfolgte die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme etwa 3- bis 4-mal so schnell wie die TMA<sup>+</sup>-Abgabe.

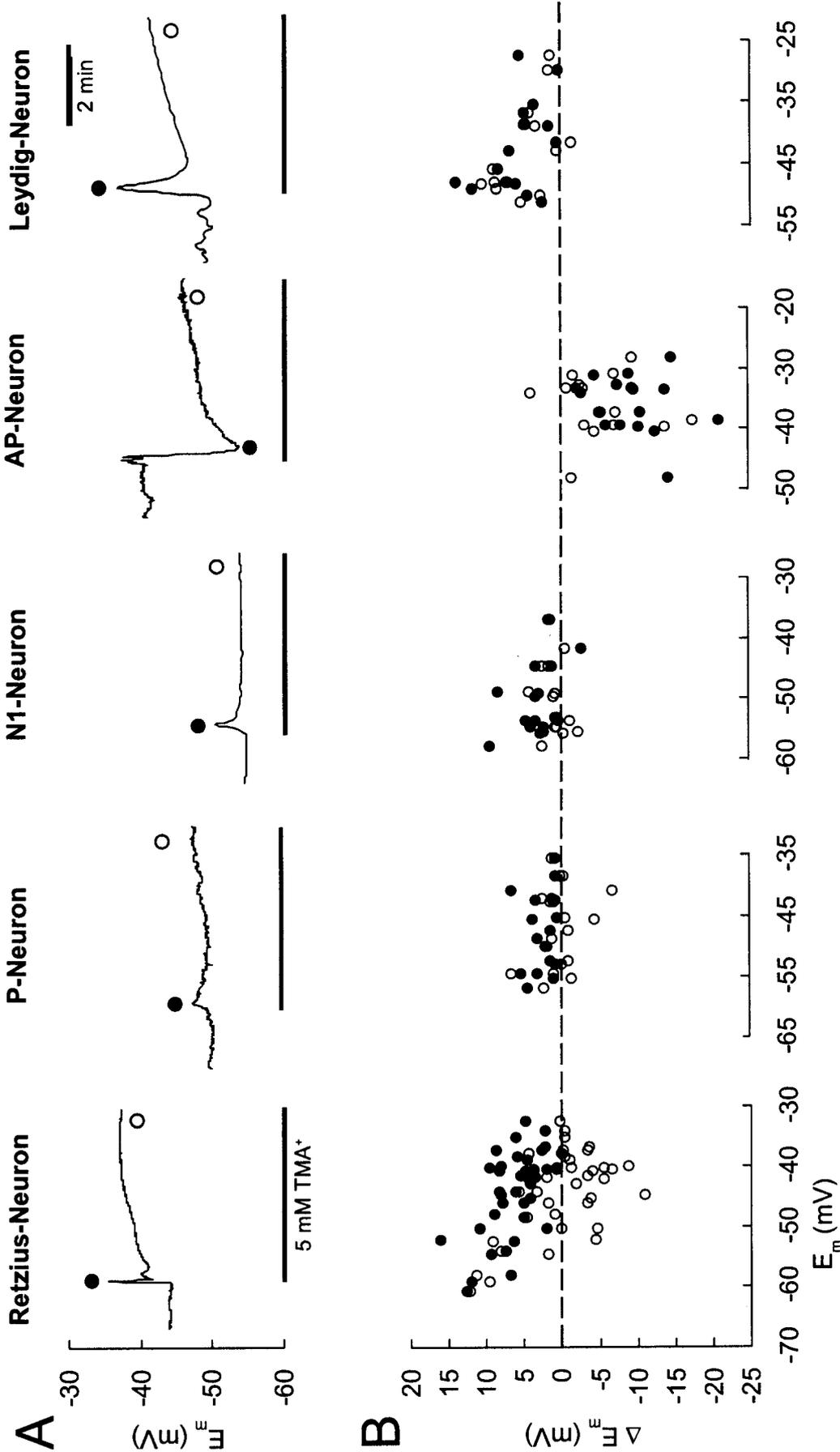


**Abb. 32:** Einfluss des extrazellulären Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> sowie des pH-Werts auf TMA<sup>+</sup>-Aufnahme und E<sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen

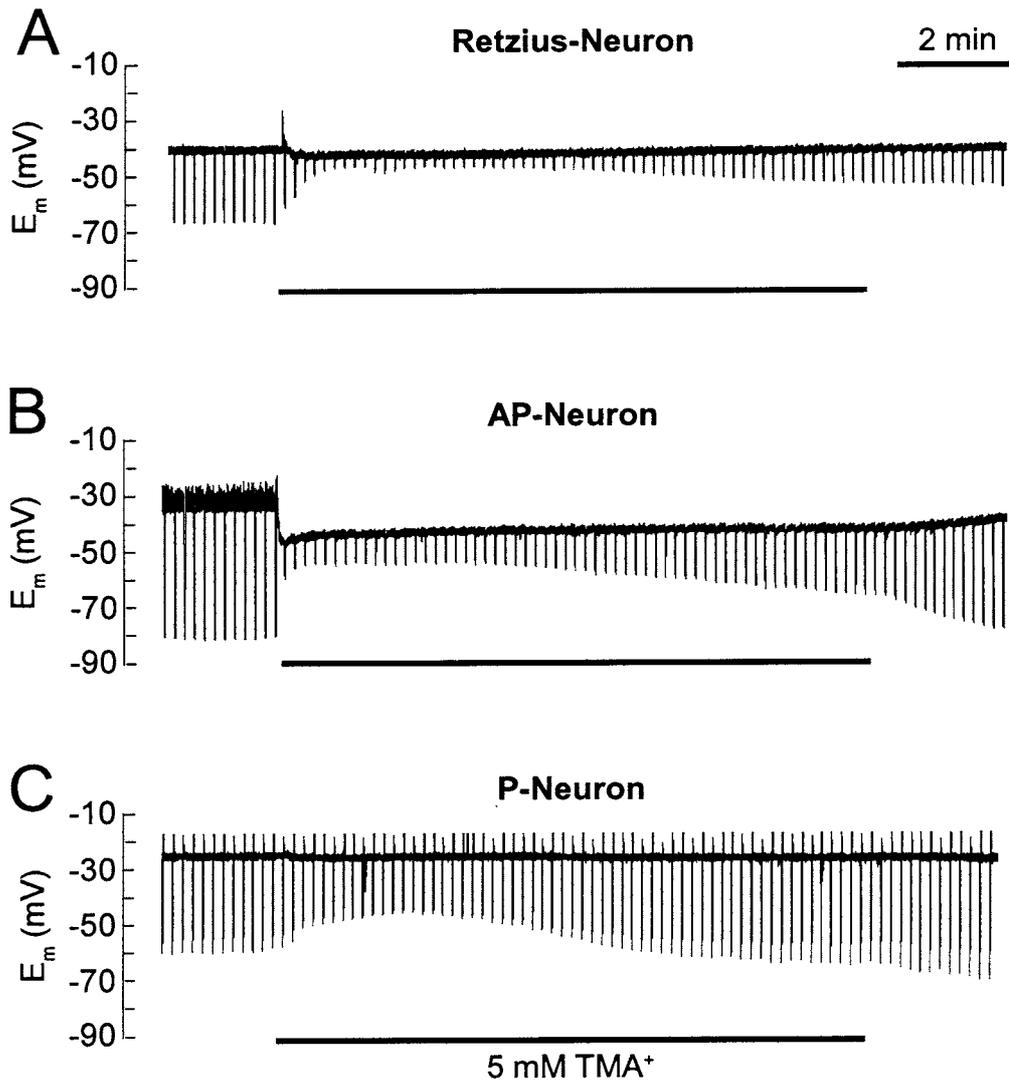
A) Die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme wurde durch Entzug des extrazellulären Na<sup>+</sup> nicht beeinflusst. Das E<sub>m</sub> wurde in Na<sup>+</sup>-freier Badlösung reversibel in hyperpolarisierende Richtung verschoben.

B) Die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme in Cl<sup>-</sup>-freier Badlösung war von der in Cl<sup>-</sup>-haltiger Lösung nicht zu unterscheiden. Anstelle von TMA-Cl wurde in der Cl<sup>-</sup>-freien Lösung TMA-SO<sub>4</sub> eingesetzt. In Cl<sup>-</sup>-freier Lösung hyperpolarisierten die Zellen und ihre Spontanaktivität wurde verstärkt. In Anwesenheit von TMA<sup>+</sup> waren die Zellen anhaltend depolarisiert. Nach Wiederrückgabe des extrazellulären Cl<sup>-</sup> trat eine transiente Hyperpolarisation auf.

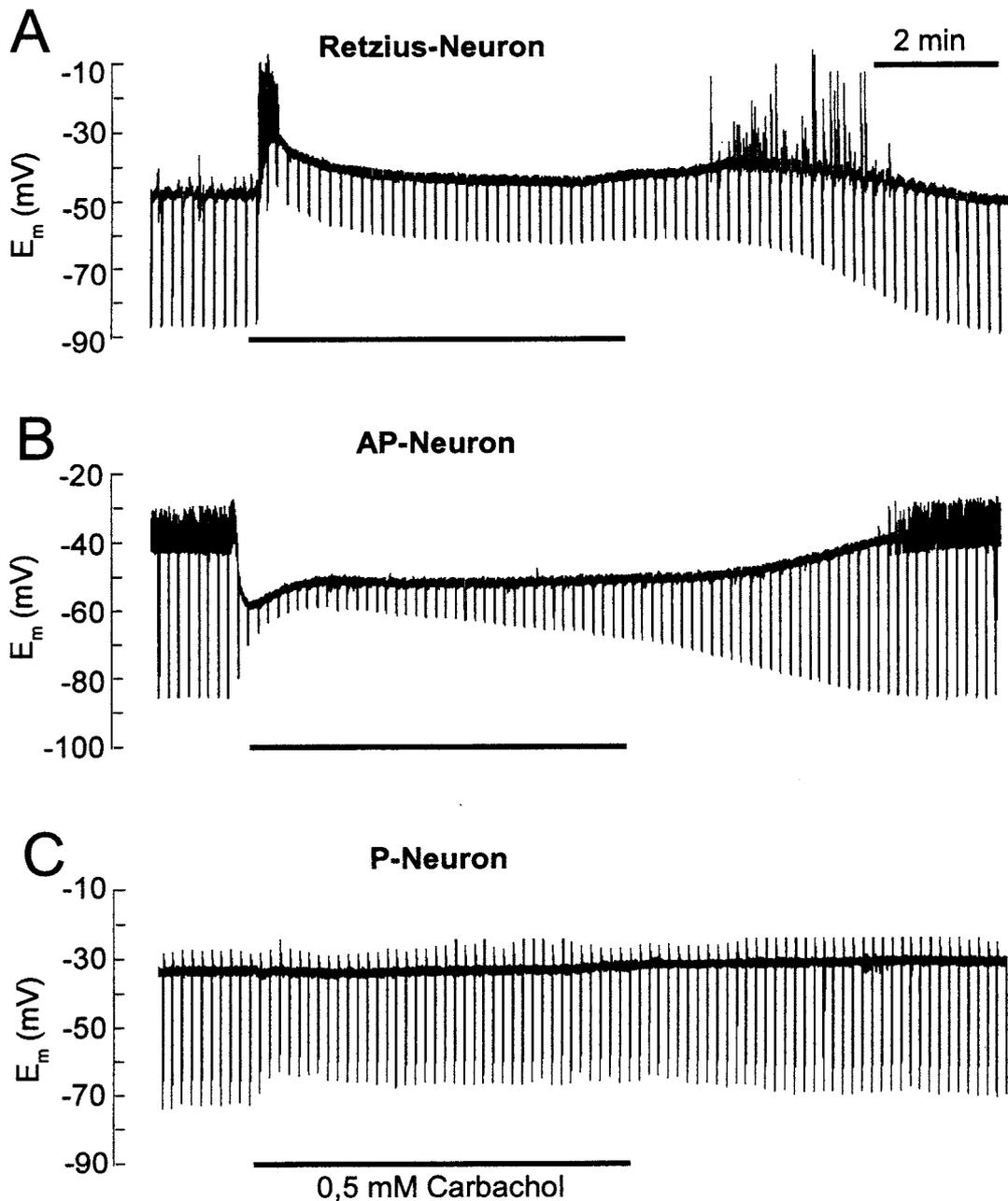
C) TMA<sup>+</sup>-Aufnahme und E<sub>m</sub> wurden weder durch extrazelluläre Ansäuerung (pH 6,2) noch durch extrazelluläre Alkalisierung (pH 8,6) beeinflusst.



**Abb. 33:** Wirkung von TMA<sup>+</sup> auf  $E_m$  von Retzius-, P-, N1-, AP- und Leydig-Neuronen  
 A) Registrierbeispiele von  $E_m$ -Antworten der verschiedenen Neuronen auf die fünfminütige Applikation von 5 mM TMA<sup>+</sup>. Die TMA<sup>+</sup>-induzierten transienten  $E_m$ -Änderungen sind durch gefüllte Kreise markiert, die anhaltenden am Ende der TMA<sup>+</sup>-Applikation durch offene Kreise.  
 B) Abhängigkeit der TMA<sup>+</sup>-induzierten  $E_m$ -Änderungen vom  $E_m$  vor der TMA<sup>+</sup>-Applikation. Die gefüllten Kreise kennzeichnen die transienten  $E_m$ -Änderungen, die offenen Kreise die anhaltenden  $E_m$ -Änderungen (siehe A).



**Abb. 34:** Wirkung von TMA<sup>+</sup> auf  $E_m$  und  $R_{\text{Input}}$  von Retzius-, AP- und P-Neuronen  
 $R_{\text{Input}}$  wurde anhand der  $E_m$ -Verschiebung ermittelt, die durch Injektion eines negativen Strompulses hervorgerufen wurde (Retzius: -3 nA, AP und P: -1 nA, Pulsdauer 1 s, Pulsabstand 10 s). In Gegenwart von 5 mM TMA<sup>+</sup> nahm  $R_{\text{Input}}$  bei den drei Neuronen zunächst rasch ab und später wieder langsam zu. Bei Retzius- und AP-Neuronen war diese Erholung während der zehnminütigen Applikationsdauer nur partiell (A,B), bei P-Neuronen dagegen vollständig (C). Bei Retzius- und AP-Neuronen kehrte  $R_{\text{Input}}$  jedoch nach Auswaschen des TMA<sup>+</sup> innerhalb weniger Minuten auf den Ausgangswert zurück.



**Abb. 35:** Wirkung von Carbachol auf  $E_m$  und  $R_{Input}$  von Retzius-, AP- und P-Neuronen  
 Bei Retzius-Neuronen verursachte Carbachol eine schnelle Abnahme von  $R_{Input}$ , die über die Applikationsdauer konstant blieb (A). Bei AP-Neuronen nahm  $R_{Input}$  ebenfalls ab, stieg aber nachfolgend wieder langsam an (B). P-Neuronen antworteten mit einer geringen Abnahme von  $R_{Input}$ , die jedoch konstant blieb (C). Alle Effekte waren nach Auswaschen des Carbachols innerhalb von einigen Minuten vollständig reversibel. Zur Bestimmung von  $R_{Input}$  siehe Abb. 34.



# Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schlue für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für sein Verständnis und Unterstützung in dieser Zeit sehr herzlich danken.

Herrn Dr. P.W. Dierkes möchte ich für seine intelligenten und hilfreichen Ideen sowie für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft ganz besonders danken.

Herrn Dr. P. Hochstrate danke ich für die theoretische und zeitintensive Unterstützung während dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich S. Durry für die Unterstützung in den elektrophysiologischen Messungen danken sowie zusammen mit C. Roderigo für die Hilfe bei der Präparation der Versuchstiere.

S. Trosiner, H. J. Wüsten, P. Coulon und V. Wende möchte ich für die freundliche und stetige Hilfsbereitschaft in vielen Bereichen dieser Arbeit danken.

Frau H. Horn möchte ich für die Unterstützung in den fotografischen Arbeiten danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft, die mir in dieser Zeit zuteil wurde.

Herrn Prof. Dr. K. Lunau danke ich für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt hat. Besonders möchte ich mich bei Sarah Nurkanovic für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.



## **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 einer ähnlichen Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.

Düsseldorf, den 21. Dezember 2004

Guido Klees