

Aus der Neurologischen Klinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Freund

Enzephalopathie bei Ahornsirupkrankheit:
Neurophysiologische Effekte
von
Leuzin und α -Ketoisocapronsäure

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Philipp Görtz

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Dekan Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Referent: Prof. Dr. med. Mario Siebler

Koreferent: Univ.- Prof. Dr. med. Udo Wendel

1	Einleitung	1
1.1	Die metabolische Enzephalopathie der Ahornsirupkrankheit	1
1.1.1	<i>Klinisches Erscheinungsbild</i>	1
1.1.2	<i>Pathologische Merkmale</i>	4
1.1.3	<i>Änderungen metabolischer Prozesse</i>	5
1.1.4	<i>Pathoneurophysiologie</i>	6
	Hypothesenbildungen und experimentelle Zielsetzungen	7
1.3	Experimenteller Lösungsansatz	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Biologisches Model	9
2.1.1	<i>Primäre dissoziierte Neuronen des Hippocampus und Cortex</i>	9
2.1.2	<i>Primäre Astrozytenkulturen</i>	9
2.2	Neurophysiologische Techniken	10
2.2.1	<i>Elektrophysiologische Ableittechniken</i>	10
2.2.2	<i>Messung spontaner intrinsischer neuronaler Aktivität</i>	12
2.2.3	<i>Bestimmung der Ruhe- und Aktionspotenziale</i>	14
2.2.4	<i>Bestimmung der neuronalen Natriumstrominaktivierungskurve</i>	14
2.2.5	<i>Membranströme Liganden-gesteuerter Ionenkanäle</i>	15
2.3	Material	17
2.3.1	<i>Allgemeine Chemikalien</i>	17
2.3.2	<i>Kultur- und Nährmedien</i>	17
2.3.3	<i>Lösungen für die elektrophysiologischen Messungen</i>	17
3	Ergebnisse	19
3.1	Leuzin und KIC reduzieren die spontane Netzwerkaktivität	19
3.1.1	<i>Einfluss von Leuzin und KIC auf die Rate spontaner Aktionspotenziale</i>	19
3.1.2	<i>Einfluss von Leuzin und KIC auf Oszillationen im neuronalen Netzwerk (Aktivitätszustand II)</i>	20
3.1.3	<i>Einfluss des Konzentrationsquotienten von Leuzin und KIC auf die spontane neuronale Netzwerkaktivität</i>	22
3.2	Das Ruhepotenzial neuraler Zellen bleibt unter Leuzin und KIC konstant	23
3.2.1	<i>Astrozyten</i>	24

3.2.2	<i>Neuronen</i>	25
3.3	Ströme neuronaler Ionenkanäle bleiben unter Leuzin und KIC unverändert	26
3.3.1	<i>Spannungsabhängige Natriumleitfähigkeit</i>	26
3.3.2	<i>Liganden-gesteuerte Ionenkanäle</i>	29
3.3.3	<i>Glutamat- und NMDA-aktivierte Membranströme</i>	31
3.3.4	<i>GABA-aktivierter Membranstrom</i>	34
3.3.5	<i>Glyzin-aktivierter Membranstrom</i>	35

4 Diskussion

37

4.1	Die zentrale Rolle des präsynaptischen Leuzin-KIC Gleichgewichts in der Pathogenese der Ahornsirupkrankheit	38
4.2	Die Integrität von Neuronen bleibt unter dem Einfluss von Leuzin und KIC erhalten	41
4.3	Die astrozytäre Beteiligung an der Pathophysiologie der Ahornsirupkrankheit ist gering	42
4.4	Die klinische Kompatibilität mit den experimentellen Ergebnissen	43
4.5	Ausblick	44

5 Literaturverzeichnis

46

6 Erklärungen

54

7 Lebenslauf

55

8 Danksagung

56

<u>ABSTRACT: Enzephalopathie bei Ahornsirupkrankheit:</u>	
<u>Neurophysiologische Effekte von Leuzin und α-Ketoisocapronsäure</u>	
<u>Inauguraldissertation von Philipp Görtz</u>	
	57

1 Einleitung

1.1 Die metabolische Enzephalopathie der Ahornsirupkrankheit

1.1.1 *Klinisches Erscheinungsbild*

Metabolische Enzephalopathien sind relevante Erkrankungsbilder des klinisch neurologischen Alltags. Am häufigsten im Erwachsenenalter ist die mit einer Leberfunktionsstörung einhergehende hepatische Enzephalopathie (*Häussinger et al. 2000*), während im Kindesalter die Manifestation einer Enzephalopathie oft mit genetisch bedingten Stoffwechselkrankheiten verbunden ist (*Seymour et al. 1997, Velazquez et al. 2000*). Hierzu gehört die Ahornsirupkrankheit (MSUD), eine Enzymopathie, welche durch einen Defekt der Verzweigtkettigen-Ketosäuren-Dehydrogenase (Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase, BCKAD) gekennzeichnet ist.

Die MSUD wurde erstmals von *Menkes et al. (1954)* auf Grund von Gemeinsamkeiten im klinischen Bild einer progredienten akuten Enzephalopathie bei Neugeborenen beschrieben. Dabei deutete die Erkrankung eines Geschwisterpaares bei unauffälligen Schwangerschaftsverläufen erstmalig auf eine Erbkrankheit hin. Betroffene Neugeborene entwickeln sich in den ersten Lebenstagen regelgerecht. Danach manifestiert sich eine Enzephalopathie mit Hypo- und Areflexie, Rumpfhypotonie bei Muskeltonuserhöhung, cerebralen Krampfanfällen, respiratorischer Insuffizienz und anschließendem tiefem Koma. Durch vegetative Dysfunktion reduziert sich der Allgemeinzustand derart, dass unbehandelte Kinder nur wenige Wochen überleben. Auffällig und namensgebend ist der charakteristische süßliche Geruch des Urins, verursacht durch Sotolone, eine im Ahornsirup enthaltene Substanz (*Podebrad et al. 1999*). Die Inzidenz der MSUD beträgt in der kaukasischen Bevölkerung etwa 1:200000 wobei in einer mennonitischen Population eine Inzidenz von 1:760 erhoben wurde (*American Academy of Pediatrics 1996*).

Als auslösendes Agens der metabolischen Enzephalopathie bei MSUD isolierten *Westall et al. (1957)* aus Serum und Urin symptomatischer MSUD Patienten erhöhte Mengen der essenziellen verzweigtkettigen Aminosäuren (branched-chain amino acid, BCAA) Leuzin, Valin und Isoleuzin und die entsprechenden nach Transaminierung entstehenden α -Ketosäuren (branched-chain α -oxo acid, BCKA) α -Ketoisocaproinsäure (KIC), α -Ketoisovaleriansäure (KIV) und α -Keto- β -methylvaleriansäure (KMV). Ursache ist der autosomal rezessiv vererbte Defekt des an der inneren Mitochondrienmembran gelegenen

Enzymkomplexes BCKAD, der zur Akkumulation der BCAA durch fehlenden Abbau ihrer Transaminierungsprodukte, den BCKA führt (*Zhang et al. 1989, Patel und Harris 1995*). Etwa 50 verschiedene nachgewiesene Mutationen in den vier Untereinheiten der BCKAD können die enzymatische Aktivität unterschiedlich stark vermindern (*Danner und Doering 1998*). Klinisch wird die MSUD abhängig von der Aktivität der BCKAD in vier nicht gut abgrenzbare Phänotypen gegliedert:

- 1.) Die klassische Form mit 0% - 2%-iger BCKAD-Aktivität und massiver Erhöhung der BCAA im Urin und Serum mit Symptomen schon bei Neugeborenen.
- 2.) Die intermediäre Form mit 5% - 25%-iger BCKAD-Aktivität und chronisch moderater Erhöhung der BCKA, die zu geistiger Behinderung führen kann.
- 3.) Die intermittierende Form mit 2% - 40%-iger BCKAD-Aktivität und einer Erhöhung der BCAA im Serum bei zu hoher Proteinbelastung.
- 4.) Die thiaminabhängige Form, bei der die BCKAD-Aktivität durch Thiaminsubstitution angehoben werden kann (*Chuang et al. 1982*).

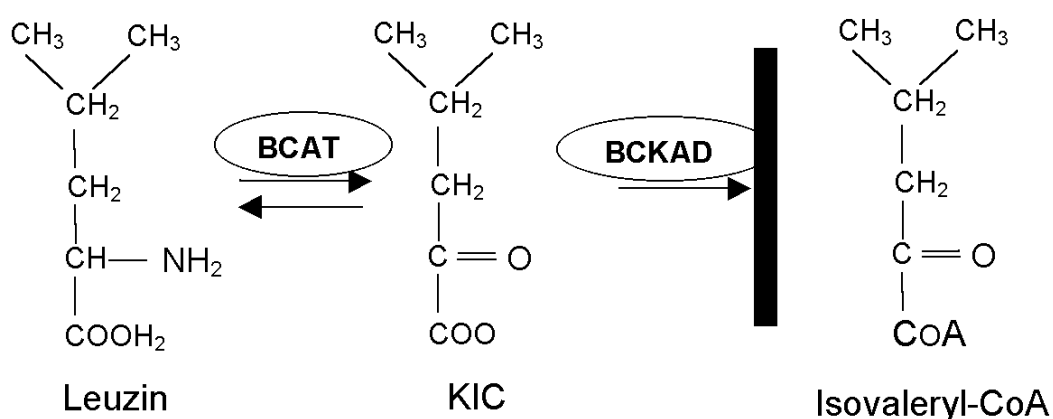


Abb. 1.1.) **Abbauweg der verzweigtkettigen Aminosäuren am Beispiel von Leuzin.** Der schwarze Balken markiert den Block im Abbauweg, der durch den Defekt der BCKAD zustande kommt. Ein Defekt der BCKAD bei der Ahornsirupkrankheit führt in diesem Fall zur unphysiologischen Zunahme von Leuzin und der entsprechenden Ketosäure KIC. (KIC = Ketoisocaproonsäure, BCAT = Verzweigtkettige-Ketosäuren-Aminotransferase, BCKAD = Verzweigtkettige-Ketosäuren-Dehydrogenase)

Der Abbau der BCAA wird nach der Transaminierungsreaktion durch die BCAT (Branched chain amino transferases) auf der Stufe der BCKA gestoppt (s. Abb. 1.1.). Der Körper ist nicht in der Lage die erhöhten BCAA und BCKA über andere Stoffwechselwege oder die Niere in wesentlichen Mengen zu eliminieren (*Schadewaldt und Wendel 1997*). Da BCAA und BCKA plazentagängig sind und intrauterin ausreichend eliminiert werden können, tritt beim Neugeborenen die metabolische Enzephalopathie erst nach der Geburt auf. Als untere Grenze für eine akute metabolische Enzephalopathie gilt eine Serumkonzentration

von 1 mmol/l Leuzin, wobei Serumwerte von >3 mmol/l Leuzin typisch bei Diagnosestellung sind. Die Serumnormalwerte sind in der Tabelle 1.1.) dargestellt. Bei MSUD Patienten beträgt die intracerebrale Konzentration an BCAA und BCKA etwa 1/3 der aktuellen Serumkonzentration (*Schwahn et al. 2000*). Der Konzentrationsquotient im Serum bei MSUD Patienten beträgt für KIC/Leuzin 1 und weicht damit deutlich vom Normalwert gesunder Probanden mit 0,31 für KIC/Leuzin ab (*Wendel et al. 1999b*).

	BCAA (mmol/l)			BCKA (mmol/l)		
	Leuzin	Valin	Isoleuzin	KIC	KIV	KMV
Mittelwert	0,134	0,24	0,07	0,04	0,02	0,03
SD	0,023	0,04	0,014	0,01	0,005	0,007

Tab. 1.1.) **Normalwerte für die BCAA und BCKA-Konzentrationen im Plasma** (nach *Wendel et al. 1999b*) (SD= Standardabweichung)

Für die Langzeitbehandlung gelangen *Westall (1963)* und *Snyderman et al. (1964)* erste therapeutische Erfolge durch eine konsequente Diät bei denen die BCAA der Nahrungsproteine nur in solchen Mengen zugeführt wurden, wie sie für die endogene Proteinsynthese im Zuge des Wachstums benötigt wurden. Dadurch lassen sich die Serumspiegel der BCAA im Bereich der Normalwerte einstellen. Die diätetische Langzeitbehandlung ist gut etabliert und es ist bei guter Compliance im wesentlichen mit normaler körperlicher und geistiger Entwicklung zu rechnen. Eine latente Gefährdung des Patienten ergibt sich durch erhöhte Werte von Serumleuzinspiegeln (0,75 mmol/l – 1 mmol/l) die ohne akute cerebrale Symptome auftreten können, im langfristigen Verlauf jedoch zu unspezifischen periventrikulären Myelinisierungsstörungen führen (*Treacy et al. 1992*). Da eine Konzentrationsschwelle der BCAA und BCKA für eine akute oder chronische cerebrale Schädigung nicht bekannt ist, wird empfohlen deren Spiegel so normnahe wie möglich zu halten.

Katabole Krisen bei MSUD Patienten können durch erhöhten Abbau körpereigener Proteine zu einem Anstieg der Serum und Liquorkonzentrationen der BCAA und BCKA führen. Daraus resultiert eine metabolische Enzephalopathie mit den Anfangssymptomen Erbrechen, Ataxie, Halluzinationen und Unruhe. In dieser Situation zielt die Therapie auf eine Reduktion der überschüssigen BCAA und BCKA ab. Oft genügt die Stimulation einer anabolen Stoffwechsellaage mit Insulin und hochkalorischer Ernährung, wodurch der Einbau der BCAA in körpereigene Proteine induziert wird (*Thompson et al. 1990, Biggemann et al. 1993*). Bei massiven Entgleisungen des Stoffwechsels muss durch Hämodialyse, Hämofiltration oder Austauschtransfusion eine schnelle Reduktion der BCAA und BCKA

eingeleitet werden (*Wendel et al. 1980, 1982*). Bei adäquater Therapie wird so eine komplette Restitution ohne bleibende Schädigung erreicht. Eine kausale Therapie des molekulargenetischen Defektes eröffnet sich durch Lebertransplantate von lebergesunden Spendern mit BCKAD-Aktivität (*Wendel et al. 1999a*).

Die genetisch codierte Dysfunktion der BCKDA hat keinen direkten neurotoxischen Einfluss auf das zentrale Nervensystem, denn für die Ausprägung des klinischen Bildes der MSUD ist nicht die Transaminierungsaktivität der BCKAD, sondern die Erhöhung der Serumkonzentrationen der BCAA und BCKA entscheidend (*Bodner-Leidecker 2000*). Für die experimentellen Untersuchungen wurde daraus abgeleitet, dass keine neuronalen Zellen mit BCKDA-Defekt notwendig sind um die MSUD spezifischen Störungen zu detektieren. Bei den verwendeten neuronalen Zellen mit Wildtypeeigenschaften sollte nach einer Konzentrationserhöhung von BCKA und BCAA eine Dysfunktion messbar sein.

1.1.2 Pathologische Merkmale

Bei einem MSUD Patienten wurde im Rahmen einer metabolischen Dekompensation kernspintomographisch ein diffuses cerebrales Ödem nachgewiesen, dass sich innerhalb von 14 Tagen nach erfolgreicher Therapie zurückbildete (*Felber et al. 1993*). *Riviello et al. (1991)* fanden nach Autopsie bei vier nach Dekompensation verstorbenen MSUD Patienten als Todesursache ein massives Hirnödem vor. Es ist nicht geklärt, ob das cerebrale Ödem durch eine direkte Schädigung der Neuroglia auf Grund erhöhter Konzentrationen der BCAA und BCKA verursacht wird. Morphologische Änderungen an Neuronen bei betroffenen Patienten sind bisher nicht beschrieben worden. An Glioblastomzellen von Mäusen wurde beobachtet, dass erhöhte Konzentrationen von Leuzin und KIC eine Apoptose induzieren können (*Jouvet et al. 2000*). Die Relevanz neuronaler Apoptose als Ursache einer reversiblen Enzephalopathie ist jedoch kritisch zu beurteilen.

Bereits die ersten Untersuchungen der metabolischen Enzephalopathie bei MSUD galten morphologischen Veränderungen des Gehirns. *Menkes et al. (1954)* beschrieben eine Reduktion der weißen Substanz bei verstorbenen MSUD Patienten. Seitdem wurde die pathophysiologische Relevanz dieser Beobachtung kontrovers diskutiert. Bei Poll-Hereford Kälbern, die aufgrund eines BCKAD-Defektes als Tiermodell für die MSUD genutzt werden können, wurden Myelinisierungsstörungen nachgewiesen (*Dodd et al. 1992*). Im Gegensatz zum Menschen trat hier eine cerebrale Schädigung schon intrauterin auf. In kernspintomographischen Untersuchungen bei MSUD Patienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass das klinische Bild mit Myelinisierungsstörungen korreliert (*Mueller K et al. 1993*).

Hervorzuheben ist hier, dass die reversible akute Enzephalopathie bei MSUD Patienten durch die Myelinisierungsstörungen verursacht werden kann, die sich teilweise erst nach Jahren entwickeln. Daher muss man bei der MSUD die Ursache der akuten Enzephalopathie von den beschriebenen Langzeitschädigungen der Myelinisierung abgrenzen. In dieser Arbeit sollte hauptsächlich die Wirkung der Metabolite erfasst werden, die das akute klinische Bild der akuten Enzephalopathie verursacht.

1.1.3 Änderungen metabolischer Prozesse

In einer Reihe von Arbeiten wurde versucht, die Enzephalopathie der MSUD mit Interaktionen von Leuzin und KIC und zellulären Stoffwechselprozessen zu erklären. So wurde von *Land et al. (1976)* an isolierten Mitochondrien eine Störung der mitochondrialen Pyruvat-Hydroxybutyrat Translokase durch KIC beschrieben, die zu einer Hemmung des Zitratzyklus führt. *Zielke et al. (1997)* hingegen zeigten an in vivo Messungen im Rattengehirn, dass es durch Erhöhung der KIC Konzentration zu einer erhöhten Oxidation des exzitatorisch wirkenden Neurotransmitters Glutamat und zu einem resultierenden erhöhten Umsatz im Zitratzyklus kam. Trotz dieser teilweise widersprüchlichen Ergebnisse wird deutlich, dass die Transaminierungsreaktion zwischen Leuzin und Glutamat eng an den Umsatz von Leuzin und KIC geknüpft ist. (s. Abb. 1.2.). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Glutamat als Substrat des inhibitorischen Neurotransmitters GABA dient (*Waagepetersen et al. 1999*).

Eine mögliche funktionelle Störung neuraler Zellen durch eine Beeinflussung der Transaminierungsreaktion der Ketosäure α -Ketoglutarat zum Neurotransmitter Glutamat durch erhöhtes Leuzin und KIC ist von *Yudkoff et al. (1994)* diskutiert worden. Er postulierte einen Leuzin-Glutamat Zyklus im Gehirn, bei dem das Paar Leuzin und KIC als Aminogruppenpuffer für Glutamat und α -Ketoglutarat fungiert und so zur Regulation des Neurotransmitters beiträgt. *Kanamori et al. (1998)* folgerten aus NMR Studien am Gehirn von Ratten, dass Leuzin der wichtigste Aminogruppendonor für die Glutamatsynthese sei. Bei erhöhten Leuzinkonzentrationen im Gehirn von Poll-Hereford Kälbern mit MSUD konnten *Dodd et al. (1992)* jedoch eine Reduktion der Glutamatkonzentration nachweisen. Es ist bisher nicht bestimmt worden, ob Leuzin und KIC durch Einfluss auf den Glutamatmetabolismus neurale Funktionen verändern.

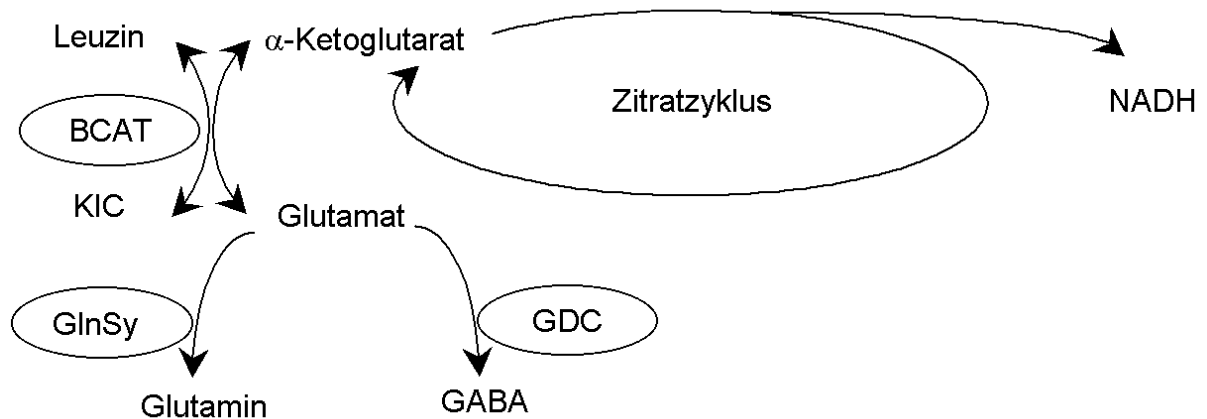


Abb. 1.2.) **Die Transaminierungsreaktion von Leuzin/KIC und α -Ketoglutarat/Glutamat steht im engen Zusammenhang mit verschiedenen Stoffwechselwegen.** Glutamat dient als Substrat für die GABA und Glutamin Synthese und stellt dem Zitratzyklus Reduktionsäquivalente bereit. (GlnSy = Glutaminsynthetase, GDC = Glutamatdecarboxylase, BCAT = Verzweigtkettige Ketosäure Aminotransferase, GABA = Gammaaminobuttersäure, NADH = Nikotinamid Adenin Dinukleotid)

1.1.4 Pathoneurophysiologie

Die unterschiedlichen neurologischen Symptome von kognitiven Einschränkungen bis hin zu epileptischen Anfällen, die die erhöhten Metabolite der MSUD hervorrufen, veranschaulichen die Problematik anhand klinischer Symptome Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu ziehen. *Snyderman et al. (1964)* fanden in metabolischen Belastungsversuchen mit MSUD Patienten, dass Leuzin eine zentrale Rolle bei der Auslösung der klinischen Symptomatik spielt, da nach Aufnahme von Leuzin und dem folgenden Anstieg von KIC im Serum die Patienten innerhalb weniger Stunden eine massive neurologische Symptomatik entwickelten. Klinische elektrophysiologische Daten zur Wirkung der BCAA und BCKA an Hirnzellen sind durch Elektroenzephalogramme (EEG) an Patienten mit MSUD ermittelt worden (*Korein et al. 1994*). Dabei konnten unspezifische EEG Änderungen abgeleitet werden, wobei die stärksten Einflüsse unter Belastung mit Leuzin gemessen wurden. Geht man davon aus, dass die klinische Symptomatik und die Änderungen im EEG auf neurophysiologische Mechanismen zurückzuführen sind, so ist bisher nicht geklärt, ob die primäre Störung von Astrozyten oder den Neuronen bzw. deren synaptischer Interaktion verursacht wird (s. Abb. 1.3.). Denn Astrozyten tragen durch die Bereitstellung von Glukose und der Regulation von Neurotransmittern erheblich zur Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion bei (*Forsyth 1996, Hertz et al. 1999*).

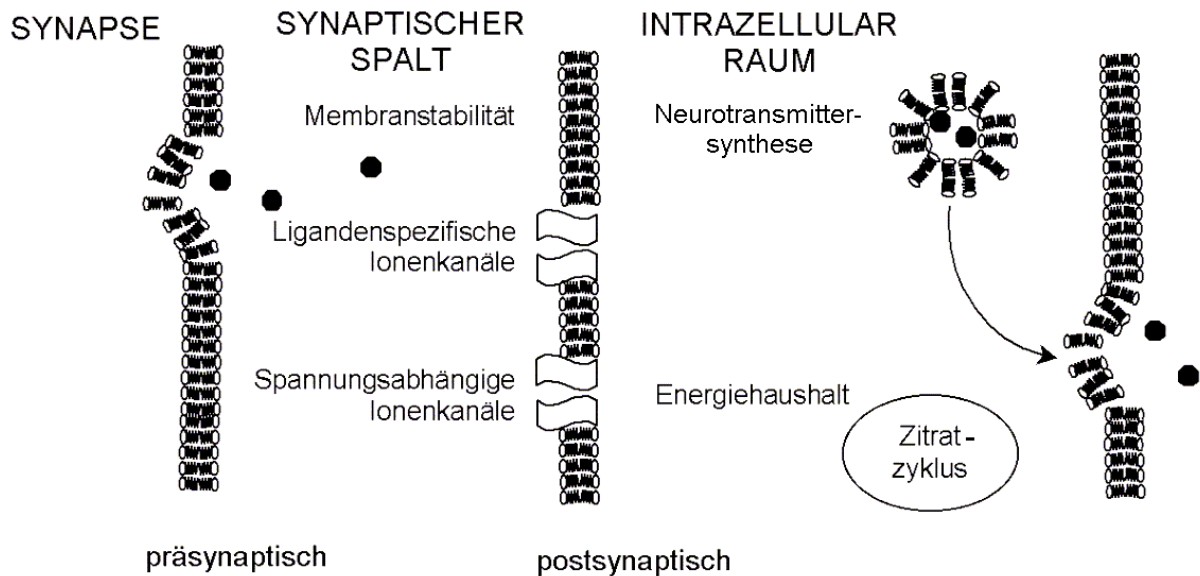


Abb. 1.3.) **Schematische Darstellung der denkbaren neuronalen Wirkorte der erhöhten Konzentrationen der BCAA und BCKA.** Eine präsynaptische Modulation der Neurotransmitterausschüttung, eine Interaktion mit der postsynaptischen Membran und deren Ionenkanälen oder eine intraneuronale Änderung des Stoffwechsels könnten der klinische Symptomatik der MSUD zugrunde liegen. (● = Neurotransmitter)

1.2 Hypothesenbildungen und experimentelle Zielsetzungen

Ziel der Arbeit ist es, zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen neuraler Dysfunktion durch metabolische Störung bei der MSUD beizutragen und Erklärungsmodelle zur klinischen Symptomatik zu erarbeiten.

Die Korrelation der Ausprägung der Enzephalopathie mit der Plasmakonzentration von Leuzin und KIC und die schnelle Zeitkinetik der Symptomatik beim An- und Abfluten der Metabolite lassen eine direkte Interaktion mit dem neuralen Gewebe vermuten. Diese könnte durch Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften von Neuronen und/ oder von Gliazellen zustande kommen.

1.3 Experimenteller Lösungsansatz

Zum Screening des möglichen Wirkortes der Aminosäuren Leuzin und ihrer entsprechenden Ketosäure KIC wurde in einem **ersten Schritt** die elektrophysiologische Auswirkung der Stoffe auf die globale Netzwerkaktivität kultivierter Neuronen des Hippocampus gemessen. Methodisch wurde ein auf einem theoretischen Modell beruhender Ansatz kooperativer Eigenschaften neuronaler Netzwerke genutzt (*Rose et al. 1995, Mager 2000*). Das von *Mager (2000)* weiterentwickelte Modell bietet den Vorteil, dass globale Eigenschaften der funktionellen Netzwerkintegrität und deren Änderung getestet werden können. Damit sind sowohl Störungen der Membranerregbarkeit des Einzelneurons als auch der synaptischen Übertragungsmechanismen zwar unspezifisch, aber sensitiv untersuchbar.

Das gewählte Zellkulturmodell mit primären Neuronen und Astrozyten von Ratten ist gut etabliert und elektrophysiologisch charakterisiert. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (*Hamill et al. 1981, Sakmann und Neher 1995*) sind sowohl Ruhemembranpotenziale, Aktionspotenziale als auch Ionenströme einzelner Zellen gut messbar (*Köller et al. 1990a*). So konnten für die hepatische Enzephalopathie relevante Störungen der Astrozyten über die intrazelluläre Kaliumakkumulation durch Ammonium (*Allert et al. 1998*) beschrieben werden. Die Neuronen exprimieren spannungsabhängige Natrium- und Kalium-Kanäle, sowie Glutamat-, GABA- und Glyzin-Rezeptoren (*Siebler et al. 1993, Köller et al. 1990b*). In einem **zweiten Schritt** wurden die bekannten neuronalen Eigenschaften unter dem Einfluss von erhöhten extrazellulären Konzentrationen von Leuzin und KIC bestimmt.

In einem **dritten Schritt** wurde eine Abschätzung der postsynaptischen Wirkung von Leuzin und KIC untersucht und dazu die Technik der somatischen Kurzzeitapplikation von Neurotransmittern (GABA, Glyzin, Glutamat, NMDA) genutzt.

2 Material und Methoden

2.1 Biologisches Model

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden primär dissoziierte Zellkulturen embryonaler Wistar-Ratten verwendet. Die trächtigen Tiere entstammten der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

2.1.1 Primäre dissoziierte Neuronen des Hippocampus und Cortex

Die Neuronen der Region des Hippokampus wurden am 18. Embryonaltag und die des Kortex am 15. Embryonaltag, dem Zeitpunkt des postmitotischen Stadiums entnommen (Bayer und Altmann 1990, Dichter 1978). Trächtige Tiere wurden nach Äthernarkose getötet, Föten dekapitiert und die jeweiligen Hirnregionen präpariert und in Kulturmedium gesammelt. Die Entnahme und Aufarbeitung wurde nach der Methode von Müller und Seifert (1982) durchgeführt. In Trypsin/EDTA Lösung (8 min bei 37° C) wurde der Gewebeverband gelöst, vorsichtig trituiert und nach Proteaseblockung mit 10% FKS zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment aus neuronalem Zellgewebe resuspendiert und durch Gaze mit einer Porengröße von 30 µm gefiltert. Die Hippocampusneuronen wurden nach Konzentrationsbestimmung mit Fluoresceindiacetat in Zelldichten von $1,2 \times 10^5$ Zellen/cm² (Cortexneuronen $1,6 \times 10^5$ Zellen/cm²) auf Deckgläsern in Multiwellplatten ausgesät und bei 37° C und einer CO₂ Konzentration von 10% in von Astrozyten konditioniertem Kulturmedium inkubiert. Die Deckgläser waren nach PDL-Beschichtung (0,1 mg/ml) für 24 h bei 4° C mit Laminin (4 µg/ml) für 24 h bei 4° C inkubiert worden. Die Zellen zeigten ein kontinuierliches Auswachsen von Neuriten und entwickelten nach wenigen Tagen ein dichtes axonales Netzwerk. Immunhistochemische Färbungen von Stichel und Müller (1992) zeigten, dass bei ca. 70% der Zellen das neuronenspezifische Protein MAP-2 nachweisbar ist. Für die elektrophysiologischen Messungen am Tage 8–12 nach Aussaat wurden Neuronen verwendet, die nach intrazellulärer Stromapplikation Aktionspotenziale generierten.

2.1.2 Primäre Astrozytenkulturen

Astrozyten wurden von postnatalen Ratten gewonnen. Nach Dekapitation wurden die Gehirne präpariert, mechanisch zerkleinert und die Zellsuspension durch Gaze mit 60 µm Porengröße gefiltert. In DMEM + 10% FKS wurden die Zellen kultiviert und nach 10 Tagen mit Ausbildung eines konfluenten Monolayers der Überstand nach 24 h auf einem Inkubationsschüttler verworfen, da er hauptsächlich aus neuronalen Zellen bestand. Nach anschließender 10-minütiger Trypsinierung wurden die Zellen passagiert. Die so gewonnenen Kulturen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden sie elektrophysiologisch untersucht. Mit dieser

Präparationsmethode gewinnt man Astrozytenkulturen, in denen mehr als 95% der Zellen den astrozytenspezifischen Marker GFAP exprimieren (*Stichel und Müller 1992*).

2.2 Neurophysiologische Techniken

2.2.1 Elektrophysiologische Ableittechniken

Messplatz:

Zur Messung wurden die Zellkulturen auf Deckgläsern mit Standardbadlösung in Petrischalen als Messkammer überführt. Es wurde bei Raumtemperatur und Raumluftumgebung gemessen. Zur optischen Kontrolle wurde ein inverses Phasenkontrastmikroskop (CK 2 Olympus, Tokio, Japan) und zur Justierung der Patchpipette an die Zellmembran ein Schrittmotor betriebener Mikromanipulator (Science Products, Hofheim, Deutschland) genutzt. Durch Anlegen eines Unterdrucks an die Messpipette wurde die Zellmembran an die Pipette angesaugt. Mit den dadurch erzielbaren Widerständen (Gigaohm) sind kleinste Membranströme messbar (Cell-attached-Modus) und damit auch spontane Aktionspotenziale zu detektieren, ohne Einfluß auf die intrazellulären Ionenverhältnisse zu nehmen. Durch kurze Erhöhung des Unterdrucks wird die Membran unter dem Patch aufgerissen. Dadurch entsteht ein Zugang zum Inneren der Zelle, der eine direkte Messung der intrazellulären Spannung ermöglicht (Whole-Cell-Modus).

Durch Installation einer zusätzlichen Pipettenspitze, welche mit der Messlösung, z.B. Transmittern gefüllt ist, konnten durch gesteuerte Druckluftinjektion in die Pipette Stoffe lokal an die Zelle appliziert werden. Der Austausch der gesamten Badlösung wurde durch einen Zulauf über ein Schlauchsystem und Abpumpen mit einer Kolbenpumpe ermöglicht. Der Austausch der gesamten Badlösung war damit innerhalb 5 Sekunden möglich. Das ganze Messsystem war auf einem erschütterungsarmen Tisch mit Druckluftfederung gelagert.

Um das elektrische Hintergrundrauschen zu minimieren, war der Messplatz mit der Messpipette und dem Vorverstärker in einem faradayschen Käfig abgeschirmt. Der Vorverstärker war direkt am Mikromanipulator montiert und trug den Pipettenhalter, der über einen chlorierten Silberdraht einen elektrischen Kontakt zur Pipettenlösung der Patch-Pipette ermöglichte. Das elektrische Signal wurde über den Verstärker EPC-7 (List, Darmstadt, Deutschland) an die peripheren Geräte weitergeleitet. Dabei diente das Oszilloskop (Nicolet 4094, Kleinostheim, Deutschland) der Echtzeitmessung und ermöglichte über einen internen Speicher die Erfassung der Messsignale von wenigen Sekunden mit hinreichender Auflösung. Die gespeicherten Daten konnten über einen Plotter (Hewlett-Pakard 7470A) ausgedruckt werden. Über einen Analog/Digital-Wandler war eine Erfassung mit IBM-kompatiblen Personalcomputern, die eine genügend große Speicherkapazität für Messreihen

von mehreren Minuten besitzen, möglich. Messimpulse konnten über ein externes manuelles Steuerungsgerät oder mit Hilfe von eigens entwickelten Computerprogrammen über einen externen Steuerungseingang am Verstärker eingespeist werden. (s. Abb. 2.1.)

Patchpipetten:

Die verwendeten Pipetten wurden mit einem horizontalen Puller (Brown-Flaming Micropipette Puller P-87, Sutter Instruments) aus Borosilikatglaskapillaren (GC150-15, Clark Electromedical Instruments) gezogen und bei einem Widerstand von 5-7 M Ω in Standardbadlösung verwendet.

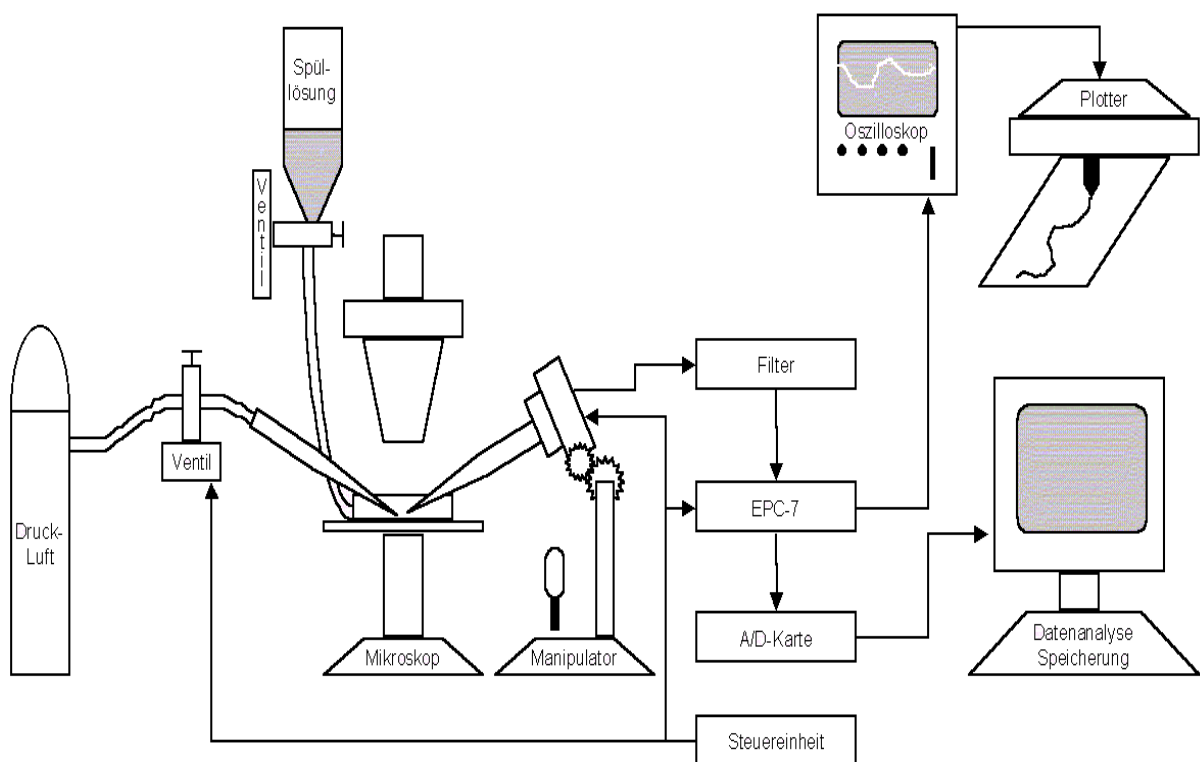


Abb. 2.1.) **Patch-clamp Messplatz:** Schematischer Aufbau mit lokaler Applikationsvorrichtung und peripheren Analysegeräten

2.2.2 Messung spontaner intrinsischer neuronaler Aktivität

8-12 Tage alte Kulturen von primären Hippocampusneuronen bilden synaptisch verknüpfte neuronale Netzwerke aus. Diese sind bei hinreichender positiv rückgekoppelter Verknüpfung spontanaktiv, wodurch spontane synaptische Potenziale und Aktionspotenziale auftreten, die elektrophysiologisch registriert werden können. In den konventionellen Ableitungen ist die spontane Aktivität jedoch sehr inkonstant und je nach Präparation höchst unterschiedlich. Die Muster der Spontanaktivität unterliegen kooperativen Eigenschaften des neuronalen Netzwerkes (*Mager 2000*). Auf Grund theoretischer Betrachtungen weist die funktionelle neuronale Verknüpfung kritische Eigenschaften auf, die zu einer abrupten Änderung der Spontanaktivität führen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Eigenschaften genutzt, um Auswirkung der Testsubstanzen auf neuronale funktionelle Verbände zu untersuchen. Die synaptische Verknüpfungsstärke kann durch das extrazelluläre Ionenmilieu von Kalium, Magnesium und Calcium variiert werden. Eine Erhöhung der Calciumkonzentration führt über eine erhöhte Neurotransmitterausschüttung zu einer allgemeinen globalen Zunahme der synaptischen Übertragungseffizienz. Durch Verminderung der Magnesiumkonzentration werden NMDA-Kanäle sensitiviert, was zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit führt. Mit Erhöhung der Kaliumkonzentration wird das Ruhepotenzial dem Schwellenpotenzial angenähert. Dies führt zu einer erhöhten Erregbarkeit des Neurons. Gemäß der theoretischen Vorhersagen sind damit 3 stabile Netzwerkzustände einstellbar (Stadium I, II, III). Stadium I ist durch seltene oder fehlende spontane Aktionspotenziale gekennzeichnet. Im Stadium II treten regelmäßige hochfrequente Phasen mit Aktionspotenzialen auf. Diese sind gekennzeichnet durch periodische Membrandepolarisationen, die eine einfache Quantifizierbarkeit durch Bestimmung der Frequenz des oszillierenden Membranpotenzials ermöglichen. Die Spikerate des Stadiums I mit geringer Spikeaktivität und die Frequenz der periodischen Depolarisationen im Stadium II werden im Folgenden als Messgrößen für die Untersuchung des Einflusses von Leuzin und KIC auf neuronale Funktionen genutzt. Im Stadium 3 wird eine unkorrelierte hohe Spontanaktivität identifiziert (s. Abb. 2.2.). Eine Periodizität oder distinkte Merkmale sind nicht mehr vorhanden. Daher wurde der Aktivitätszustand III hier nicht als Messgröße genutzt.

Zur Testung der Substanzen wurde zunächst die Spontanaktivität vor und in 10-minütigen Intervallen nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC über einen Zeitraum von 40 Minuten aufgezeichnet. Um den Aktivitätszustand II zu induzieren wurde eine Magnesium-freie, „Oszillationslösung“ eingesetzt. Um eine Überlagerungen durch autonomes Spikeverhalten der Messzelle zu verhindern, wurde der intrazelluläre Natriumkanalblocker QX-314 in die Pipettenlösung appliziert. Nach Induktion des

Aktivitätszustandes II durch die Magnesium-freie Oszillationslösung wurden alle 5 min Leuzin und KIC in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetauscht. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde jedesmal für 5 min die Oszillationslösung eingebracht. So war es möglich die Wirkung von Leuzin und KIC sowohl alleine, als auch gemeinsam auf den neuronalen Aktivitätszustand II bestimmen. Die Messung der transienten Oszillationen erfolgte im Zeitraum von 1 min bis 3 min nach Wechsel der Badlösungen.

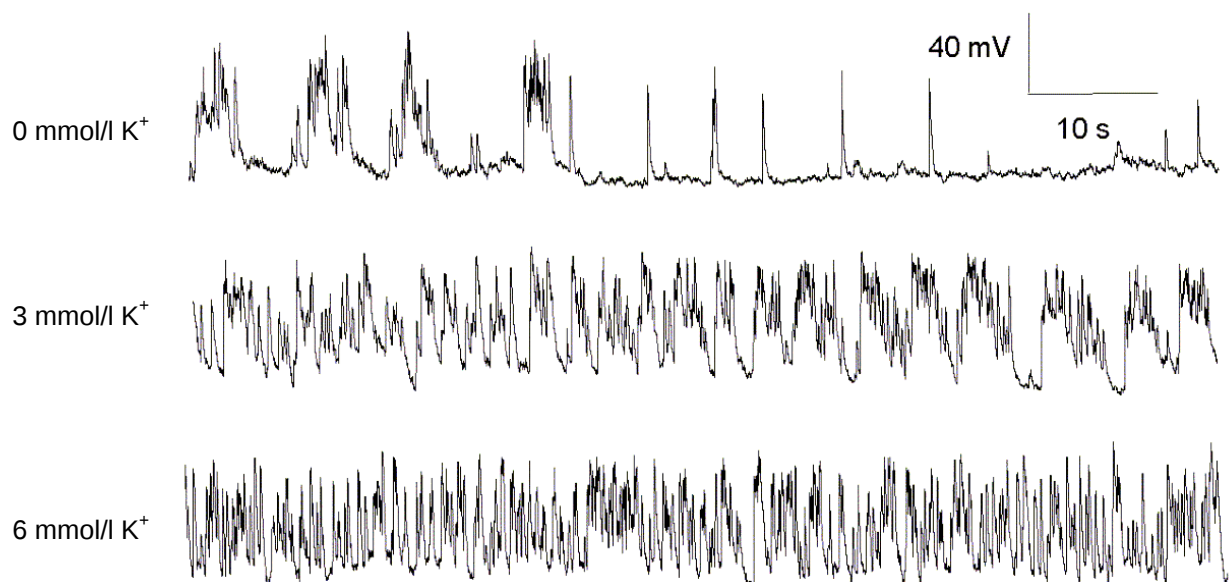


Abb. 2.2.) **Intrinsische spontane neuronale Aktivität. Die drei Aktivitätszustände eines neuronalen Netzwerkes.** (Tag 8 nach Präparation) Durch Erhöhung der K^+ -Konzentration nimmt die Aktivität eines neuronalen Netzwerkes zu. Das Ruhepotenzial eines einzelnen Neurons nähert sich dem Schwellenpotenzial an. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit zur Auslösung eines Aktionspotenzials. Die Spuren zeigen von oben nach unten den Aktivitätszustand I, II, III eines neuronalen Netzwerkes durch Ableitung des Membranpotenzials einer neuronalen Einzelzelle. Der Aktivitätszustand II zeigt ein Muster mit periodischen Depolarisationen von ca. 3 sec Dauer. Die Frequenz der Depolarisationen diente in dieser Arbeit als sensitive Messgröße um den Einfluss von Leuzin und KIC auf das neuronale Verhalten zu untersuchen. (Abbildung nach Mager 2000)

2.2.3 Bestimmung der Ruhe- und Aktionspotenziale

Für die Bestimmung der Ruhepotenziale der Neuronen und Astrozyten wurde der Current-clamp-Modus verwendet. Die Ruhepotenzialwerte in Standardbadlösung wurden direkt an der Messanzeige des EPC-7 abgelesen und protokolliert. Für Neuronen wurde nach 10 Minuten in Standardbadlösung eine Konzentration von 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC in Standardbadlösung eingestellt und alle 10 Minuten für weitere 40 Minuten gemessen. Für die Astrozyten wurde das Ruhepotenzial verschiedener Zellen vor und nach 1-stündiger Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC in Standardbadlösung gemessen.

2.2.4 Bestimmung der neuronalen Natriumstrominaktivierungskurve

Der Voltage-Clamp-Modus wurde zur Messung der induzierbaren neuronalen Ströme verwendet. Zur Messung wurden im Labor entwickelte Computerprogramme verwendet, mit denen das Neuron auf eine Spannung ausgehend von einem Haltepotenzial von -110 mV in $+10$ mV Schritten auf ein Haltepotenzial -20 mV geklemmt wurde. Nach Depolarisation auf $+20$ mV zur Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle wurde der induzierbare Natriumstrom gemessen (s. Abb. 2.3).

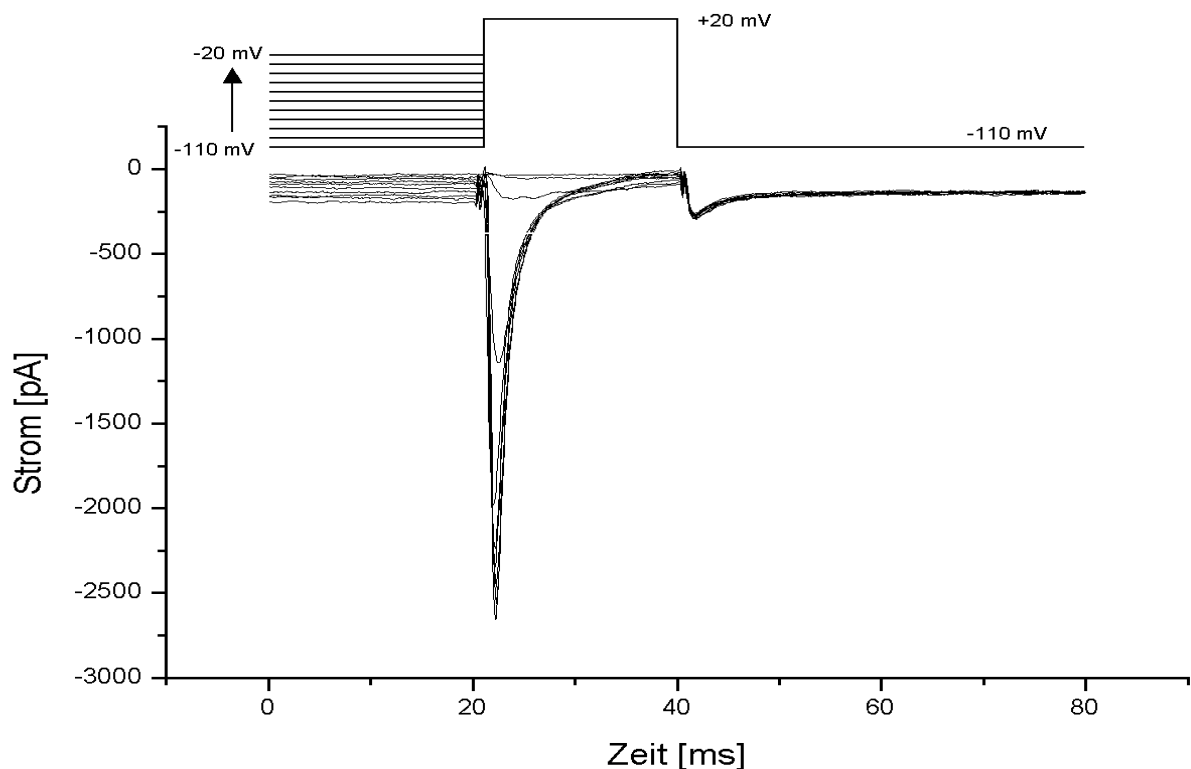


Abb. 2.3.) **Ableitung des spannungsinduzierten Natrium-Einwärtsstromes kortikaler Neuronen** (Tag 8 nach Präparation). Von einem Haltepotenzial bei -110 mV ausgehend, wurden die Neuronen in 10 mV Schritten depolarisiert und der Strom aufgezeichnet. Der maximale induzierbare Strom wurde zur Berechnung der Natriumstrom-Inaktivierungskurve bestimmt.

Um die Messreihen vergleichen zu können wurde die Boltzmann-Gleichung verwendet, mit der sich die spannungsabhängigen Natriumströme beschreiben lassen:

$$h_{\infty}(v) = 1 / (1 + \exp [(V_m - V_{1/2}) / k])$$

Beim Wert $V_{1/2}$ befinden sich die Hälfte der spannungsabhängigen Natriumkanäle in einem nicht aktivierbaren Zustand, k ist der Steigungsfaktor, V_m definiert das Haltepotenzial. Zur Bestimmung der Variablen $V_{1/2}$ und k diente das Programm „Sigmoidal fit“ aus Microcal Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Northhampton, MA USA), das eine Anpassung der Parameter der Boltzmann-Gleichung an die aus der Natriumstrominaktivierung ermittelte Messkurve ermöglichte.

2.2.5 Membranströme Liganden-gesteuerter Ionenkanäle

Um den Einfluss von Substanzen auf die Leitfähigkeit von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen zu bestimmen, müssen diese für wenige 10 Millisekunden an das Zellsoma appliziert werden, da die Kanäle sich sonst an die gesteigerte Konzentration adaptieren und so ihre Sensitivität verlieren würden.

Mit einem Mikromanipulator wurde eine mit der zu applizierenden Lösung befüllte Pipette in Zellsomanähe gebracht (Köller *et al.* 1990a). Diese war über Schläuche an ein elektrisch steuerbares Ventil eines Luftdrucksystems von 2 bar angeschlossen. Die zu messende Zelle wurde auf Spannungen von -80, -40, 0, +40 mV geklemmt. Mit Hilfe der Steuereinheit wurde die Messung kurz vor der Öffnung des Luftdruckventils gestartet. Durch den erhöhten Druck in der Applikationspipette wurde für einen festgelegten Zeitraum durch Ausströmen der Pipettenlösung die Konzentration der zu untersuchenden Substanz am Zellsoma massiv erhöht. Zur Beurteilung, ob Leuzin und KIC Liganden-gesteuerte Ströme induzieren können, wurden die Substanzen zusammen in einer Konzentration von 10 mmol/l in Standardbadlösung mit einer Applikationspipette für 10 msec an das mit unterschiedlicher Spannung geklemmte Neuron appliziert.

Um eine mögliche Hemmung von Leuzin und KIC an den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen nachweisen zu können, wurde die Konzentration der Neurotransmitter Glutamat, NMDA, Glyzin und GABA so gewählt, dass sie nicht im Überschuss vorlägen. Bei zu hoher Konzentration wäre eine mögliche kompetitive Hemmung von Leuzin und KIC an den Liganden-gesteuerten Kanälen zu gering ausgefallen, um sie detektieren zu können. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen der Neurotransmitter hergestellt und die Konzentration für die Untersuchung einer Hemmung durch Leuzin und KIC gewählt, die als erstes einen messbaren Liganden-gesteuerten Strom hervorrief (als Beispiel s. Abb. 2.4.).

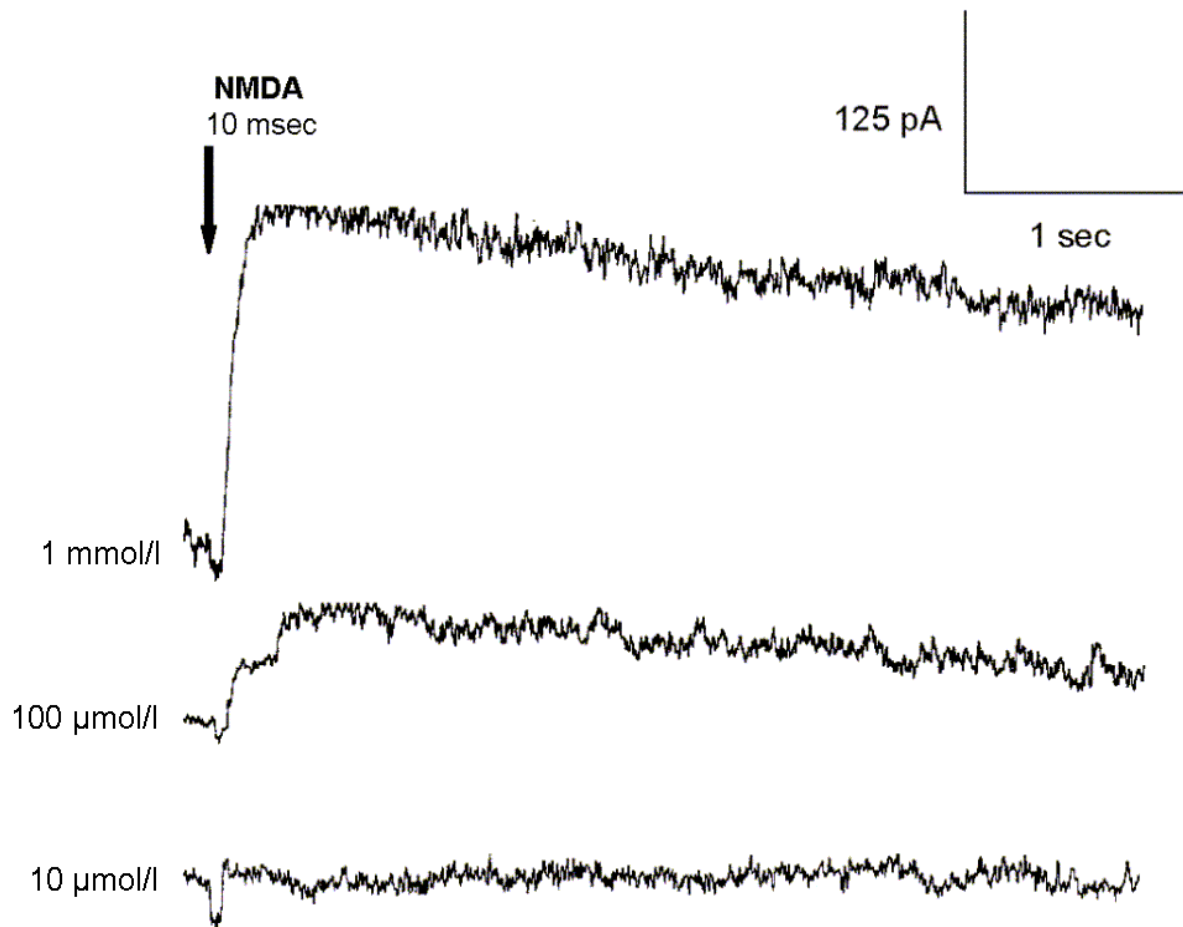


Abb. 2.4.) **Konzentrationsabhängige evozierte Ströme eines kortikalen Neurons nach Kurzzeitapplikation von 1 mmol/l, 100 µmol/l und 10 µmol/l NMDA für 10 msec bei einem Haltepotenzial von +40 mV.** (8 Tage in Kultur) Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der somanahen Applikation von NMDA. 100 µmol/l NMDA war die niedrigste Konzentration, mit der ein Strom auslösbar ist. Damit ist der sensitive Bereich für weitere Messungen bezüglich einer konkurrierenden Wirkung von Leuzin und KIC auf den NMDA Kanal definiert.

Nach Aufzeichnung der induzierten Liganden-gesteuerten Ströme durch somanahe Applikation des zu untersuchenden Neurotransmitters, wurde in Standardbadlösung dieselbe Zelle für 15 Minuten mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC in Standardbadlösung zusammen inkubiert und die Applikation wiederholt. Bei einer Hemmung der Liganden-gesteuerten Rezeptoren durch Leuzin und KIC wäre ein verminderter Stromfluss zu erwarten gewesen, eine Aktivierung hätte einen erhöhten Stromfluss gezeigt. Für den GABA-gesteuerten Ionenkanal wurde mit dem Antagonisten Bicucullin gezeigt, dass in diesem Messsystem eine kompetitive Hemmung möglich ist.

2.3 Material

2.3.1 Allgemeine Chemikalien

Von Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein): HAM's 12, Laminin, Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fötales Kälberserum (FKS), Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), Serum-freies Neurobasal Medium. Von Sigma-Aldrich (Deisenhofen): Poly-D-Lysin (PDL), Insulin, Glutamin, Progesteron, Natriumselenit, Transferrin, GABA, Glyzin, NMDA, Glutamat, TTX, QX-314, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, HEPES, Cäsiumchlorid, Magnesiumchlorid, Glukose. Von Boehringer (Mannheim) das Natriumsalz von α -Ketoisocapronsäure, Leuzin, Trypsin, EDTA

2.3.2 Kultur- und Nährmedien

Für die Messung der Aktivität eines neuronalen Zellverbandes war das Erreichen einer hohen synaptischen Dichte notwendig. Das Langzeitüberleben der Neuronen bis zu 16 Tagen wurde durch die Verwendung von konditioniertem Kulturmedium ermöglicht, bei dem Astrogliaulturen neurotrophe Faktoren in ein serumfreies Kulturmedium abgaben (*Schmalenbach und Müller 1993*). Dabei stimulieren Zelladhäsionsmoleküle von Astrozyten das Auswachsen von Neuriten (*Matthiessen et al. 1989*). Hippocampale Neuronen wurden unter Zusatz von serumfreien Neurobasal Medium mit B-27 Zusatz (Gibco), 0,5 mmol/l Glutamin und 25 mmol/l Glutamat kultiviert (*Brewer und Cotman 1989*). Körtikale Neuronen wurden in Dulbecco's modified Eagle-Medium mit N2-Zusatz verwendet (*Bottenstein und Sato 1979*): 75 % DMEM, 25% HAM's F12, 5 μ l/ml Insulin, 100 μ g/ml Transferrin, 5,2 ng/ml Natriumselenit, 16 μ g/ml Putrescin, 7 ng/ml Progesteron, 2 mmol/l L-Glutamin.

2.3.3 Lösungen für die elektrophysiologischen Messungen

Standardbadlösung:	150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl ₂ , 2.8 mmol/l CaCl ₂ , 2 mmol/l KCl, 10 mmol/l HEPES, 10 mmol/l Glukose, pH 7,4 mit NaOH eingestellt
Testlösung für Netzwerkaktivität:	150 mmol/l NaCl, 0 mmol/l MgCl ₂ , 1 mmol/l CaCl ₂ , 2 mmol/l KCl, 10 mmol/l HEPES, 10 mmol/l Glukose, pH 7,4 mit NaOH eingestellt
Standardpipettenlösung:	150 mmol/l KCl, 4 mmol/l MgCl ₂ , 1 mmol/l CaCl ₂ , 10 mmol/l EGTA, 10 mmol/l HEPES, pH 7,4 mit KOH eingestellt

Pipettenlösung für
Messung Aktivitäts-
zustand II:

Standardpipettenlösung mit Zusatz von QX-314 (5 $\mu\text{mol/l}$). Dieses Lidocainderivat in die Patchpipettellösung appliziert, blockiert im Whole-Cell-Modus die Natriumkanäle der gemessenen Zelle. Die Zelle ist nicht mehr in der Lage Aktionspotenziale zu erzeugen, wohingegen das elektrophysiologische Verhalten der umgebenden Neuronen nicht beeinflusst wird. Dadurch wird die gemessene Zelle zu einem „Sondenneuron“, in deren Membranpotenzial sich hauptsächlich die passive Reaktion auf synaptische Übertragung widerspiegelt.

Badlösungen:

Standardbadlösung mit entsprechendem molaren Zusatz von Leuzin und KIC, pH-Wert 7,4 konstant. Die pathophysiologische Konzentration von Leuzin und KIC sollte nicht um mehr als das zehnfache überschritten werden, um keine unphysiologische pH-Verschiebung oder Osmolaritätsänderung zu messen.

Pipettenlösungen für
lokale Applikation:

Standardbadlösungen mit gelösten Salzen von NMDA, GABA, Glutamat, KIC sowie Glyzin und Leuzin (in Konzentrationen, wie jeweils angegeben)

3 Ergebnisse

3.1 Leuzin und KIC reduzieren die spontane Netzwerkaktivität

Während der akuten Enzephalopathie bei MSUD stellt sich zwischen Leuzin und KIC ein äquimolares Verhältnis im Liquor ein. Für die meisten experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde daher dieses Konzentrationsverhältnis gewählt, da es möglicherweise die vorliegenden Verhältnisse von Leuzin und KIC im Hirngewebe widerspiegelt. Darüber hinaus zeigte sich in Vorversuchen keine Änderung der spontanen Spikerate von Neuronen bei getrennter Inkubation mit 1 mmol/l Leuzin oder 1 mmol/l KIC. Um mögliche Effekte der Metabolite auf neuronale Eigenschaften zu verstärken, wurde für die Inkubationen und Applikationen im experimentellen Teil dieser Arbeit Lösungen mit äquimolare Mengen von 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC verwendet. Sollte bei diesen Konzentrationen kein Einfluss auf die untersuchten Eigenschaften nachweisbar sein, so wurde ein Einfluss bei den klinisch relevanten niedrigeren Konzentrationen (1-3 mmol/l Leuzin und KIC) als unwahrscheinlich angenommen.

3.1.1 Einfluss von Leuzin und KIC auf die Rate spontaner Aktionspotenziale

Für die Untersuchung, ob Leuzin und KIC gemeinsam einen Einfluss auf die spontane Spikeaktivität ausüben, wurde die Spikerate unterschiedlich aktiver Neuronenverbände vor und 20 Minuten nach gemeinsamer Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC bestimmt (s. Abb. 3.1.). In dieser Arbeit zeigten die diesbezüglich untersuchten neuronalen Kulturen (n=6) zu Beginn der Messreihe in physiologischer Badlösung eine hohe Variabilität der Spontanaktivität, beginnend mit einem Aktionspotenzial pro Minute bis hin zu 30 Aktionspotenzialen pro Minute. Die geringe unkorrelierte Spontanaktivität entspricht dem Aktivitätszustand I des Modells der intrinsichen Netzwerkaktivität (s. Material und Methoden 2.2.2.). Bei keiner der untersuchten Kulturen (n=6) war nach 20 min ein relevanter Einfluss von 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC auf die spontane Spikeaktivität im Aktivitätszustand I zu belegen.

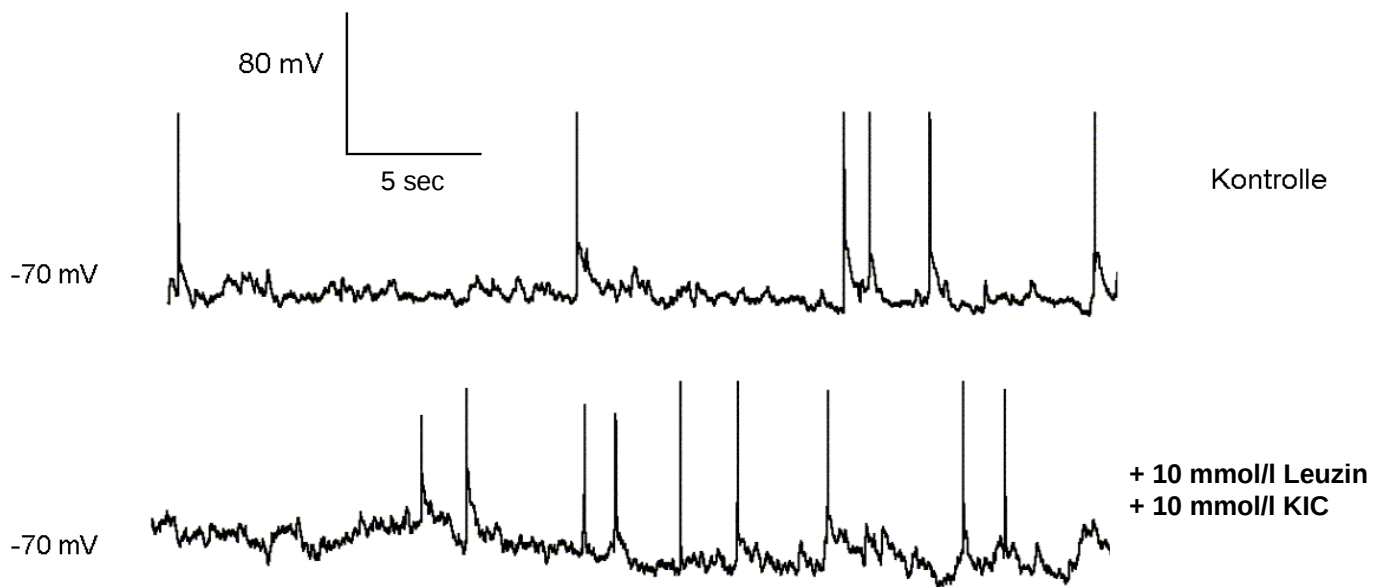


Abb 3.1.) Die Spikerate eines kortikalen Neurons im Zustand geringer Spontanaktivität bleibt unter dem Einfluss von 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC stabil. (10 Tage nach Präparation). Membranpotenzial in der Whole-Cell-Konfiguration im Current-clamp-Modus. Nach 20 min Inkubation ist kein relevanter Unterschied in der Spikeaktivität zu detektieren (Kontrolle ca 19 Spikes/ min, nach Inkubation ca. 22 Spikes/ min)

3.1.2 Einfluss von Leuzin und KIC auf Oszillationen im neuronalen Netzwerk (Aktivitätszustand II)

Der Aktivitätszustand II ist gekennzeichnet durch das Auftreten periodischer Depolarisationen, die zeitlich eng gekoppelte Aktionspotenziale des neuronalen Netzwerkes anzeigen und mit einer Frequenz von 0,1 -1 Hz an einzelnen Neuronen ableitbar sind. Der Zustand II tritt bei erhöhter Zahl synaptischer Verknüpfungen ein, bei einer Verstärkung der synaptischen Reizbarkeit durch Absenkung des Schwellenpotenzials oder bei erhöhter Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter. Durch die enge Kopplung der Neuronen zeigt der neuronale Zellverband eine synchrone Oszillation mit periodische Depolarisationen. Die Frequenz der Oszillation ist an einem Neuron repräsentativ für den ganzen Zellverbund messbar (Mager 2000). Nach Überführung der intrinsischen neuronalen Aktivität in den Aktivitätszustand II durch Verwendung der „Oszillationslösung“ wurden die Zellkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-10 mmol/l) von Leuzin und KIC inkubiert (s. Abb. 3.2., 3.3.).

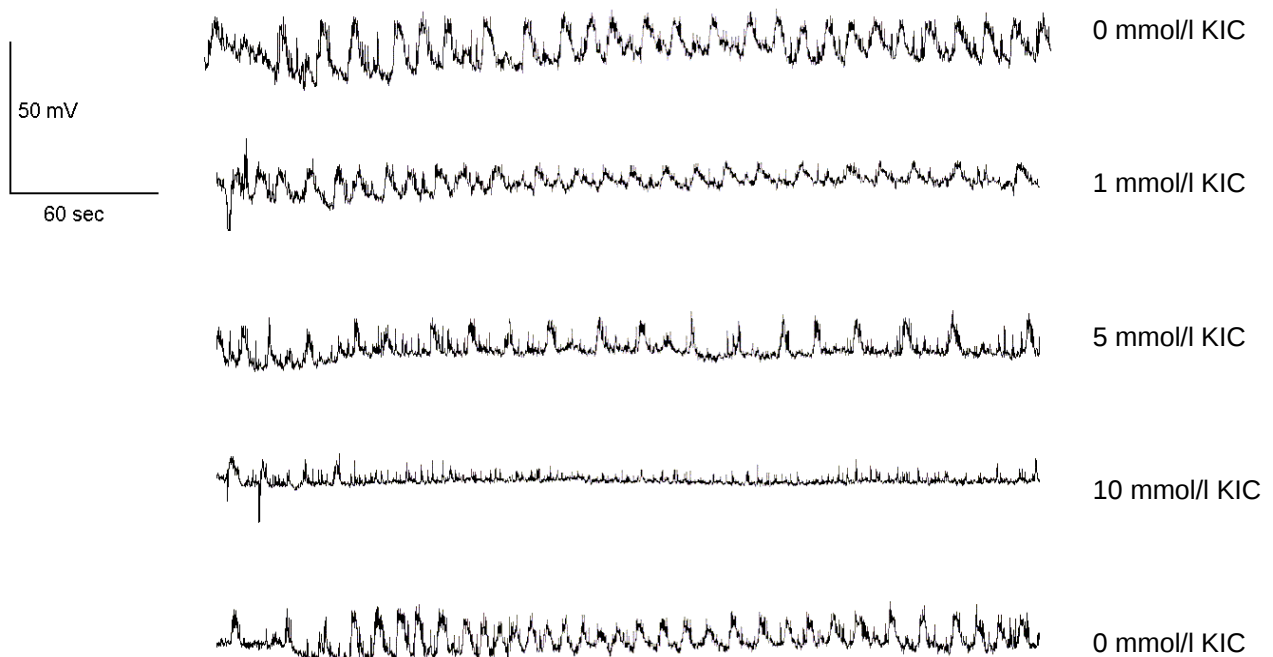


Abb. 3.2.) **Die Frequenz der periodischen Depolarisationen eines neuronalen Netzwerkes nimmt unter dem Einfluss von KIC konzentrationsabhängig ab.** Die Kontrolle zeigt eine Frequenz von 6 Depolarisationen/min (D/min). Die Inkubation von 1 mmol/l KIC führt zu einer Abnahme auf 4 D/min, 5 mmol/l KIC führen zu 3 D/min und 10 mmol/l KIC zu einem Verlust der periodischen Depolarisation. Dieser Einfluss ist komplett reversibel (Hippokampale Kultur am Tage 12 nach Präparation).

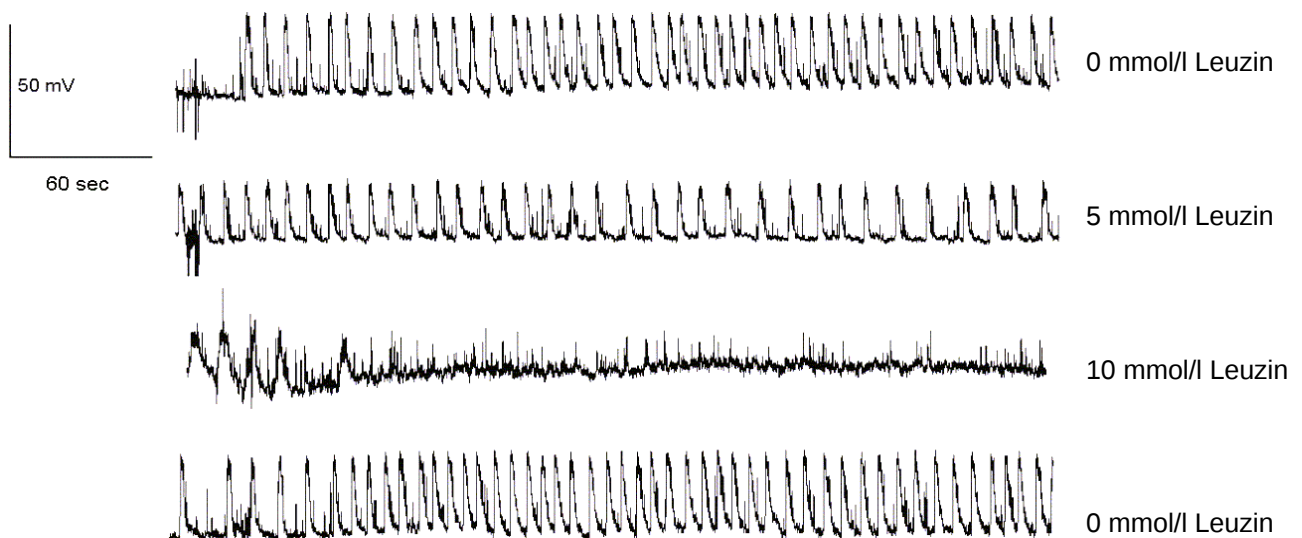


Abb. 3.3.) **Die Frequenz der periodischen Depolarisationen eines neuronalen Netzwerkes nimmt unter dem Einfluss von Leuzin konzentrationsabhängig ab.** Die Kontrolle zeigt eine Frequenz von 10 Depolarisationen/min (D/min). Die Inkubation von 5 mmol/l Leuzin führt zu einer Abnahme auf 5 D/min, und 10 mmol/l Leuzin führt zu einem Verlust der periodischen Depolarisation. Dieser Einfluss ist komplett reversibel (Hippokampale Kultur am Tage 12 nach Präparation).

Sowohl Leuzin und KIC alleine appliziert führten nach wenigen Sekunden zu einer Abnahme der Frequenz der periodischen Depolarisation. Die Frequenz stabilisierte sich anschließend auf dem erreichten Niveau. Bei Applikation von KIC in der Konzentration von 1 mmol/l sank die Frequenz um 25 % (6 D/min auf 4 D/min), von 5 mmol/l KIC um 50 % (6 D/min auf 3 D/min). Die Applikation von 10 mmol/l KIC führte zu einem kompletten Verlust der Depolarisationen. Leuzin (5 mmol/l) induzierte ebenfalls eine Abnahme der Depolarisationsfrequenz um 50 % (10 D/min auf 5 D/min) und führt bei 10 mmol/l ebenfalls zu einem kompletten Verlust der Depolarisationen. Nach Auswaschen von Leuzin und KIC stellte sich reversibel die Frequenz ein, die zu Beginn mit der Badlösung gemessen wurde (s. Abb. 3.2.). Diese Veränderungen wurden an drei verschiedenen Kulturen bestätigt.

3.1.3 Einfluss des Konzentrationsquotienten von Leuzin und KIC auf die spontane neuronale Netzwerkaktivität

Im Gehirn ist Leuzin der wichtigste Aminogruppendonor zur Synthese des Neurotransmitters Glutamat (Yudkoff 1997). Leuzin wird von allen Aminosäuren am schnellsten durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert (Smith et al. 1987). In den kapillarständigen Astrozyten wird die α -Aminogruppe von Leuzin auf α -Ketoglutarat übertragen. Durch diese Transaminierung entstehen KIC und Glutamat. Diese werden via Extrazellulärflüssigkeit zu den Neuronen transportiert, wo die Reaktion in entgegengesetzter Richtung ablaufen kann. Der Glutamathaushalt der Neuroglia kann so durch das Angebot und Verhältnis des Aminogruppendonors Leuzin und Aminogruppenakzeptors KIC reguliert werden. Da die Richtung und Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen von dem Verhältnis der beteiligten Substrate und Produkte abhängt, könnte eine Verschiebung des Konzentrationsverhältnis von Leuzin und KIC zur Änderung der Glutamatkonzentration oder der assoziierten Stoffwechselprodukte führen.

Nach Einstellung des neuronalen Netzwerkes auf Aktivitätszustandes II wurde die Frequenz der periodischen Depolarisation einerseits unter dem Einfluss von 5 mmol/l Leuzin (vorher 21 D/min, nach Inkubation 10 D/min) und zum anderen unter dem Einfluss 5 mmol/l KIC (vorher 21 D/min, nach Inkubation 9 D/min) bestimmt. Anschließend wurde die Frequenz, die 5 mmol/l Leuzin und 5 mmol/l KIC gemeinsam induzierten (vorher 21, D/min nach gemeinsamer Inkubation 17 D/min) gemessen (s. Abb. 3.4.). Die Frequenzabnahme, die durch jeweils 5 mmol/l Leuzin und 5 mmol/l KIC alleine ausgelöst wurde betrug etwa 50%, bei gemeinsamer Applikation von Leuzin und KIC betrug die Abnahme hingegen nur 20%. Diese Kompensation des Effektes von Leuzin und KIC konnte an zwei weiteren voneinander unabhängigen Zellkulturansätzen reproduziert werden.

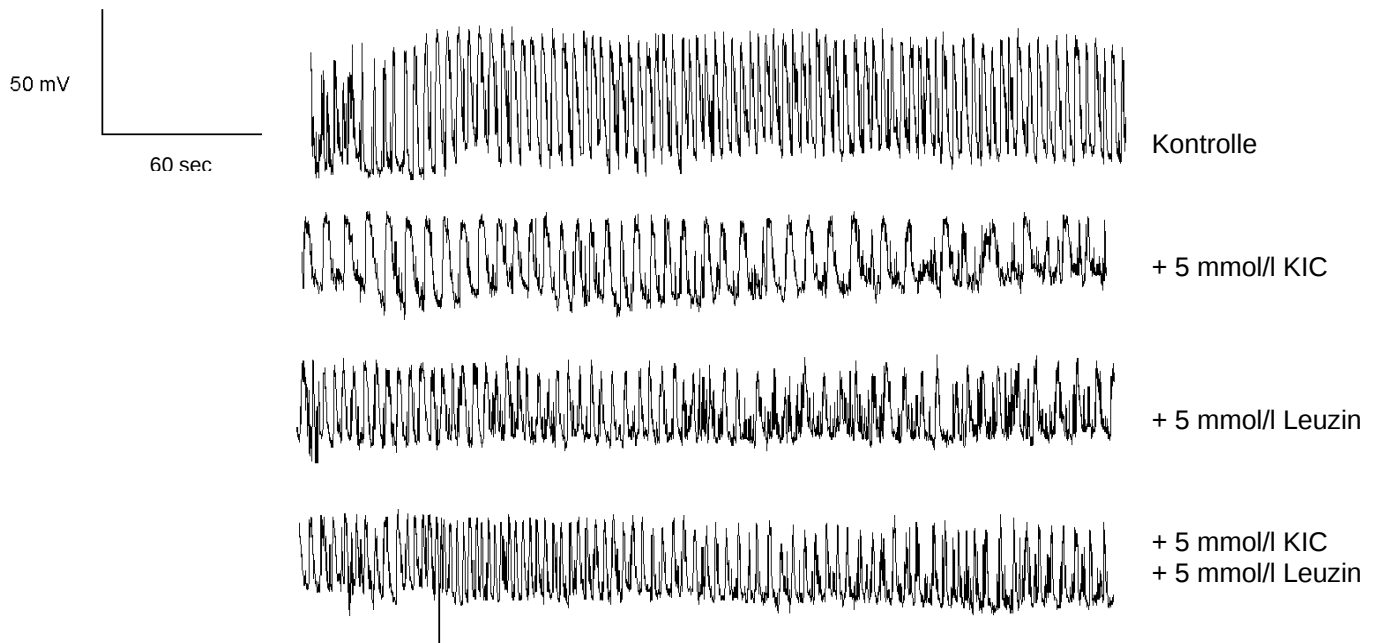


Abb. 3.4.) **Leuzin und KIC kompensieren ihren Einfluss auf die Frequenz der periodischen Depolarisationen eines neuronalen Netzwerkes.** Die Frequenz der Kontrolle in Badlösung betrug 21 Depolarisationen/min (D/min). Die Inkubation von 5 mmol/l KIC führt zu einer Abnahme auf 10 D/min, von 5 mmol/l Leuzin auf 9 D/min. Gemeinsam appliziert sind 17 D/min abzuleiten (Hippokampale Kultur am Tage 12 nach Präparation).

Aus den Beobachtungen der reduzierten neuronalen Netzwerkaktivität unter Leuzin und KIC konnte jedoch nicht der mögliche Wirkort (präsynaptische oder postsynaptische Funktionen) abgeleitet werden. Deshalb wurden weitere neurophysiologische Parameter untersucht.

3.2 Das Ruhepotenzial neuraler Zellen bleibt unter Leuzin und KIC konstant

Das Ruhepotenzial von Astrozyten und Neuronen ist eine Größe, die vom Konzentrationsgradienten der Ionen zwischen Intra- und Extrazellularraum und der Leitfähigkeit der Membran abhängt. Damit kann das Ruhepotenzial als Prüfgröße für die Anzahl, das Sortiment und den Aktivierungszustand von Ionenkanälen und Membranstabilität genutzt werden (*Hille 1992*). Weiterhin sind zur Aufrechterhaltung des Ionengradienten Reduktionsäquivalente für die Natrium-Kalium-Pumpe notwendig (*Eckert und Randall 1997*). Somit ist das Ruhepotenzial auch ein Maß für den Zustand des Energiehaushalts der Zelle, da aus einer Abnahme der Reduktionsäquivalente eine Änderung des zellulären Ruhepotenzials resultiert.

3.2.1 Astrozyten

Für verschiedene am zentralen Nervensystem wirksame Substanzen wurde eine Beeinträchtigung der astrozytären Funktion gezeigt. Ammonium, welches bei der hepatischen Enzephalopathie erhöht ist, führt ebenso zu einer Depolarisierung der Astrozyten (Allert et al. 1998) wie der Entzündungstransmitter $\text{TNF-}\alpha$ (Köller et al. 1996). McKenna et al. (1998) diskutierten eine nachgewiesene Änderung der Aspartat und Laktatkonzentration von Astrozyten unter dem Einfluss von KIC mit möglicher Beeinträchtigung ihres Energiehaushaltes und dadurch verminderter Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten. Dieses sollte sich in einer Depolarisierung des Ruhepotenzials von Astrozyten belegen lassen, wie es Juthberg und Brismar (1997) durch Hemmung der astrozytären Atmungskette nachwiesen.

Um zu überprüfen, ob Leuzin und KIC das Ruhepotenzial von Astrozyten beeinflussen, wurde dieses vor und nach 1-stündiger Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC gemessen (s. Abb. 3.5.).

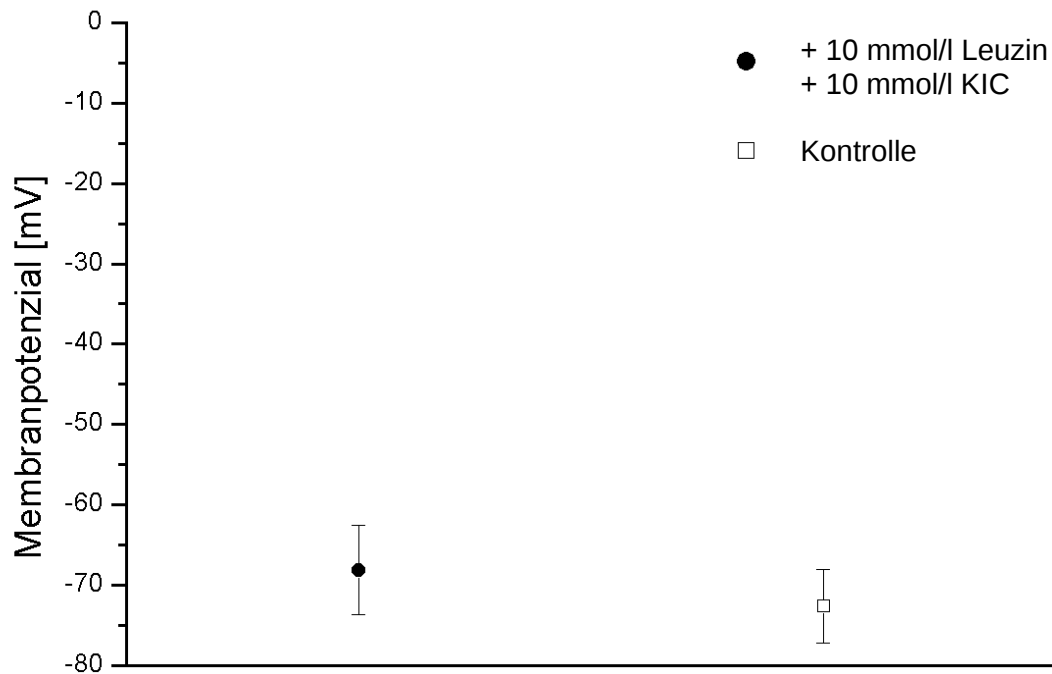


Abb. 3.5.) **Das Membranpotenzial von Astrozyten bleibt unter dem Einfluss von Leuzin und KIC stabil.** 1 h Inkubation (n=6) mit 10 mmol/l KIC und 10 mmol/l Leuzin führt zu keiner signifikanten Änderung des Membranpotenzials im Vergleich zur Kontrolle (n=6). Die Balken zeigen die Standardabweichung.

Es war kein signifikanter Unterschied in der Änderung des Ruhepotenzials von Astrozyten nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC festzustellen ($n=12$, beidseitiger Student-t-Test für unabhängige Stichproben, hier $t=1,52$, Ablehnung der Nullhypothese bei $t>2,23$ für 10 Freiheitsgrade und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

3.2.2 Neuronen

Das Ruhepotenzial von Neuronen ist nicht nur eine Prüfgröße für Homöostase und Struktur der Zellen, sondern hat erheblichen Einfluss auf die neuronale Aktivität. Eine verstärkte Hyperpolarisation führt zu einer verminderten Erregbarkeit, da das Schwellenpotenzial zur Auslösung eines Aktionspotenzials seltener erreicht wird. Um zu testen, ob die metabolische Enzephalopathie der MSUD mit der Reduktion des neuronalen Ruhepotenzial erklärbar ist, wurde die Änderung des neuronalen Ruhepotenzials unter Leuzin und KIC bestimmt. Im Whole-Cell-Modus wurde der Verlauf des Ruhepotenzials über 40 min protokolliert. 10 min nach Messbeginn wurden 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC appliziert (s. Abb. 3.6.).

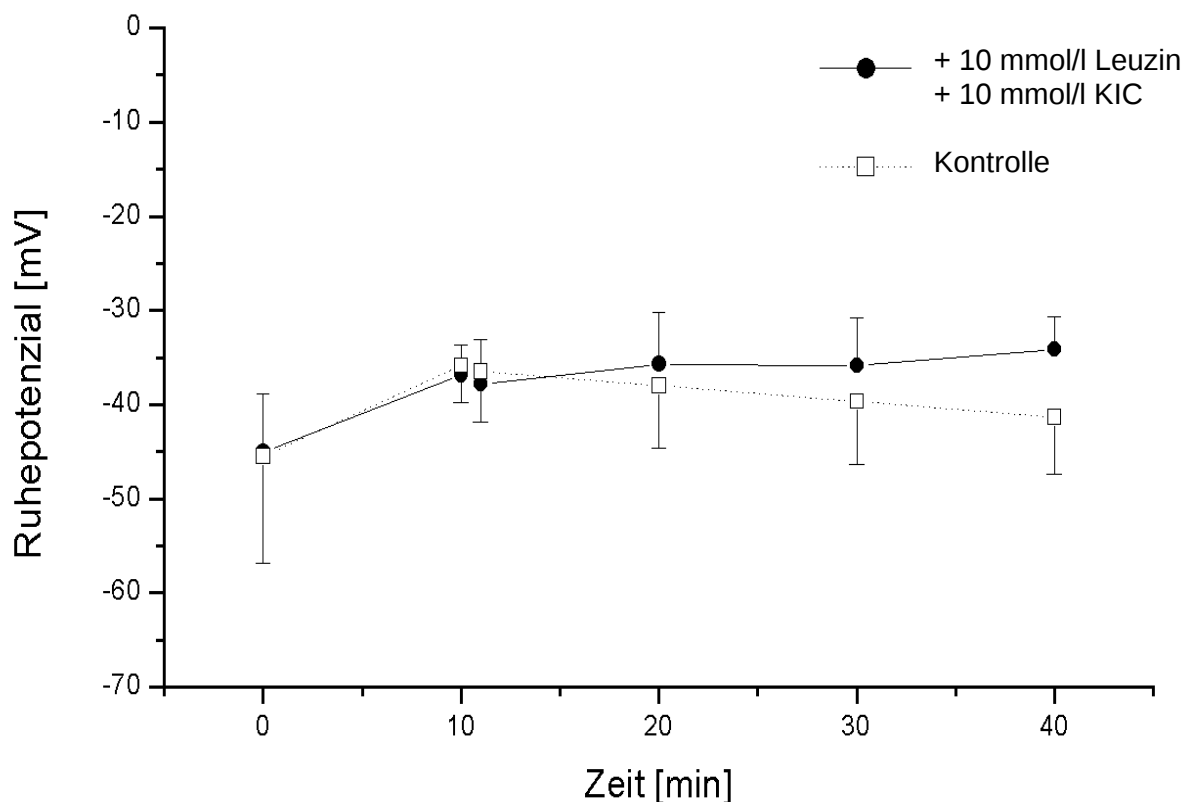


Abb. 3.6.) **Das Membranpotenzial von Neuronen bleibt unter dem Einfluss von Leuzin und KIC stabil.** Nach 45 min Inkubation ($n=9$) mit 10 mmol/l KIC und 10 mmol/l Leuzin ist keine signifikante Änderung des Membranpotenzials im Vergleich zu Kontrollen ($n=6$) zu messen. Das Alter der kortikalen Zellkulturen betrug 8 – 11 Tage nach Präparation. Die Balken zeigen die Standardabweichung.

Im Gegensatz zum Ruhepotenzial von Neuronen im Hirngewebeschnitt zeigten die Neuronen primär dissoziierter Kulturen ein vermindertes Ruhepotenzial (*Köller et al. 1990b*). Es war kein signifikanter Unterschied in der Änderung des Ruhepotenzials von Neuronen nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC festzustellen ($n=15$, beidseitiger Student-t-Test für unabhängige Stichproben, hierbei $t=0,17$, mit Ablehnung der Nullhypothese bei $t>2,16$ für 13 Freiheitsgrade und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

3.3 Ströme neuronaler Ionenkanäle bleiben unter Leuzin und KIC unverändert

Das konstante Ruhepotenzial unter dem Einfluss von Leuzin und KIC, sowohl bei Astrozyten wie auch bei Neuronen, forderte eine genauere Analyse der neuronalen Einzelkanäle zur Erklärung der Veränderung der Spontanaktivität. Mit den folgenden Messungen der Leitfähigkeit neuronaler Kanäle wurde ein möglicher postsynaptischer Wirkort von Leuzin und KIC erfasst.

3.3.1 Spannungsabhängige Natriumleitfähigkeit

Über den spannungsabhängigen Natriumkanal der Neuronen fließt der Hauptanteil des Stromes des Aktionspotenzials (*Ogata und Tatebayashi 1990*). Seine maximale Leitfähigkeit nach einer aktivierenden Depolarisation ist spannungsabhängig (*Costa 1992*). Mit größer werdender Depolarisation nimmt die Bereitschaft des Kanals zur Öffnung ab. Diese Eigenschaft lässt sich elektrophysiologisch mit Hilfe der sogenannten Natriumstrominaktivierungskurve darstellen.

Die spannungsabhängigen Natriumkanäle sind der Wirkort von Antikonvulsiva und Anästhetika (*Taylor und Narasimhan 1997*), die die klinische Symptomatik der MSUD imitieren können. Sedierende Psychopharmaka, wie Phenytoin, Valproat und Carbamazepin, sowie die Anästhetika wie Lidocain verschieben die Natriumstrominaktivierungskurve in Richtung zu hyperpolarisierenden Potenzialen (*Backus et al. 1991, van den Berg et al. 1993*). Midazolam und Diazepam reduzieren den Natriumeinstrom (*Ishizawa et al. 1997*). Eine Interaktion mit amphipathischen Molekülen wie BCAA und BCKA ist denkbar, da die Inaktivierungsdomäne D4/S4 des Natriumkanals ebenfalls eine amphipathischen Sekundärstruktur besitzt (*Filatov et al. 1998*). Zusätzlich zeigt sich in der molekularen Struktur des spannungsabhängigen Natriumkanals eine Inaktivierungsdomäne, die bei Bindung des Tripeptids Isoleuzin-Phenylalanin-Methionin eine Verschiebung der Natriumstrominaktivierungskurve bewirkt (*Eatholtz et al. 1998*).

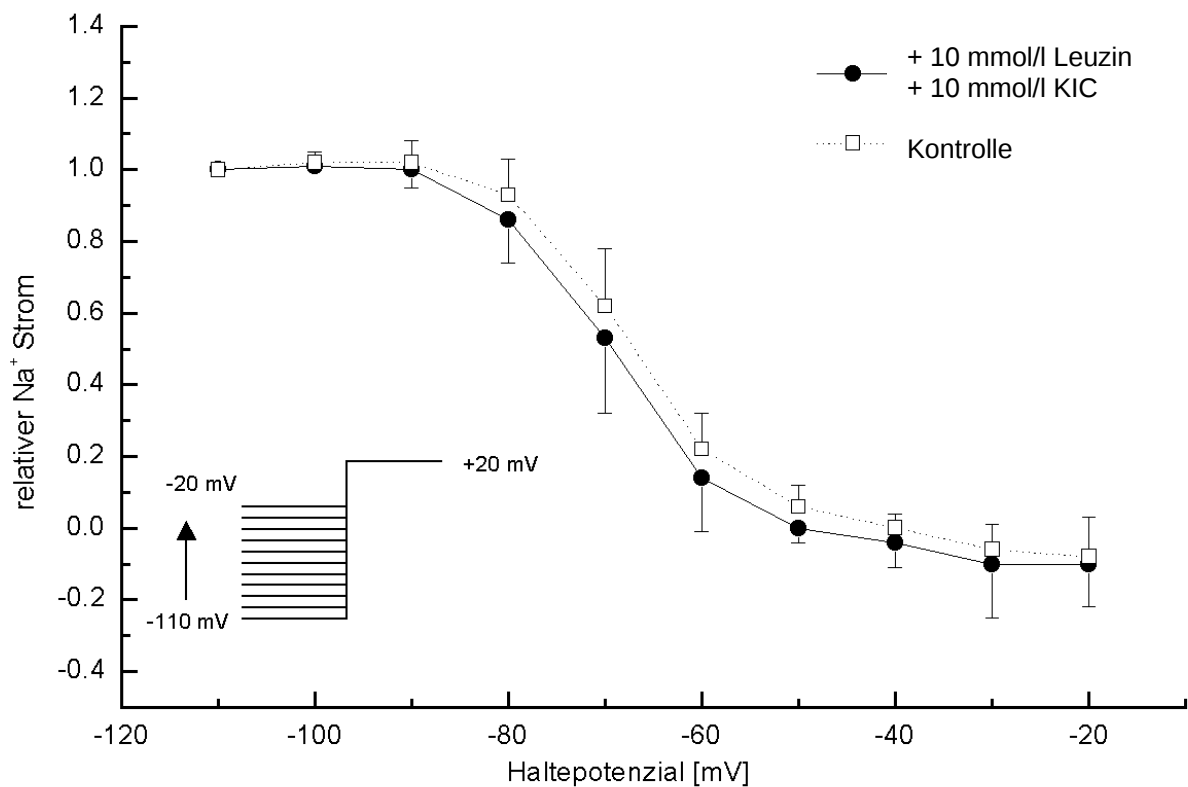


Abb. 3.7.1.) **Die Natriumstrominaktivierungskurve von kortikalen neuronalen Kulturen.** (8-11 Tagen nach Präparation) 5 min vor Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC (n=9). Kontrolle (n=6). Die Abbildungen 3.7.2., 3.7.3., 3.7.4. zeigen den zeitlichen Verlauf. Die Balken zeigen die Standardabweichungen der Einzelmessungen. ($V_{1/2}$ -Werte und Signifikanztest s. Tab. 3.1.)

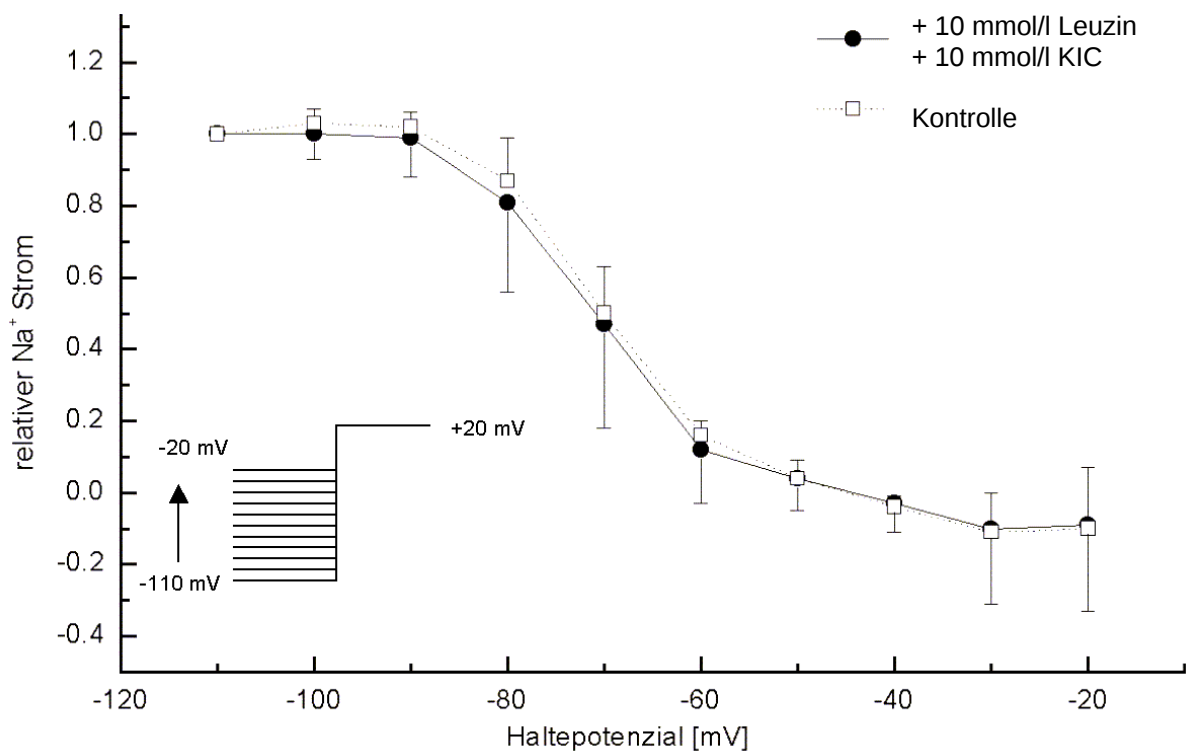


Abb. 3.7.2.) **Keine Änderung der Natriumstrominaktivierungskurve 5 min nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC.**

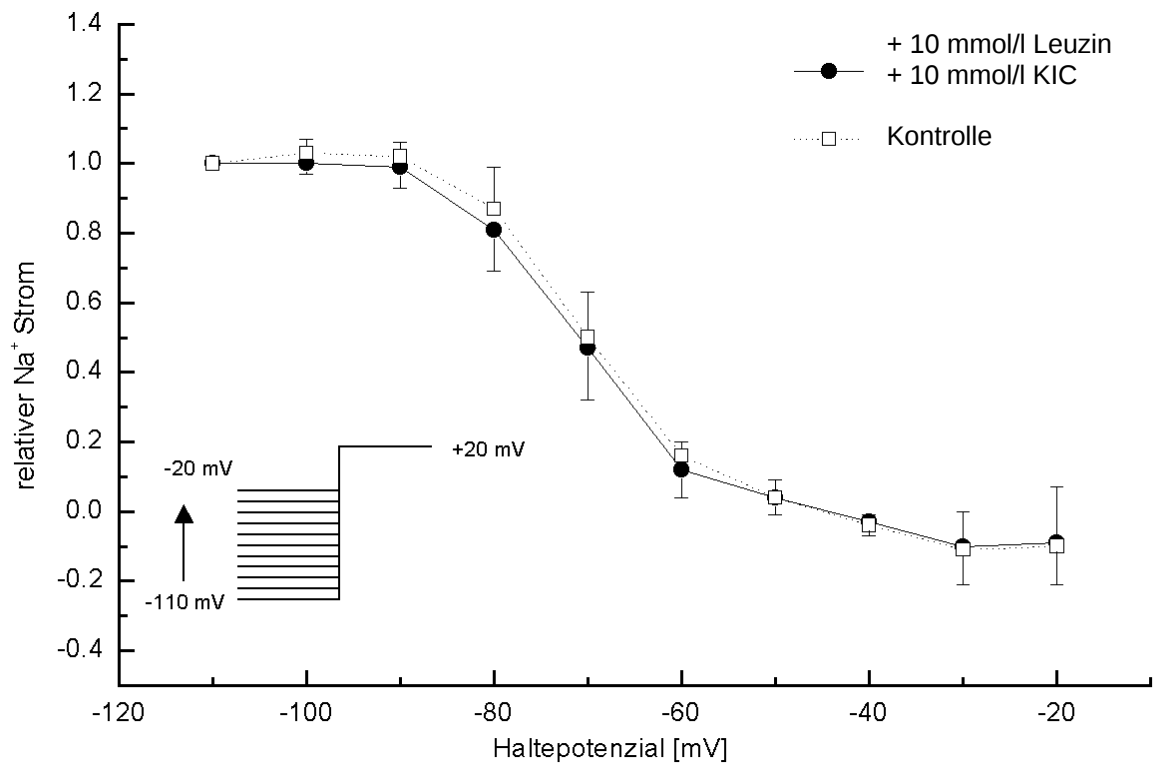


Abb. 3.7.3.) Keine Änderung der Natriumstrominaktivierungskurve 15 min nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC.

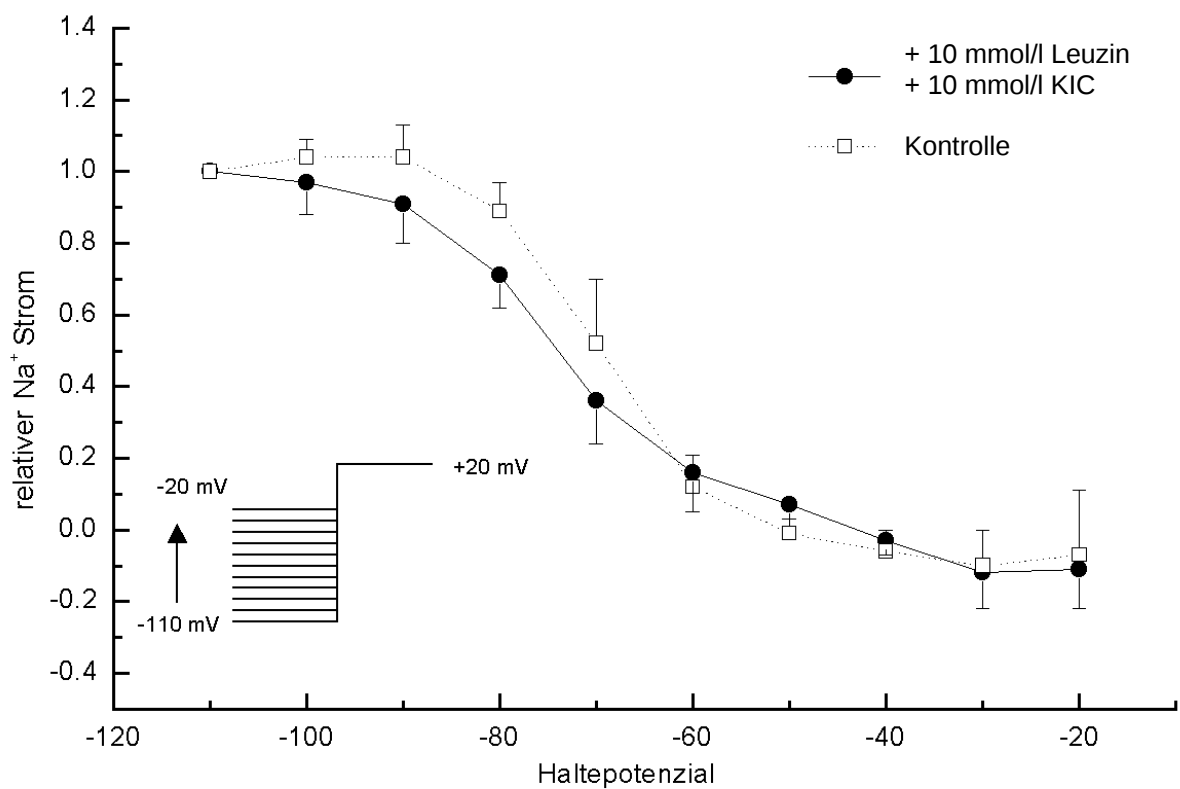


Abb. 3.7.4.) Keine Änderung der Natriumstrominaktivierungskurve 25 min nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC.

Auf Grund oben genannter Hinweise wurden die Eigenschaften des spannungsabhängigen Natriumkanals unter Einfluss von Leuzin und KIC untersucht. Dazu wurde der maximal auslösbare Natriumstrom an einem Neuron vor Inkubation, beziehungsweise 5 min, 15 min, und 25 min nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC bestimmt. Zur Beurteilung der Natriumkanalfunktion wurde die Natriumstrominaktivierungskurve dargestellt und $V_{1/2}$, die Spannung bei der 50% der Na-Kanäle aktivierbar sind, berechnet (s. Abb. 3.7.1.-4.).

Zeit	Messung	$V_{1/2}$ (mV)	Standard- fehler ($V_{1/2}$)	p-Wert
5 min vor Inkubation	Leuzin/KIC	-68.4	3.2	0.20
	Kontrolle	-66.6	2.5	
5 min nach Inkubation	Leuzin/KIC	-70.3	5.2	0.62
	Kontrolle	-69.4	2.1	
15 min nach Inkubation	Leuzin/KIC	-70.2	2.5	0.43
	Kontrolle	-69.4	2.1	
25 min nach Inkubation	Leuzin /KIC	-71.8	3.9	0.09
	Kontrolle	-69.2	2.5	

Tab. 3.1.) Werte für $V_{1/2}$ der Natriumstrominaktivierungskurve von kultivierten kortikalen Neuronen nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC. Der Student-t-Test der $V_{1/2}$ -Werte erlaubt es nicht bei zweiseitiger Fragestellung die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% abzulehnen, da der p-Wert in allen Fällen >0.05 ist.

Nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC zeigte sich in der Zeitspanne von 5 min bis 25 min kein signifikanter Unterschied im Stromfluss über die spannungsabhängigen Natriumkanäle im Vergleich zur Kontrollmessung ohne Zugabe von Leuzin und KIC (n=15) (s. Tab 3.1.).

3.3.2 Liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle ändern nach Bindung von Neurotransmittern die Membranleitfähigkeit für spezifische Ionen. Sie sind der Wirkort der endogenen Neurotransmitter und vieler Psychopharmaka (Hille 1992). Dabei muss zwischen einem agonistischen, den Neurotransmitter simulierenden Effekt (z.B. Barbiturate am GABA-Rezeptor), und einem antagonistischen Einfluss, den Neurotransmitter inhibierenden Effekt (z.B. Strychnin am Glyzinrezeptor), unterschieden werden. Sowohl ein agonistischer, als auch ein antagonistischer Effekt von Leuzin und KIC auf Liganden-gesteuerte Ionenkanäle der Neuronen könnten die Enzephalopathie der MSUD erklären. Die Reversibilität von 24-48h der Enzephalopathie nach Senkung der hohen Leuzin und KIC Konzentrationen ergäbe sich aus deren kompetitiven Bindung an Ionenkanalrezeptoren.

Die strukturelle Ähnlichkeit von Leuzin und KIC zu den Aminosäure-verwandten Neurotransmittern und die konzentrationsabhängige klinische Symptomatik ließen eine Überprüfung einer aktivierenden wie hemmenden kompetitiven Bindung an Neurotransmitterrezeptoren sinnvoll erscheinen. Deswegen wurde untersucht, ob durch Leuzin und KIC eine Aktivierung Liganden-gesteuerter Rezeptoren möglich ist. Dazu wurde die Technik der somanahen Kurzzeitapplikation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC angewendet (s. Abb. 3.8.). Es zeigte sich, dass mit Leuzin und KIC bei den Haltepotenzialen von -80 mV, -40 mV, 0 mV, $+40$ mV keine Aktivierung Liganden-gesteuerter Rezeptoren erfolgte ($n=4$).

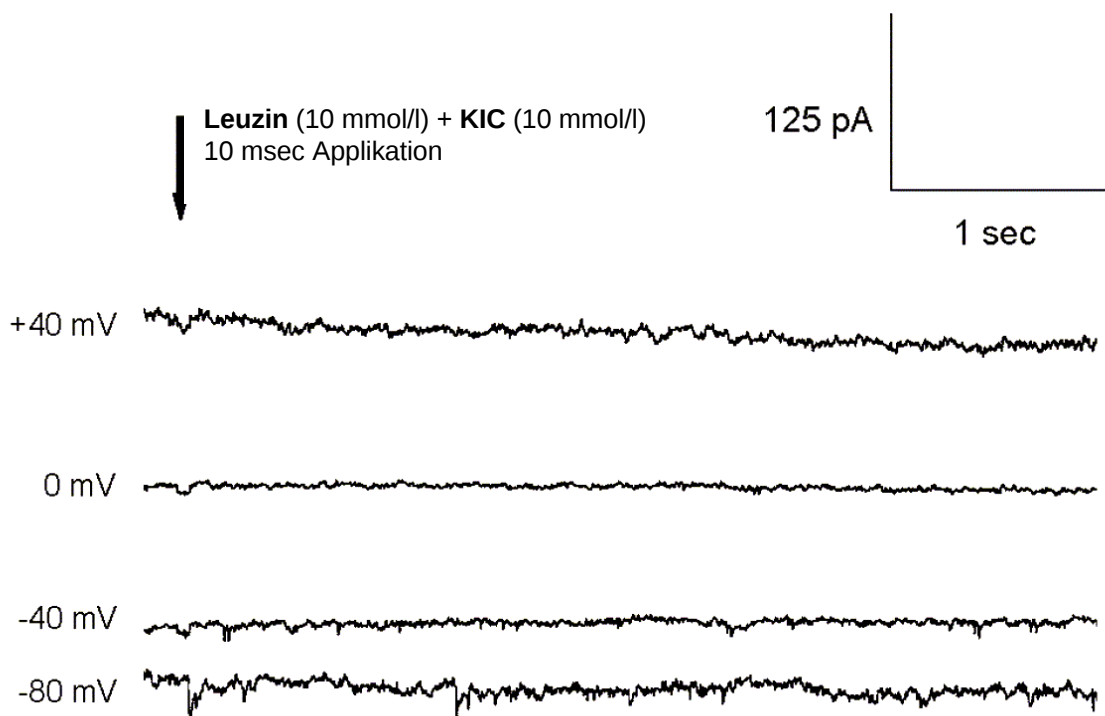


Abb. 3.8.) **KIC und Leuzin besitzen keine funktionellen Neurotransmittereigenschaften.** Induzierte Ströme nach somanaher Applikation von 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC (Kortikale Kultur 8 Tage nach Präparation). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen. Es war keine relevante Änderung der Ströme nach Applikation zu detektieren.

3.3.3 Glutamat- und NMDA-aktivierte Membranströme

Die Gruppe der Glutamatrezeptoren wird den Kationen-leitenden exzitatorischen Ionenkanälen zugeordnet. Sie vermitteln nach Ligandenaktivierung einen Calciumstrom (Seeburg 1993, McBain and Mayer 1994). Durch Hemmung der Glutamatkanäle wird die Erregbarkeit des Neurons gesenkt. Es gibt eine große Zahl unterschiedlicher Subtypen, die nach ihrer Spezifität für unterschiedliche Pharmaka klassifiziert werden, wie z.B. den NMDA-, Kainat- oder AMPA-Kanal. Die Hinweise auf Änderungen des Calciumstroms an Pankreaszellen (Duchen *et al.* 1993) und strukturelle Eigenschaften des NMDA-Kanals könnte auf einen Wirkort von Leuzin und KIC hindeuten. Darüber hinaus besitzt der NMDA-Kanal eine Bindedomäne für Leuzin, Isoleuzin und Valin (Krupp *et al.* 1998), deren Funktion ungeklärt ist.

Es wurde hier untersucht, ob sich durch Leuzin und KIC die Leitfähigkeit der Glutamat- oder NMDA-Kanäle ändert. Mit Hilfe der somanahen Kurzzeitapplikation wurde der durch Glutamat und NMDA bei unterschiedlichen Haltepotenzialen auslösbare Strom eines Neurons bestimmt. Nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC wurde an derselben Zelle erneut Glutamat (n=2) (s. Abb. 3.9.1.-2.) oder NMDA (n=4) appliziert (s. Abb. 3.10.1.-2.). Es war kein relevanter Einfluss auf den durch Glutamat und NMDA ausgelösten Strom nach Inkubation mit Leuzin und KIC zu beobachten.

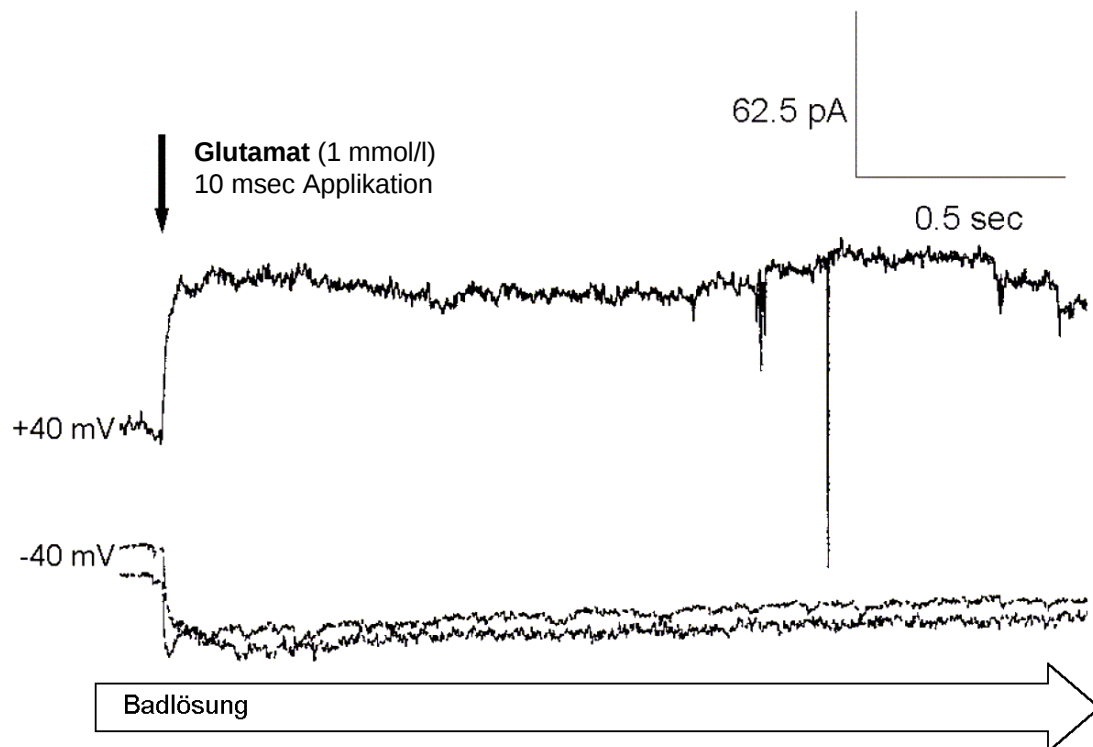


Abb. 3.9.1.) **Durch somanahe Kurzzeitapplikation von 1 mmol/l Glutamat induzierte Ströme kortikaler Neuronen.** (Kortikale Kultur 8 Tage nach Präparation). Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

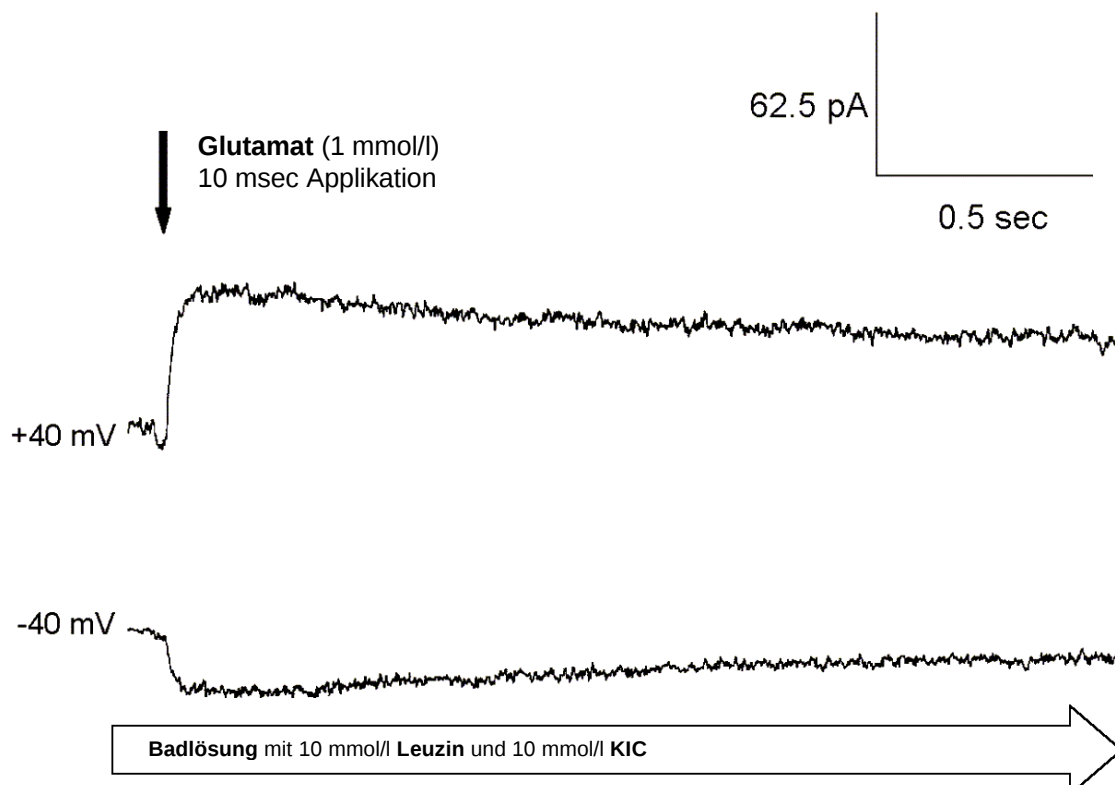


Abb. 3.9.2.) **KIC und Leuzin zeigen keinen Einfluss auf Glutamat induzierte Ströme.** Dasselbe Neuron wie unter Abb. 3.9.1.) während gleichzeitiger Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC. Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

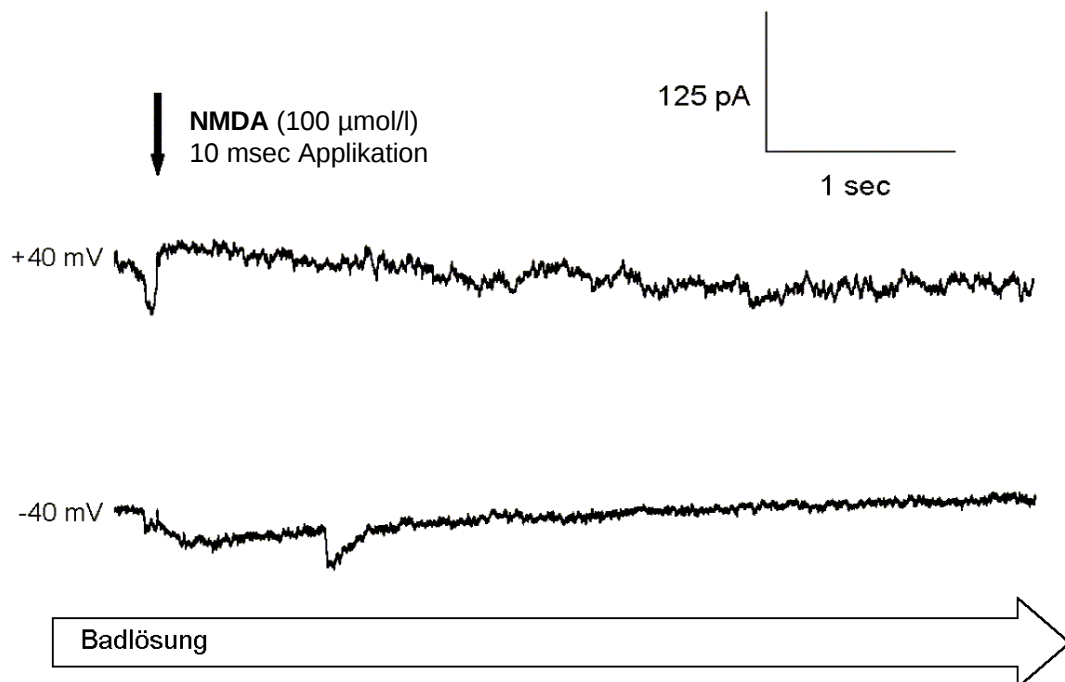


Abb. 3.10.1.) **Durch somanahe Kurzzeitapplikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ NMDA induzierte Ströme kortikaler Neuronen.** Induzierte Ströme nach somanaher Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ NMDA (Kortikale Kultur 8 Tage nach Präparation). Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

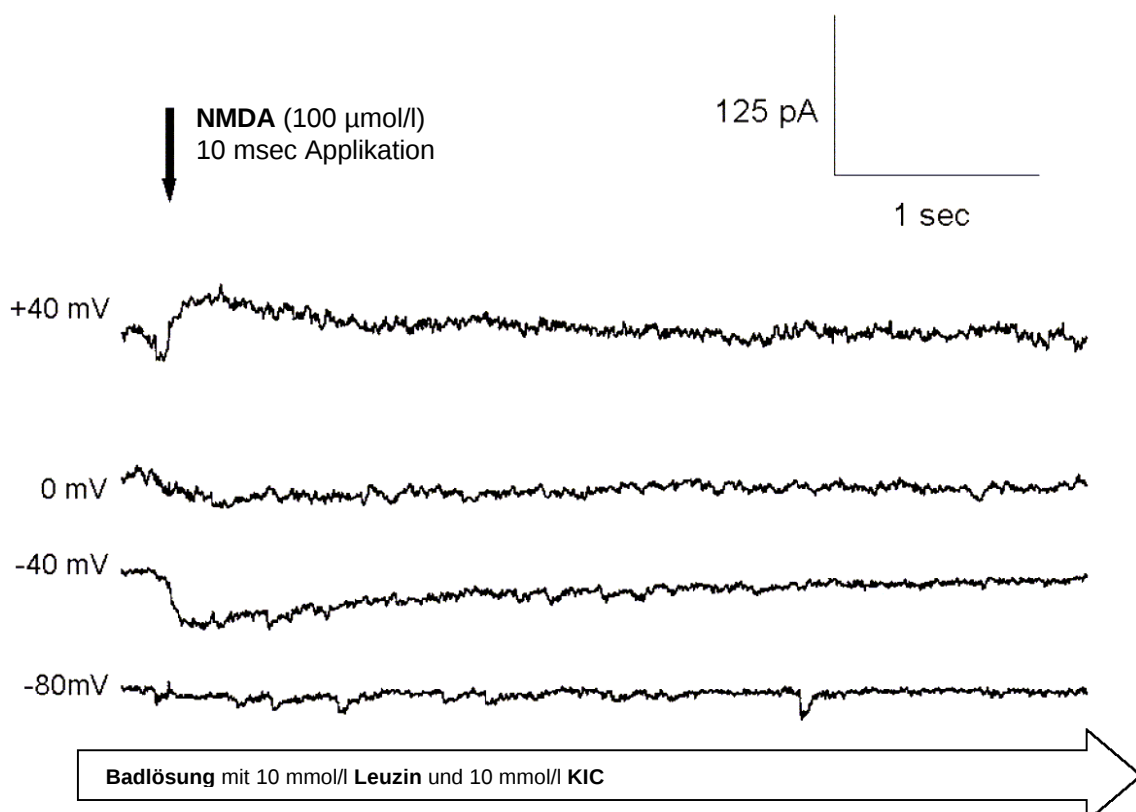


Abb. 3.10.2.) **KIC und Leuzin zeigen keinen Einfluss auf NMDA induzierte Ströme.** Dasselbe Neuron wie unter Abb. 3.10.1.) während gleichzeitiger Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC. Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

3.3.4 GABA-aktivierter Membranstrom

GABA-Kanäle modulieren die Leitfähigkeit für Cl^- Ionen und können so bei Öffnung durch Erhöhung der Membranleitfähigkeit die Erregbarkeit des Neurons vermindern (Hille 1992). Sie besitzen unterschiedliche Bindungsstellen für chemisch stark unterschiedliche Pharmaka. So bilden sie den Angriffsort von Benzodiazepinen, Barbituraten, Anxiolytika, Anästhetika wie Etomidat und Propofol (Sieghart 1992, Biscoe und Duchen 1985). Die hohe Varianz der Bindungsstellen könnte eine Interaktion mit Leuzin und KIC vermitteln.

Es wurde untersucht, ob sich durch Leuzin und KIC die Leitfähigkeit der GABA-Kanäle ändert. Mit Hilfe der somanahen Applikation wurde der durch GABA induzierbare Strom eines Neurons bestimmt. Nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC wurde an derselben Zelle erneut GABA appliziert (s. Abb. 3.11.1.-2.).

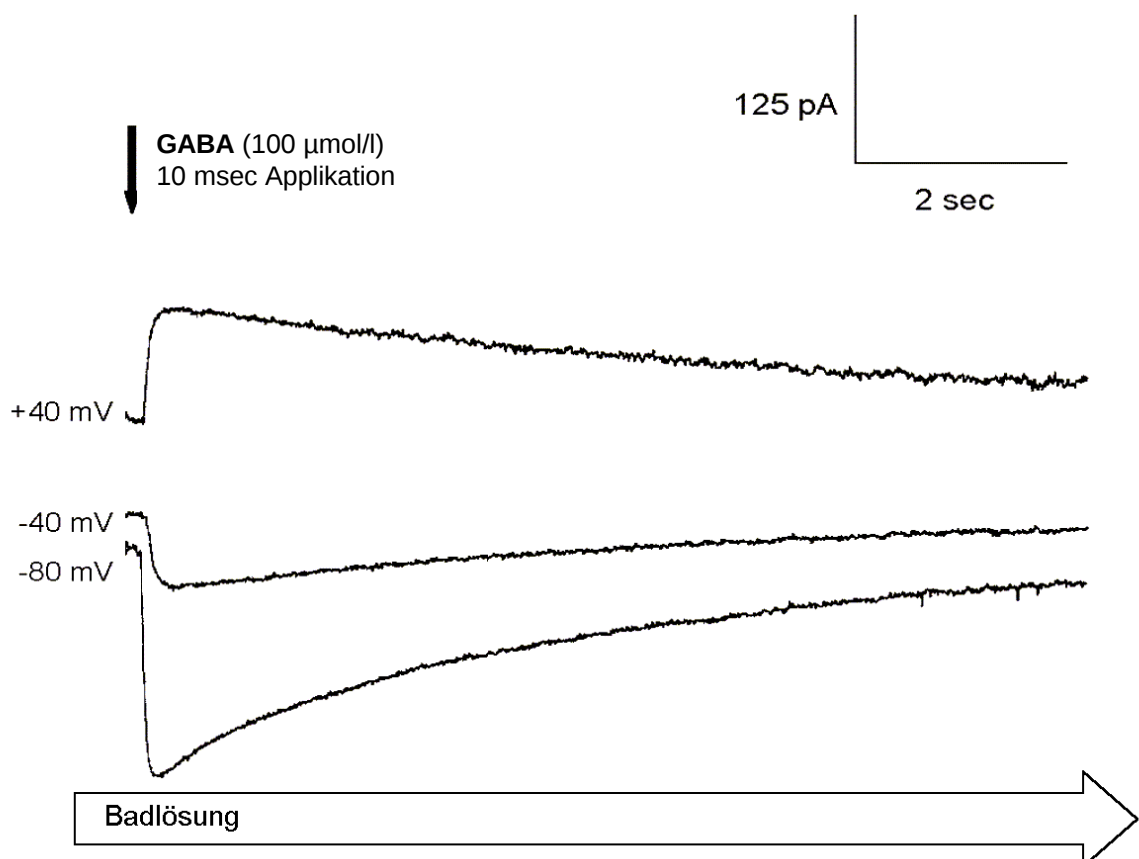


Abb. 3.11.1) **Durch somanahe Kurzzeitapplikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ GABA induzierte Ströme kortikaler Neuronen.** (Kortikale Kultur 8 Tage nach Präparation). Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

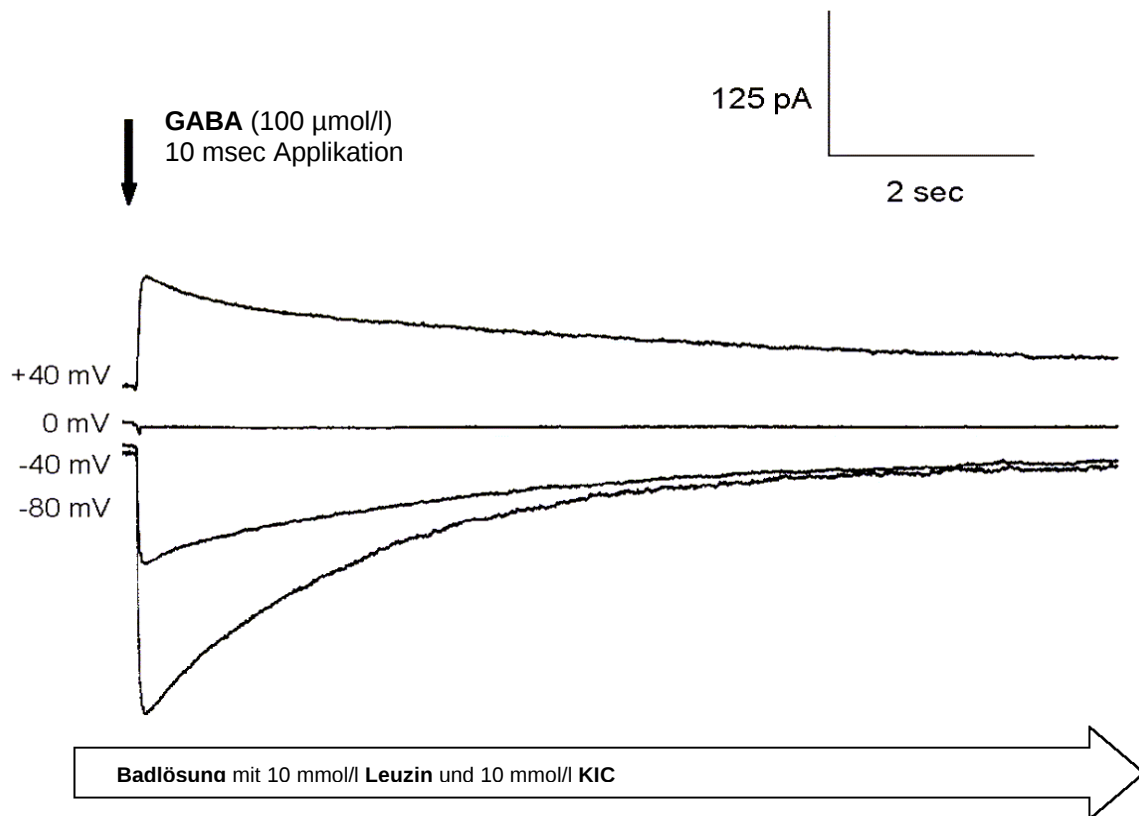


Abb. 3.11.2) **Leuzin und KIC zeigen keinen Einfluss auf GABA induzierte Ströme.** Dasselbe Neuron wie unter Abb. 3.11.1.) während gleichzeitiger Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC. Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

Es war kein Einfluss auf den durch GABA ausgelösten Strom ($n=3$) nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC zu beobachten.

3.3.5 Glyzin-aktivierter Membranstrom

Glyzin-Rezeptoren sind Chloridionen leitende Kanäle, denen eine inhibitorische Funktion zukommt, da das Gleichgewichtspotenzial der Chloridionen zur Hyperpolarisierung führt (*Breitinger und Becker 1998*). Ihre enge strukturelle Verwandtschaft zu GABA-Rezeptoren lässt sie ebenso wie diese als mögliches Ziel von Leuzin und KIC erscheinen.

Es wurde untersucht, ob sich durch Leuzin und KIC die Leitfähigkeit des Glyzin-Kanals ändert. Mit Hilfe der somatischen Applikation wurde der durch Glyzin auslösbare Strom eines Neurons bestimmt. Nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC wurde an derselben Zelle erneut Glyzin (s. Abb. 3.12.1.-2.) appliziert. Es war kein Einfluss des durch Glyzin ausgelösten Stroms ($n=4$) nach Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC zu detektieren.

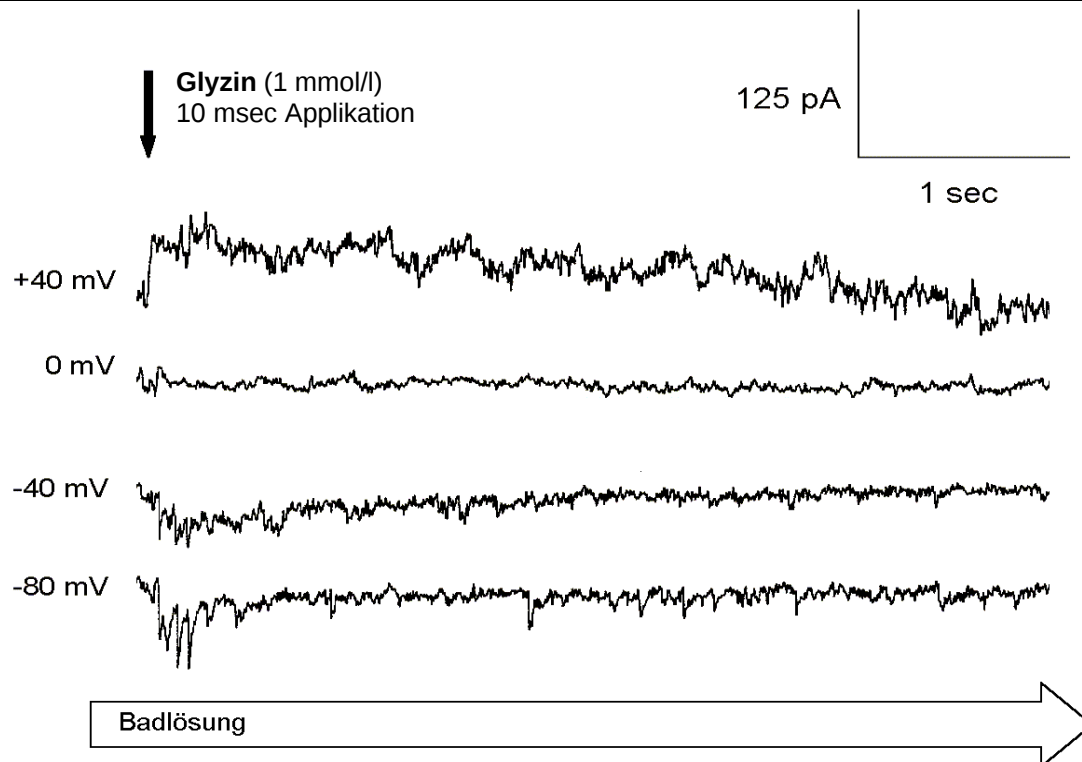


Abb. 3.12.1) **Durch somanahe Kurzzeitapplikation von 1 mmol/l Glyzin induzierte Ströme kortikaler Neuronen.** (Kortikale Kultur 8 Tage nach Präparation). Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

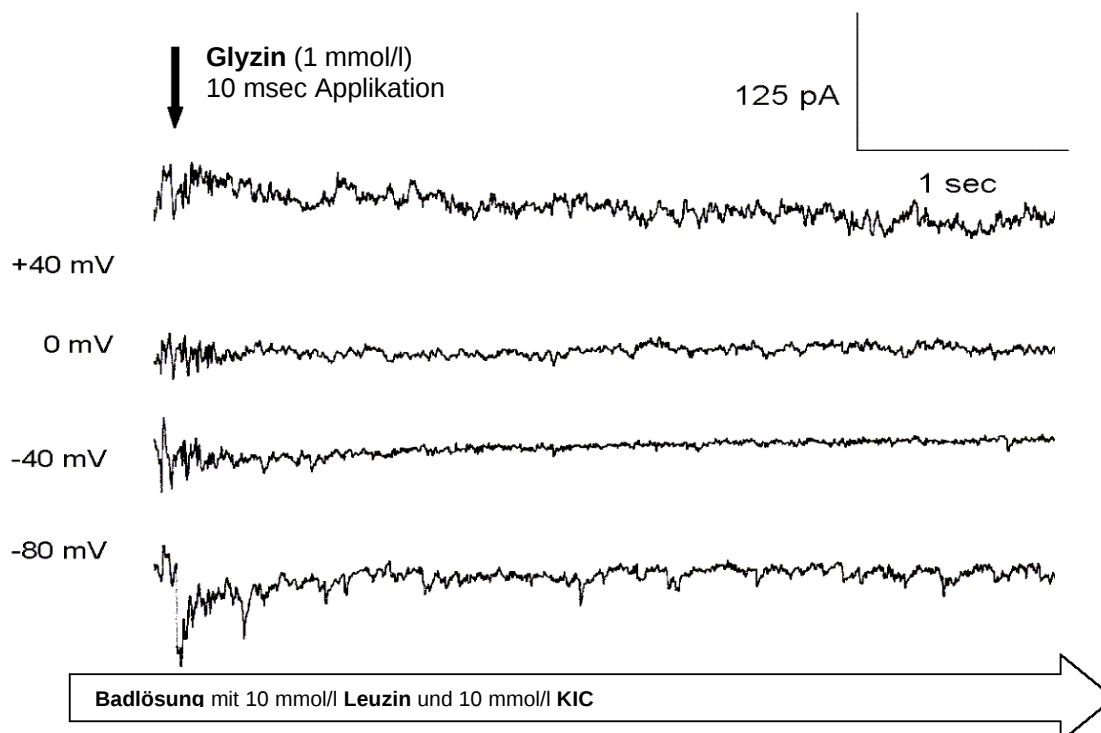


Abb. 3.12.2.) **KIC und Leuzin zeigen keinen Einfluss auf Glyzin induzierte Ströme.** Dasselbe Neuron wie unter Abb. 3.12.1.) während gleichzeitiger Inkubation mit 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC. Der senkrechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der 10 msec dauernden Applikation. Die Ströme wurden bei unterschiedlichen Haltepotenzialen gemessen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Effekt von Leuzin und KIC auf neuronale Funktionen nachgewiesen und zwar in Konzentrationen, wie sie auch während der akuten Enzephalopathie im Gehirn von MSUD Patienten vorkommen. Hauptergebnis der Untersuchungen ist die konzentrationsabhängige Änderung spontaner netzwerkgetriebener Oszillationen durch die bei der MSUD relevanten Metabolite Leuzin und KIC. Beide Substanzen verhalten sich dabei kompetitiv. Dabei führt der fehlende Nachweis von Störungen Liganden-operierender als auch spannungsaktivierter Membranströme zu der Hypothese, dass bei der MSUD die Freisetzung von Glutamat präsynaptisch verändert wird. Dies kann durch intrazelluläre stöchiometrische Verschiebungen erklärt werden.

Hinweise auf eine Störung der neuralen Netzwerkfunktion bei MSUD Patienten wurden schon bei der Auswertung von EEGs symptomatischer Patienten hervorgehoben (*Korein J et al. 1994*). So wurden Spikes, Polyspikes, Spike-Wave Komplexe und dreiphasige Wellen aufgezeichnet, die eine Dysfunktion des Gehirns während der Phasen der akuten Enzephalopathie belegen. Das EEG integriert die elektrische Aktivität von großen Neuronenverbänden in vivo. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein analoger Effekt dieser klinischen diagnostischen Merkmale in kultivierten neuronalen Netzwerken messbar ist. Als sensitive Messgröße zum Nachweis des Effektes von Leuzin und KIC erwies sich die spontane intrinsische Netzwerkaktivität von primären embryonalen Rattenzellen. Zur Beschreibung der Messgröße wurde das Modell der intrinsischen Aktivitätszustände des neuronalen Netzwerkes von *Mager (2000)* genutzt. Der Aktivitätszustand II in diesem Modell ist gekennzeichnet durch das Auftreten regelmäßiger periodischer Depolarisationen, ausgehend von Phasen dicht aufeinanderfolgender Aktionspotenziale. Die Frequenz der Depolarisationen ist abhängig von präsynaptischen, wie auch postsynaptischen neuronalen Eigenschaften. Änderungen in mindestens einer dieser Eigenschaften führen zu einer Änderung der Frequenz. Die Frequenz des Stadiums II kann somit als Prüfgröße für Störungen durch Ionenänderungen oder neuronal wirksamer Substanzen genutzt werden, die bei Messungen einer Einzelzelle eine geringe Relevanz und erst nach Integration im neuronalen Netzwerk zur signifikanten Verhaltensänderung führen. Durch die Einflussgröße der synaptischen Effizienz können Effekte erfasst werden, wie die präsynaptische Wirkung einer Substanz und deren Einfluss auf die Neurotransmittersynthese, die mit herkömmlichen elektrophysiologischen Messtechniken schwer zu ermitteln sind.

Unter Einfluss sowohl von Leuzin als auch von KIC war eine Abnahme der Frequenz der periodischen Depolarisationen zu detektieren, die schließlich bei einer Konzentration von 10 mmol/l zum Erliegen kam. Die Frequenzänderungen lagen im Bereich der klinisch relevanten Konzentrationen von 1 mmol/l bis 10 mmol/l. Sie zeigten ebenso wie die zentralnervöse Symptomatik der MSUD eine Progredienz mit steigender Frequenzabnahme bei steigenden Konzentrationen von Leuzin und KIC und waren ebenso wie die klinische Symptomatik reversibel.

Die kurze Zeitkinetik von wenigen Sekunden mit der Leuzin und KIC auf die Aktivität eines neuronalen Netzes wirken, weist auf eine Störung des enzymatischen Stoffwechsels hin und schließt eine Störung der Proteinsynthese (*Appel 1966*) aus. Die Reversibilität der Wirkung macht eine Störung von Enzymen durch kovalente Effekte unwahrscheinlich, da diese zu einer andauernden Frequenzabnahme führen müssten. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass sich nach Applikation von Leuzin und KIC die Frequenz der periodischen Depolarisation auf niedrigerem Niveau stabilisiert und keine weitere Abnahme zeigt. Eine irreversible Schädigung eines zellulären Bestandteils oder eines Enzyms hätte eine akkumulative Wirkung zur Folge und würde zu einer progredienten Abnahme der Frequenz führen. Dieses spricht dafür, dass der Frequenzänderung ein Mechanismus zu Grunde liegt, wie er von enzymatischen biochemischen Gleichgewichtsreaktionen bekannt ist.

4.1 Die zentrale Rolle des präsynaptischen Leuzin-KIC Gleichgewichts in der Pathogenese der Ahornsirupkrankheit

Korein J et al. (1994) postulierten zur Pathogenese der MSUD, dass Leuzin und KIC das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen Glutamat, α -Ketoglutarat und GABA verschieben. Er folgerte, dass die Verarmung an neuronalen Glutamat, GABA und Glutamin die Hauptursache der neurologischen Symptomatik sei. Aus Belastungsversuchen an Patienten unter EEG Kontrolle leitete er eine Analogie zu einer GABA Verminderung ab. Welche Konzentrationen an Neurotransmittern sich im zentralen Nervensystem in der akuten klinischen Situation tatsächlich einstellen, wurde bisher noch nicht untersucht.

Der Synthese von Glutamat liegt eine enzymatische Transaminierungsreaktion zu Grunde. Dabei wird die Aminogruppe von Leuzin auf α -Ketoglutarat übertragen, wodurch Glutamat und KIC entstehen (*Yudkoff 1997*). Bei einer Transaminierungsreaktion gilt für die beteiligten Substanzen die Gleichgewichtskonstante K (*Stryer 1988*), in diesem Fall also:

$$K = \frac{[\text{Leuzin}] \times [\alpha\text{-Ketoglutarat}]}{[\text{Glutamat}] \times [\text{KIC}]}, \text{ wobei } [X] = \text{Konzentration an X.}$$

Aus der Gleichgewichtskonstanten der Transaminierungsreaktionen kann gefolgert werden, dass bei einer äquimolaren Applikation von Leuzin und KIC sich der jeweilige Einfluss auf Verschiebungen im Konzentrationsgleichgewicht zumindest teilweise kompensieren sollte. Das wurde in dieser Arbeit bestätigt: Trotz Verdoppelung der Gesamtmenge beider zugesetzter Substanzen von 5 mmol/l auf 10 mmol/l zeigte sich bei gemeinsamer Applikation von Leuzin und KIC eine geringere Abnahme der Frequenz der Depolarisationen, als die jeweilige separate Applikation. Das Frequenzniveau der Kontrolle wurde jedoch nicht wieder erreicht. Eine Erklärung wäre, dass das äquimolare Verhältnis zwischen Leuzin und KIC nicht dem physiologischen Verhältnis im Liquor entspricht. Weiterhin ist zu bedenken, dass die für die neuronale Funktion wichtige Justierung des intrazellulären Glutamat- α -Ketoglutaratverhältnisses durch die erhöhten Substratkonzentrationen von Leuzin und KIC nicht fein genug sein kann. Die entsprechende Transaminase oder deren Cofaktor Pyridoxalphosphat könnten abgesättigt sein und so zu einer Änderung der gesamten Transaminierungskinetik führen.

Bei einer alleinigen Erhöhung der Konzentration von KIC würde aus dem Gleichgewichtsmodell eine Abnahme von Glutamat, sowie eine Zunahme von α -Ketoglutarat und Leuzin folgen. Einem Neuron stünde in diesem Fall weniger Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter zur Verfügung. Daraus würde eine Reduktion der synaptischen Effizienz resultieren. Dieses steht im Einklang mit der in dieser Arbeit gezeigten Verminderung der Depolarisationsfrequenz im Aktivitätszustand II bei Inkubation mit erhöhten Konzentrationen von KIC. Von *Robinson HPC et al. (1993)* wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Reduktion der synaptischen Effizienz durch die Applikation von CNQX und APV als spezifische Glutamatrezeptorinhibitoren zu einer Abnahme der intrinsischen neuronalen Netzwerkaktivität führt.

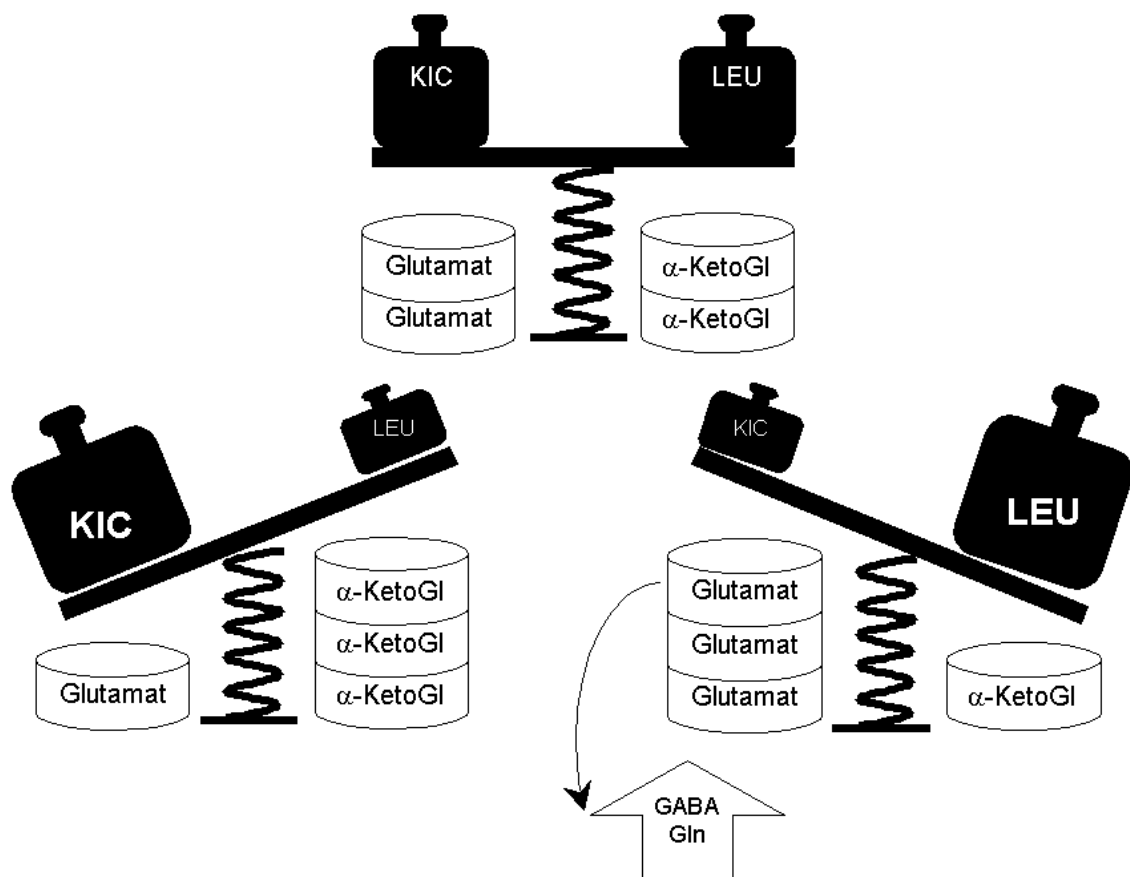


Abb 4.1.) **Modell zur Wirkung von Leuzin und KIC auf die Konzentration von α-Ketoglutarat, Glutamat und GABA.** Unter physiologischen Bedingungen stehen Leuzin, KIC, Glutamat und α-Ketoglutarat im Gleichgewicht (siehe oben). Die Verschiebung des Gleichgewichts bei Erhöhung von KIC führt zu einer Abnahme von Glutamat, denn Glutamat wird als Aminogruppendonor für die benötigten Aminogruppen zur Transaminierung von KIC zu Leuzin genutzt (siehe links unten). Eine Erhöhung von Leuzin führt durch eine verstärkte Transaminierung von α-Ketoglutarat zu Glutamat zu einer Zunahme von Glutamat. Dieses kann als Substrat für die Synthese von Glutamin und GABA genutzt werden (siehe rechts unten).

Bei einer Erhöhung der Konzentration von Leuzin ist mit einer Abnahme von α-Ketoglutarat und einer Zunahme von Glutamat und KIC zu rechnen. Einem Neuron stünde somit vermehrt exzitatorisch wirkendes Glutamat zur Verfügung. Experimentell konnte jedoch keine Zunahme der Depolarisationsfrequenz im Aktivitätszustandes II gezeigt werden, wie es zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung für die gemessene Abnahme der Depolarisationsfrequenz ist, dass überschüssiges Glutamat zu einer vermehrten Synthese von GABA führen könnte (*Waagepetersen et al. 1999*). Eine entsprechende inhibitorische Wirkung auf die intrinsische neuronale Netzwerkaktivität wurde durch Aktivierung von GABA-Rezeptoren mit Muscimol beschrieben (*Robinson HPC et al. 1993*). Weiterhin wäre es möglich, dass durch massiven Anstieg von Glutamat übermäßig

viele Glutamatrezeptoren desensitiviert werden könnten (*Hatt 1999*), was zu einer Abnahme der neuronalen Erregbarkeit führen würde und so die intrinsische Netzwerkaktivität verringern könnte.

Für den Pathomechanismus der Enzephalopathie der MSUD ist abzuleiten, dass intraneural unphysiologische Verhältnisse von Leuzin und KIC vorhanden sind. Daraus folgt eine Änderung der Glutamat und GABA Konzentrationen mit Änderungen der neuronalen Netzwerkaktivität.

Die Wirkung von erhöhten Konzentrationen von Leuzin und KIC auf postsynaptische Eigenschaften war bisher nicht bekannt. Die große Ähnlichkeit zwischen klinischem Bild von postsynaptisch wirkenden Pharmaka und Toxinen und dem Einfluss von Leuzin und KIC ließ eine Überprüfung der postsynaptischen neuronalen Funktion notwendig erscheinen. Der Anteil der Wirkung von Leuzin und KIC auf postsynaptische Eigenschaften wird im Folgenden bewertet.

4.2 Die Integrität von Neuronen bleibt unter dem Einfluss von Leuzin und KIC erhalten

Im Aktivitätszustand I mit unregelmäßiger und geringer Anzahl an Aktionspotenzialen war unter dem Einfluss von Leuzin und KIC keine Änderung im neuronalen Verhalten zu detektieren. Zusammen mit fehlenden Einflüssen auf das Ruhepotenzial spricht dieses Verhalten gegen eine Destabilisierung der neuronalen Membran oder eine Änderung des Energiehaushalts. Ein Neuron ist somit potenziell auch im Stadium der Enzephalopathie unter den Bedingungen der erhöhten Leuzin und KIC Konzentrationen in der Lage elektrophysiologische Funktionen auszuführen. Die Erhaltung der neuronalen Integrität unter dem Einfluss von Leuzin und KIC ist im Einklang mit der metabolischen Enzephalopathie, bei der die komplette Restitution in relativ kurzer Zeit (*Wendel et al. 1980*) gegen eine strukturelle Veränderung spricht. Die Beobachtungen von *Jouvet et al. (2000)*, wonach es zu einer Induktion der Apoptose unter dem Einfluss von KIC kommt, konnte in der von uns verwendeten Zellkultur nicht bestätigt werden. An der Arbeit von *Jouvet et al. (2000)* wäre jedoch kritisch anzumerken, dass die Konzentrationen von KIC mit 50 mmol/l weit über den bekannten Enzephalopathie auslösenden Werten liegt. Die Reversibilität der Enzephalopathie bei MSUD spricht gegen die Relevanz dieser Daten.

Eine direkte Aktivierung oder Inhibierung von Liganden-gesteuerter Ionenkanälen durch Leuzin und KIC in erhöhten Konzentrationen wurde ebenfalls ausgeschlossen: Der Calciumstrom, der durch KIC an Pankreaszellen induziert wird (*Duchen et al. 1993, Komatsu et al. 1995, Martin et al. 1995*), findet keine Analogie in der Aktivierung von

Glutamatrezeptoren an neuronalen Zellen. So scheint die NMDA-Bindedomäne für Leuzin, Isoleuzin und Valin (*Krupp et al. 1992*) keine Bedeutung für eine pathologische Wirkung von Leuzin oder KIC zu haben. Weder die GABA-Rezeptoren, trotz ihrer mannigfaltigen Bindungsmöglichkeiten für Pharmaka und Toxine (*Sieghart 1992*), noch die ihnen verwandten Glyzinrezeptoren (*Breitinger und Becker 1998*) stellen ein Wirkort für Leuzin und KIC dar. Der spannungsabhängige Natriumkanal konnte als Wirkort von Leuzin und KIC ausgeschlossen werden, da weder der maximale Stromfluss noch die funktionelle Eigenschaft der Inaktivierung eine signifikante Änderung des Natriumstromes zeigten.

Die in dieser Arbeit gezeigte Resistenz der Ionenkanäle gegenüber Leuzin und KIC steht im Einklang mit der Hypothese von *Yudkoff (1997)*. Er sieht in Leuzin und KIC ein mögliches Transport- und Puffersystem für den Austausch von cerebralen Aminogruppen, die insbesondere zur Synthese des exzitatorischen Glutamats benötigt werden. Er stellte an ein solches Transportsystem die Bedingung, dass es die neuronale Funktion nicht beeinflussen sollte. So stützt der in dieser Arbeit geführte Nachweis eines fehlenden Einflusses von Leuzin und KIC auf die postsynaptischen Ionenkanäle die Hypothese von Leuzin und KIC als cerebrales Aminogruppen-Transportsystem für die Neurotransmittersynthese.

4.3 Die astrozytäre Beteiligung an der Pathophysiologie der Ahornsirupkrankheit ist gering

Um die Bedeutung einer Beeinträchtigung der Funktion von Astrozyten an der Enzephalopathie der MSUD zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit das Ruhepotenzial von Astrozyten unter Einfluss von 10 mmol/l Leuzin und 10 mmol/l KIC gemessen. Dabei zeigte sich, dass die von *Land et al. (1976)* und *McKenna et al. (1998)* diskutierte Beeinträchtigung des Zitratzyklus unter Einfluss von KIC nicht die Ursache der akuten klinischen Symptomatik zu sein scheint. In diesem Fall wäre eine signifikante Änderung des Ruhepotenzials zu erwarten gewesen, weil Reduktionsäquivalente zur Erhaltung des Ionengradienten durch die Natrium-Kaliumpumpe erforderlich sind. Eine akute Destabilisierung der Astrozytenmembran durch Leuzin und KIC konnte damit ebenso ausgeschlossen werden, da auch diese zu einer Änderung des Ruhemembranpotenzials führen müsste. Daher ist zu vermuten, dass das an verstorbenen Patienten festgestellte Hirnödem (*Rivello et al. 1991*) vielleicht eine Folge der metabolischen Acidose als einen ursächlichen Mechanismus der MSUD widerspiegelt.

Ob sich die Verschiebungen des Leuzin-Glutamat Gleichgewichts nur auf den neuronalen Glutamathaushalt auswirkt, konnte nicht beurteilt werden, denn die untersuchten

neuronalen Zellkulturen beinhaltet einen zellulären Anteil von ca. 30 % an Astrozyten. Da die Astrozyten durch Glutaminsynthese die Bereitstellung von Glutamat für die Neurone sichern, kann die diskutierte Verschiebung im Glutamathaushalt teilweise von Astrozyten hervorgerufen sein.

4.4 Die klinische Kompatibilität mit den experimentellen Ergebnissen

Aus dem oben Gezeigten folgt, dass die Hauptursache der metabolischen Enzephalopathie in dem Ungleichgewicht der Konzentrationen von Leuzin und KIC liegt. Dieses führt zu einer Änderung der Kinetik der glutamatergen Neurotransmitter mit Auswirkung auf die neuronale Netzwerkfunktion.

Im Folgenden wird ein Modell zur möglichen Pathogenese der Enzephalopathie bei MSUD skizziert: Der akuten Enzephalopathie liegt eine katabole Stoffwechsellage zu Grunde, die erst zu einem Anstieg von Leuzin und KIC im Serum führt, bevor es zu einer Zunahme der Metabolite im Liquor kommt, da dort weniger katabole Prozesse ablaufen als in der Peripherie. Ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung des Verhältnisses zwischen Leuzin und KIC im Liquor kommt danach der Blut-Hirn-Schranke zu. Dabei wird Leuzin mit einem K_m von 0,18 mM bei V_{max} 6,3 nmol/mg/min erheblich schneller (*Audus und Borchardt 1986*) als KIC mit einem K_m von 0,6 mM bei V_{max} 0,073 nmol/mg/min (*Conn und Steele 1982*) aufgenommen. Um das intracerebrale Gleichgewicht zwischen Leuzin und KIC wieder herzustellen, müsste im Gehirn eine große Menge KIC aus Leuzin synthetisiert werden. Daraus würde eine erhöhte Transaminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat resultieren mit nachfolgender pathologischer Erhöhung der Glutamatkonzentration und neuronaler Dysfunktion, die sich in einer Enzephalopathie klinisch manifestiert.

Die hohe Variabilität der Leuzin und KIC Konzentrationen, die eine neurologische Symptomatik auslösen, könnte mit diesem Modell erklärt werden. Es gibt Patienten, die in der Restitutionsphase der Enzephalopathie bei einer Plasmakonzentration von bis zu 2,6 mmol/l Leuzin neurologisch unauffällig sind, wohingegen andere bei diesen Werten das Vollbild einer Enzephalopathie zeigen (*Wajner et al. 2000*). Wahrscheinlich bleibt bei ihnen aufgrund günstigerer Transportkinetiken ein physiologisches Verhältnis von Leuzin und KIC im Hirngewebe erhalten. Ebenso könnte die Adaption von Patienten an erhöhte Konzentrationen von Leuzin und KIC erklärt werden, die bei akutem Auftreten tödlich sind.

Für die Therapie der Enzephalopathie ist von zentral wirkenden Glutamat- oder GABA-Antagonisten abzuraten, da diese die funktionelle Dysbalance im ZNS noch verstärken. Im Rahmen der akuten klinischen Krise ist zu erwarten, dass zentral wirkende Pharmaka keinen großen Einfluss auf den gestörten Neurotransmitterhaushalt haben, denn die meisten binden an Rezeptoren und ändern daher nichts an der kausalen Dysfunktion des Neurotransmitterstoffwechsels. Für die Überwachung von Patienten im akuten Stadium bleibt festzuhalten, dass nicht nur die absoluten Konzentrationen von Leuzin und KIC die Symptomatik triggern, sondern auch deren Verhältnis Berücksichtigung finden sollte.

Vor diesem Hintergrund ist das therapeutische Prinzip der Hämofiltration ebenso eine kausale sinnvolle Therapie, wie die diätetische Reduktion der BCAA und BCKA, da dadurch Leuzin und KIC wieder in ein physiologisches Gleichgewicht gebracht werden und in Konzentrationsbereichen liegen, welche die Synthese der glutamatergen Neurotransmitter am geringsten beeinträchtigen.

4.5 Ausblick

Das hier angewandte Modell der intrinsischen neuronalen Netzwerkaktivität lässt sich zu einer weiteren Überprüfung der Wirkung von Leuzin und KIC nutzen. So könnte es ein überphysiologisches, jedoch komplett kompensatorisches Verhältnis von Leuzin und KIC geben, bei dem keine Änderung der intrinsischen Aktivität zu erwarten wäre. Ebenso könnte ein maximaler Schwellenwert der Leuzin und KIC Konzentrationen existieren, bei dem der Transaminierungsmechanismus auf Grund der erhöhten Substanzkonzentrationen aus dem Gleichgewicht kommt. Mit Beeinflussung der Glutamat- und GABA-Wirkung durch Glutamatantagonisten oder -agonisten könnte überprüft werden, ob es zu Interaktionen auf die Netzwerkaktivität in Konkurrenz zu Leuzin und KIC kommt. Bei erhöhter KIC Konzentration wäre mit einer Kompensation der Abnahme der Depolarisationsfrequenz durch Glutamat-Agonisten und bei erhöhter Leuzinkonzentration mit einer Kompensation durch Glutamat- und GABA-Antagonisten zu rechnen.

Mit biochemischen Untersuchungen könnten die aufgezeigten Hypothesen ergänzt werden. So wäre eine Analyse der neuronalen Glutamat-, GABA- und Glutaminkonzentrationen in vitro unter Leuzin und KIC von Interesse. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Änderungen in den Glutamatkonzentrationen so gering sein könnten, dass sie mit gängigen biochemischen Methoden nicht erfassbar sind. Für eine Dysfunktion des neuronalen Verbandes würde es schon genügen, wenn die Kinetik der Neurotransmittersynthese gestört werden würde.

Die elektrophysiologisch gemessenen Effekte, die sich mit Spiegeln von Leuzin und KIC im Gehirn erklären lassen, wie sie tatsächlich bei der Enzephalopathie der MSUD vorkommen, sind Ergebnisse eines Modells, mit dem sich in Zukunft weitere Enzephalopathie auslösende Substanzen untersuchen lassen.

5 Literaturverzeichnis

Allert N, Köller H, Siebler M (1998) Ammonia-induced depolarisation of cultured cortical astrocytes. *Brain Res* 782: 261-270

American Academy of Pediatrics Committee on Genetics (1996) Newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 98: 473-501.

Appel SH (1966) Inhibition of brain protein synthesis: an approach to the biochemical basis of neurological dysfunction in the amino-acidurias. *Trans N Y Acad Sci* 29: 63-70

Audus KL, Borchardt RT (1988) Characteristics of large neutral amino acid transport system of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers *J Neurochem* 47: 484-488

Backus KH, Pflimlin P, Trube G (1991) Action of Diazepam on the voltage-dependent Na⁺ current. Comparison with the effects of phenytoin, carbamazepine, lidocaine and flumazenil. *Brain Research* 548: 41-49

Bayer SA, Altman J (1990) Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol* 107: 48-62

Biggemann B, Zass R, Wendel U (1993) Postoperative metabolic decompensation in maple syrup urine disease is completely prevented by insulin. *J Inher Metab Dis* 16: 912-913

Biscoe TJ, Duchen MR (1985) Actions and interactions of GABA and benzodiazepines in the mouse hippocampal slice. *Q J Exp Physiol* 70: 313-328

Bodner-Leidecker A (2000) Stoffwechsel verzweigtkettiger L-Aminosäuren bei der Ahornsirupkrankheit. Inaugural Dissertation Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat cell line in serum-free supplemented medium *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 514-517

Breitinger HG, Becker CM (1998) The Inhibitory Glycine Receptor: Prospects for a Therapeutic Orphan? *Curr Pharm Des* 4: 315-334

Brewer GJ, Cotman CW (1989) Survival and growth of defined hippocampal neurons in medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res* 194: 65-74

Chuang DT, Ku LS SK, Cox RP (1982) Thiamine-Responsive MSUD: decreased affinity of the mutant branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase for alpha-ketoisovalerate and thiamin pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3300-3304

Conn AR, Steele RD (1982) Transport of alpha-keto analogues of amino acids across blood-brain barrier in rats. *Am J Physiol* 243: E272-E277

Costa FC (1996) The kinetic parameters of sodium currents in maturing rat hippocampal CA1 neurons. *Dev Brain Res* 91: 29-40

Danner JD, Doering CB (1998) Human mutations affecting branched chain α -ketoacid dehydrogenase. *Front Biosci* 3: 517-524

Dichter MA (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* 149 (2): 279-193

Dodd PR, Scott HW, Gundlach AL, Harper PAW, Healy PJ, Dennis JA, Johnston GAR (1992) Glutamate and γ -Aminobutyric Acid Neurotransmitter Systems in the Acute Phase of MSUD and Citrullinemia Encephalopathies in Newborn Calves. *J Neurochem* 59: 582-590

Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM (1993) Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic β -cells. *Biochem J* 294: 35-42

Eaholtz G, Zagotta WN, Catterall WA (1998) Kinetic Analysis of Block of open Sodium Channels by a Peptide Containing the Isoleucine, Phenylalanine, and Methionine (IFM) Motif from the Inactivation Gate. *J Gen Physiol* 111: 75-82

Eckert R, Randall D (1997) *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptions*. 4th edition WH Freeman & Co., San Francisco, CA; ISBN: 0716724146

Felber SR, Sperl W, Chemelli A, Murr C, Wendel U (1993) Maple syrup urine disease: metabolic decompensation monitored by proton resonance imaging and spectroscopy. *Ann Neurol* 33: 396-401

Filatov GN, Nguyen TP, Kraner SD, Barch RL (1998) Inactivation and Secondary Structure in the D4/S4-5 Region of the SkM 1 Sodium Channel. *J Gen Physiol* 111: 703-715

Forsyth RJ (1996) Astrocytes and the Delivery of Glucose from Plasma to Neurons. *Neurochem Int* 28: 231-241

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100

Hatt H (1999) Modification of glutamate receptor channels: molecular mechanisms and functional consequences. *Naturwissenschaften* 86: 177-186

Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliss F, vom Dahl S (2000) Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *Biol Chem* 381: 487-495

Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57: 417-428

Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA; ISBN 0-87893-323-9

Ishizawa Y, Kishio F, Shunichi Y, Shuji D (1997) Non GABA-ergic effects of midazolam, diazepam and flumanezil on voltage dependent ion currents in NG108-15 cells. *Neuroreport* 8; 2635-2638

Jouvet P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Kozma M, Greenwood K, Edwards AD, Mehmet H (2000). Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell* 11: 1919-1932

- Juthberg SK, Brismar T (1997) Effect of metabolic inhibitors on membrane potential and ion conductance of rat astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 17: 367-377
- Kanamori K, Ross BD, Kondrat RW (1998) Rate of Glutamate Synthesis from Leucine in Rat Brain Measured In Vivo by ^{15}N NMR. *J Neurochem* 70: 1304-1315
- Köller H, Buchholz J, Siebler M (1996) Cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patient inactivates Na^+ current. *Brain* 119: 457-463
- Köller H, Siebler M, Schmalenbach C, Müller HW (1990) GABA and Glutamate Receptor Development of cultured Neurons from Rat Hippocampus, Septal Region and Neocortex. *Synapse* 5: 59-64
- Köller H, Siebler M, Schmalenbach C, Müller HW (1990) Electrophysiological properties of rat septal region neurons during development in culture. *Brain Res* 509: 85-90
- Köller H, Thiem K, Siebler M (1996) Tumor necrosis factor- α increases intracellular Ca^{2+} and induces a depolarization in cultured astroglial cells. *Brain* 119: 2021-2027
- Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Sharp GWG (1995). Glucose stimulation of insulin in the absence of extracellular Ca^{2+} and in the absence of any increase in intracellular Ca^{2+} in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10728-10732
- Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J, Lange B (1994) Maple syrup urine disease: Clinical, EEG, and plasma amino acid correlatios with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Intern J Neuroscience* 79: 21-45
- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1998) N-Terminal Domains in the NR2 Subunit Control Desensitization of NMDA Receptors. *Neuron* 20: 317-327
- Land MJ, Mowbray J, Clarke JB (1976) Control of pyruvate and beta-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonurie and MSUD. *J Neurochem* 26: 823-860
- Mager S (2000) Intrinsische Aktivitätsmuster neuronaler Netzwerke. Inaugural Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Martin F, Sanchez-Andres JV, Soria B (1995) Slow $[Ca^{2+}]$ -Oscillations Induced by Ketoisocaproate in single Mouse Pancreatic Islets. *Diabetes* 44: 300-305

Matthiessen HP, Schmalenbach C, Mueller HW (1989) Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 2: 177-188

McBain CJ, Mayer ML (1994) N-Methyl-D-Aspartic Receptor Structure and Function. *Physiol Rev* 74: 723-760

McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Johnsen SF, Sande L, Zielke HR (1998) α -Ketoisocaproate alters the production of both lactate and aspartate from $[U-^{13}C]$ glutamate in astrocytes: a ^{13}C NMR study. *J Neurochem* 70: 1001-1007

Menkes JH, Hurst PL, Craig JM (1954) A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14: 462-466

Mueller K, Kahn T, Wendel U (1993) Is demyelination a feature of maple syrup urine disease? *Pediatr Neurol* 9: 375-382

Müller HW, Seifert W (1982) A neurotrophic factor (NTF) released from primary glial cultures supports survival and fiber outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 8 (2-3): 195-204

Ogata N, Tatebayashi H (1990) Sodium current kinetics in freshly isolated neostriatal neurones of the adult guinea pig. *Pflügers Arch* 416: 594-603

Patel SM, Harris RA (1995) Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes: Gene regulation and genetic defects. *FASB J* 9: 1164-1172

Podebrad F, Heil M, Reichert S, Mosandl A, Sewell AC, Bohles H (1999) H₄,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone)--the odour of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 22: 107-114.

Riviello JJ, Rezvani I, DiGeorge A, Foley CM (1991) Cerebral edema causing death in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr* 119: 42-45

- Robinson HPC, Kawahra M, Jimbo Y, Torimitsu K, Kuroda Y, Kawana A (1993) Periodic Synchronized Bursting and Intracellular Calcium Transients Elicited by Low Magnesium in Cultured Cortical Neurons. *J Neurophysiol* 70: 1606-1616
- Rose G, Siebler M (1995) Cooperative effects of neuronal ensembles. *Exp Brain Res* 106: 106-110
- Sakmann B, Neher E (1995) Single-channel recording. Plenum Press, New York. ISBN 0-306-41419-8
- Schadewaldt P, Wendel U (1997) Metabolism of branched-chain amino acid in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 156: 62-66
- Schmalenbach C, Müller HW (1993) Astroglia-neuron interactions that promote long-term neuronal survival. *J Chem Neuroanat* 6: 229-237
- Schwahn B, Wendel U, Kugel H (2000) Cerebral quantitation by proton magnetic resonance spectroscopy in patients with maple sirup urine disese. *J Inherit Metab Dis* 23 Suppl 1
- Seeburg PH (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Tips* 14: 297-303
- Seymor CA, Thomason MJ, Chalmers RA, Addison GM, Bain MD, Cockburn F, Littlejohns P, Lord J, Wilcox AH (1997) Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review. *Health Technol Assess.* 1997: 9-35
- Siebler M, Pekel M, Köller H, Müller HW (1993) Strychnine-sensitive glycine receptors in cultured primary neurons from rat neocortex. *Brain Res Dev Brain Res* 73: 289-292
- Sieghart W (1992) GABAA receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *TiPS* 13: 446-450
- Smith QR, Momma S, Aoyagi, Rapoport SI (1987). Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barriere. *J Neurochem* 49: 1651-1658
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E, Holt LE (1964) Maple syrup urine disease, with paticular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34: 454-462

Stichel CC, Müller HW (1992) Expression of inherent neuronal shape characteristics after transient sensitivity to epigenetic factors. *Brain Res Dev Brain Res* 68:149-162

Stryer L (1988) *Biochemistry* WH Freeman & Co., New York; ISBN: 0-7167-1920

Taylor CP, Narasimhan LS (1997) Sodium channels and Therapy of Central Nervous System Diseases. *Advances in Pharmacology* 39: 47-98

Thompson GN, Bresson JL, Pacy PJ, Bonnefont JP, Walter JH, Leonard JV, Saudubray JM, Halliday D (1990) Protein and leucine metabolism in maple syrup urine disease. *Am J Physiol* 258: 654-660

Treacy E, Clow CI, Reade TR, Chitayt D, Mamer OA, Scriver CR (1992) Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis* 15: 121-135

Van den Berg RJ, Kok P, Voskuyl (1993) Valproate and sodium currents in cultured hippocampal neurons. *Exp Brain Res* 93: 279-287

Velazquez A, Vela-Amieva M, Ciceron-Arellano I, Ibarra-Gonzalez I, Perze-Andrade M, Olivares-Sandoval Z, Jimenez-Sanchez G (2000) Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. *Arch Med Res* 31: 145-150

Waagepetersen HS, Sonnewald U, Schousboe A (1999) The GABA Paradox: Multiple Roles as Metabolite, Neurotransmitter, and Neurodifferentiative Agent. *J Neurochem* 73: 1335-1342.

Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, Araujo PR, Pires, Lulhier FLG, Vargas CR (2000) Reduction of large neural amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crisis. *J Inherit Metab Dis* 23: 505-512

Wendel U, Becker K, Przyrembel H, Bulla M, Manegold C, Mench-Hoinowski A, Langenbeck U (1980) Peritoneal dialysis in maple-syrup-urine disease: studies on branched-chain amino and keto acids. *Eur J Pediatr* 134: 57-63

Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982) Exchange transfusion in acute episodes of maple syrup urine disease. Studies on branched-chain amino and keto acids. *Eur J Pediatr* 138: 293-296

Wendel U, Saudubray JM, Bodner A, Schadewaldt P (1999a) Liver transplantation in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* Dec 158: 60-64

Wendel U, Schwahn B, Lang F, Helbling C, Schadewaldt P (1999b) Ahornsirupkrankheit= Maple Syrup Urine Disease (MSUD) Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik und Behandlung. Informationsbroschüre erhältlich bei MILUPA Bahnstr. 14-30 61281 Friedrichsdorf

Westall RG, Dancis J, Miller S (1957) Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child* 94: 571-572

Westall RG (1963) Dietary treatment of a child with maple syrup urine disease (branched chain ketoaciduria). *Arch Dis Child*. 38: 485

Yudkoff M, Daikhin Y, Lin ZP, Nissim I, Stern J, Pleasure D, Nissim I (1994) Interrelationship of Leucine and Glutamate Metabolism in Cultured Astrocytes. *J Neurochem* 62: 1192-1202

Yudkoff M. (1997) Brain Metabolism of Branched-Chain Amino Acids. *Glia* 21: 92-98

Zhang B, Edenberg HJ, Crabb DW, Harris RA (1989) Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 83: 1425-1429

Zielke HR, Huang Y, Baab PJ, Collins JR, Zielke CL, Tildon JT (1997) Effect of alpha-ketoisocaproate on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain: *Neurochem Res* 22: 1159-1164

6 Erklärungen

APV	(+/-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	Verzweigtkettige Aminosäure
BCAT	Verzweigtkettige Ketonsäuren Aminotransferase
BCKA	Verzweigtkettige Ketonsäure
BCKAD	Verzweigtkettige Aminosäuren Dehydrogenase
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
EEG	Elektroenzephalografie
FKS	Fetales Kälber Serum
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GDC	Glutamatdecarboxylase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GlnSy	Glutaminsynthetase
HAM	Nutrient mixture F12
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazine-N-(2-Ethansulfonic acid)
KIC	α -Ketoisocaproinsäure
KIV	α -Keto-isovaleriansäure
K_m	halbe Substratkonzentration für maximale Reaktionsgeschwindigkeit
KMV	α -Keto- β -methylvaleriansäure
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LNNA	Langkettige neutrale Aminosäure
MAP-2	Microtubule associated protein 2
MSUD	Ahornsirupkrankheit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinucleotid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Kernspinresonanz
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDL	poly-D-Lysin
QX 314	Lidocain N-ethyl Bromid
SD	Standardabweichung
TTX	Tetrodotoxin
V_{max}	Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratüberschuss
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:	Name:	Philipp Görtz
	geboren am:	06.05.1967 in Düsseldorf
Schulausbildung:	1973-1977	Grundschule Hochdahl-West
	1977-1986	Gymnasium Hochdahl; Abschluss: allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	1986-1988	Zivildienst am „Benninghof Mettmann, Heim und Pflegeanstalt für geistig behinderte Menschen“
Studium:	1988-1994	Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Diplomarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie Düsseldorf Abschluss: Diplom Biologe
	1994-1996	Medizin: Vorklinik und Physikum an der Ruhr-Universität Bochum
	1996-1997	Erster klinischer Studienabschnitt und 1. Staatsexamen an der Universität und Gesamthochschule Essen
	1997-1999	Zweiter klinischer Studienabschnitt und 2. Staatsexamen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	1999-2000	Praktisches Jahr und 3. Staatsexamen am Klinikum Wuppertal Barmen; Wahlfach: Pädiatrie
	2001	Arzt im Praktikum an der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mario Siebler für die sehr gute Betreuung und seine ansteckende motivationsfördernde Begeisterung für das elektrophysiologische Experimentieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wendel für die Initiation der Arbeit und die Beratung bezüglich biochemischer und klinischer Aspekte.

Eine große Hilfe waren mir die zahlreichen Diskussionen mit Herrn Dr. rer. nat. Sascha Mager, der mit seinem Modell der intrinsischen Netzwerkaktivität und viel technischer Unterstützung eine Grundlage für die Ergebnisse dieser Arbeit schuf.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Brigida Ziegler für ihre ausgezeichnete und unübertroffene Zellkulturarbeit.

Herrn PD Dr. Hubertus Köller danke ich für die Unterstützung bei der Patch-Clamp-Technik.

Ein weiterer Dank an alle Mitarbeiter des neurochemischen Labors, die eine angenehme Arbeitsatmosphäre ermöglichten.

ABSTRACT:

Enzephalopathie bei Ahornsirupkrankheit: Neurophysiologische Effekte von Leuzin und α -Ketoisocapronsäure Inauguraldissertation von Philipp Görtz

Die MSUD (Ahornsirupkrankheit) ist eine genetisch determinierte Stoffwechselkrankheit, die durch erhöhte Konzentrationen von Leuzin und KIC (α -Ketoisocapronsäure) im Serum und Liquor gekennzeichnet ist. Bei Kindern führt sie unbehandelt zu einer akuten Enzephalopathie mit Somnolenz, Sopor, Koma und möglichem letalem Ausgang. Therapie der Wahl ist die frühzeitige Reduktion der erhöhten Metabolite, welche zur funktionellen Restitution ohne strukturelle Hirnschädigung führt. Die neurophysiologischen Pathomechanismen sind bisher nicht geklärt und Thema der vorliegenden experimentellen Arbeit.

An primären dissoziierten Kulturen embryonaler Hippocampus und Cortexneuronen und primären Astrozyten von Wistar-Ratten wurde die Wirkung von extrazellulärem Leuzin und KIC auf deren elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurden sowohl die Änderungen der spontanen Aktivität des neuronalen Netzwerkverbandes als auch neurophysiologische Eigenschaften der Einzelzelle (Ruhemembranpotenzial, spannungsaktivierte und Liganden-gesteuerte Ionenkanäle) systematisch untersucht.

Sowohl Leuzin als auch KIC (>1 mmol/l) reduzieren dosisabhängig und reversibel in Konzentrationen, wie sie auch im Liquor während der akuten Enzephalopathie bei MSUD auftreten, die Rate spontaner netzwerkgetriebener Aktionspotenziale von hippocampalen Neuronen. Die simultane Exposition von Leuzin und KIC führt nicht zu einem additiven blockierenden, sondern sich gegenseitig antagonisierendem Effekt. Das Ruhemembranpotenzial von Neuronen und Astrozyten wird weder von Leuzin (10 mmol/l) noch von KIC (10 mmol/l) signifikant verändert. Die Form der spontanen Aktionspotenziale als auch die Inaktivierungskurve des spannungsabhängigen Natriumkanals sind in Badlösungen von Leuzin (10 mmol/l) und KIC (10 mmol/l) unverändert. Ebenso wurden normale Membranströme nach lokaler Applikation von GABA (γ -Amino-Buttersäure), Glyzin, Glutamat und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) auf das postsynaptische Neuron in Anwesenheit von Leuzin und KIC gemessen.

Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Aminosäuren Leuzin und KIC ab Konzentrationen von 1 mmol/l einen reversiblen Effekt auf die Spontanaktivität des neuronalen Netzwerkes ausüben. Dieser ist weder durch direkte Veränderungen spannungsabhängiger noch durch postsynaptische Veränderungen Liganden-gesteuerter Ionenkanäle bedingt. Die Ergebnisse sind kompatibel mit einer geänderten präsynaptischen Glutamataufreisetzung, die durch Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses zwischen Leuzin und KIC und dessen Kopplung an den neuronalen Glutamathaushalt verursacht werden könnte.