

**Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische  
Charakterisierung von Neurotransmitter- und  
K<sup>+</sup>-induzierten Volumenänderungen bei Retzius- und  
P-Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Nicola Susanne Trosiner

geb. Neumann

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2003

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

Referent(in): Prof. Dr. W.-R. Schloe

Korreferent(in): Prof. Dr. K. Lunau

Tag(e) der mündlichen Prüfung: 12.05.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>8</b>
2.1 Versuchstiere und Präparation .....	8
2.1.1 Der medizinische Blutegel.....	8
2.1.2 Präparation .....	9
2.2 Identifizierung der untersuchten Neuronen.....	10
2.3 Glasmikroelektroden zur Farbstoffinjektion .....	10
2.4 Ionensensitive Mikroelektroden .....	11
2.4.1 Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden des Theta-Typs.....	12
2.4.2 Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden des gedrehten Typs .....	14
2.5 Eichung ionensensitiver Mikroelektroden .....	15
2.5.1 Eichung Na <sup>+</sup> -, Cl <sup>-</sup> -und K <sup>+</sup> -sensitiver Mikroelektroden.....	19
2.5.2 Sensitivität des klassischen Ionenaustauschers Corning 477317 für quaternäre Ammoniumionen.....	22
2.6 Messung des Zellvolumens mit Hilfe ionensensitiver Mikro- elektroden.....	23
2.7 Versuchsaufbau .....	24
2.8 Mikrofluorimetrische Messungen .....	25
2.8.1 Messung von [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> mit Fura-2.....	26
2.8.2 Messung von [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> mit SBF1.....	28
2.8.3 Mikrofluorimeter .....	29
2.8.4 Durchführung mikrofluorimetrischer Messungen .....	29
2.9 Messung des Zellvolumens mit Fura-2.....	30
2.10 Versuchslösungen und Pharmaka .....	30
2.11 Auswertung der Daten .....	32
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1 Membranpotential und intrazelluläre Ionenkonzentrationen im Ruhezustand .....	34

3.1.1	Retzius-Neuronen.....	34
3.1.2	P-Neuronen.....	35
3.2	Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker TMA <sup>+</sup> .....	36
3.2.1	TMA <sup>+</sup> -Aufnahme .....	36
3.2.2	Einfluss der TMA <sup>+</sup> -Beladung auf [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> , [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> und [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sowie auf das Membranpotential .....	36
3.3	Wirkung von 5-HT auf Zellvolumen, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und E <sub>m</sub> .....	37
3.3.1	Retzius-Neuronen.....	38
3.3.2	P-Neuronen.....	39
3.3.3	Ionenbilanz der 5-HT-Wirkung bei P-Neuronen.....	41
3.4	Glutamaterge Stimulation.....	41
3.4.1	Wirkung verschiedener glutamaterger Agonisten auf Zellvolumen, [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> und E <sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen.....	42
3.4.2	Wirkung von Kainat auf Zellvolumen, [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> , [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> , [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> und E <sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen .....	43
3.4.2.1	Ionenbilanz der Kainat-Wirkung bei Retzius-Neuronen .....	44
3.4.2.2	Wirkung Cl <sup>-</sup> -, Na <sup>+</sup> - oder K <sup>+</sup> -freier Lösung auf die Kainat- induzierte Volumenzunahme .....	45
3.4.2.3	Wirkung Cl <sup>-</sup> -, Na <sup>+</sup> - oder K <sup>+</sup> -freier Lösung auf die Kainat- induzierten Änderungen in [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> , [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> , [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> und E <sub>m</sub> .....	45
3.4.3	Wirkung von Kainat auf Zellvolumen, [Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> und [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> sowie auf E <sub>m</sub> bei P-Neuronen .....	46
3.5	Einfluss des extrazellulären K <sup>+</sup> auf Zellvolumen, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und E <sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen.....	46
3.5.1	Ionenbilanz der K <sup>+</sup> -induzierten Änderungen bei Retzius- Neuronen .....	49
3.5.2	Wirkung von Cl <sup>-</sup> -freier Lösung auf die K <sup>+</sup> -induzierte Volumen- zunahme und Depolarisation.....	49
3.5.3	Wirkung von Ni <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> -freier Lösung auf die K <sup>+</sup> -induzierten Änderungen von Zellvolumen, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> und E <sub>m</sub> .....	50
3.5.4	Wirkung von Rezeptorblockern auf die K <sup>+</sup> -induzierten Änderungen von Zellvolumen und E <sub>m</sub> .....	51

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>52</b>
4.1 Ruhewerte .....	52
4.1.1 Membranruhepotential bei Retzius- und P-Neuronen.....	52
4.1.2 Intrazelluläre Ionenkonzentrationen bei Retzius- und P-Neuronen.....	52
4.1.3 TMA <sup>+</sup> -Aufnahme der Neuronen.....	53
4.1.3.1 TMA <sup>+</sup> -induzierte E <sub>m</sub> -Änderungen bei Retzius- und P-Neuronen .....	55
4.2 5-HT-Rezeptoren.....	55
4.2.1 5-HT-Effekt bei Retzius-Neuronen .....	56
4.2.2 5-HT Effekt bei P-Neuronen .....	56
4.2.3 5-HT-induzierte Volumenänderung bei P-Neuronen.....	57
4.2.4 Mechanismus der 5-HT-induzierten Volumenänderung .....	58
4.3 Glutamaterge Stimulation.....	59
4.3.1 Charakterisierung der Kainat-induzierten Volumenzunahme bei Retzius-Neuronen.....	60
4.3.2 Wirkung von Kainat auf das Zellvolumen von P-Neuronen .....	62
4.3.3 Mechanismus der Kainat-induzierten Volumenzunahme bei Retzius-Neuronen.....	62
4.4 Volumenänderungen von Retzius-Neuronen bei verändertem extrazellulärem K <sup>+</sup> .....	63
4.4.1 Beteiligung von Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> und Na <sup>+</sup> an der K <sup>+</sup> -induzierten Volumenänderung .....	63
4.4.2 Beteiligung von Ca <sup>2+</sup> an der [K <sup>+</sup> ] <sub>a</sub> -induzierten Volumenzunahme...64	64
4.5 Schlussbetrachtung.....	66
 <b>5. Zusammenfassung .....</b>	 <b>68</b>
 <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	 <b>71</b>
 <b>7. Abbildungen .....</b>	 <b>84</b>

## **1. Einleitung**

### *Allgemeine Bedeutung des Zellvolumens*

Zellen höherer tierischer Organismen sind in der Regel von einem Milieu konstanter Osmolarität umgeben. Da ihre Plasmamembran für Ionen und andere Osmolyte nur begrenzt permeabel ist, für Wasser jedoch eine sehr hohe Permeabilität aufweist, reichen bereits geringe osmotische Veränderungen im externen Medium, um Wasserbewegungen über die Membran zu induzieren und das Zellvolumen zu beeinflussen. Neben der Veränderung der extrazellulären Osmolarität kann die erhöhte Aufnahme oder Abgabe von anorganischen oder organischen Substanzen zu einer Änderung der intrazellulären Osmolarität führen. Da Zellen stets ein osmotisches Gleichgewicht anstreben, werden solche Änderungen durch die Aufnahme bzw. die Abgabe von Wasser ausgeglichen, wodurch eine Änderung im Zellvolumen hervorgerufen wird.

Das Volumen tierischer Zellen besitzt eine wichtige funktionelle Bedeutung. Bei verschiedenen Zelltypen übt das Volumen eine regulatorische Wirkung auf den Metabolismus und die Genexpression aus. So hat eine Volumenzunahme vielfach stimulierenden Einfluss auf die Synthese von Proteinen und Glykogen, während eine Volumenabnahme häufig den gegenteiligen Effekt ausübt. Allgemein beeinflussen Änderungen des Zellvolumens die Expression einer großen Anzahl von Genen (Lang et al., 1998 a). Die Bildung von Cytoskelettproteinen (Tubulin,  $\beta$ -Actin) wird durch eine Zellschwellung gefördert, während eine Zellschrumpfung die Bildung der  $\alpha_1$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase auslöst (Theodoropoulos et al., 1992; Häussinger et al., 1994; Ferrer-Martinez et al., 1996).

Epithelzellen sind auf Grund ihrer Funktion einer ständigen osmotischen Herausforderung unterworfen. Sie besitzen in der apikalen und basalen Membran unterschiedliche Transporter, welche einen gerichteten Transport zur Resorption von Elektrolyten und organischen Substanzen ermöglichen und somit Wasserbewegungen in die Zellen auslösen. Um einer übermäßigen Störung der Zellhomöostase durch Volumenschwankungen entgegenzuwirken, besitzen Epithelzellen Mechanismen, welche die Aufrechterhaltung eines annähernd konstanten Zellvolumens ermöglichen. Diese Mechanismen können in

zwei Gruppen unterteilt werden: *regulatory volume decrease* (RVD), das einer Zellschwellung entgegenwirkt, und *regulatory volume increase* (RVI), das einer Zellschrumpfung entgegenwirkt. An isolierten Nierenzellen des Kaninchens wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Volumenzunahme die Leitfähigkeit der basolateralen Membran für  $K^+$  und  $Cl^-$  erhöht. Der hierdurch ermöglichte KCl-Ausstrom wirkt der Zellschwellung entgegen (Breton et al., 1996).

Neben Epithelzellen weisen auch eine Vielzahl anderer Zelltypen Volumenregulations-Mechanismen auf (Lang et al., 1998 b). RVD wird hauptsächlich über eine Erhöhung der  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Leitfähigkeit vermittelt, wobei auch andere Anionen beteiligt sein können. An Mechanismen des RVI sind Transporter wie der  $Na^+/H^+$ -Antiporter oder der  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Cotransporter beteiligt, die in erster Linie die Aufnahme von NaCl ermöglichen (O'Neill, 1999). Eine Störung dieser regulatorischen Mechanismen kann für den gesamten Organismus dramatische Folgen haben. Ein häufig genanntes pathophysiologisches Beispiel ist die Sichelzellanämie. Hier führt die erhöhte Aktivität des  $K^+/Cl^-$ -Cotransporters in den Erythrocyten zum Elektrolyt- und folglich zum Wasserverlust (Olivieri et al., 1992). Die Volumenabnahme geht mit der Veränderung der Zellgestalt einher, die wiederum eine Erhöhung der Blutviskosität verursacht. Da sich die veränderten, sichelförmigen Erythrocyten in den kleinen Blutgefäßen verfangen, können durch die Beeinträchtigung des Kreislaufs verursachte Thrombosen, Nieren- oder Herzversagen zum Tod führen (Stryer, 1996). Weiterhin postulierten Wärntges et al. (2001), dass Störungen von Volumenregulations-Mechanismen eine Ursache für fortschreitendes Nierenversagen sind, bei dem eine Schwellung betroffener Nephrone auftritt. Eine Abnahme des Zellvolumens wird typischerweise bei apoptotischem Zelltod beobachtet, wobei jedoch nicht klar ist, ob es sich hierbei nur um eine Folgeerscheinung oder um die Ursache dieser Form der Degeneration handelt (Lang et al., 1998 a; O'Reilly et al., 2002).

#### *Bedeutung des Zellvolumens bei Neuronen*

Volumenänderungen stellen für alle tierischen Organe eine Herausforderung dar, der mit Hilfe von Regulationsmechanismen entgegengesteuert wird. Für das Gehirn kommt erschwerend hinzu, dass Volumenzunahmen in einzelnen Hirnarealen immer auf Kosten anderer Gewebereiche gehen, da durch den Schädel das Gesamtvolumen des Gehirns

auf eine vorgegebene Größe beschränkt ist. Da in der Regel auch Neuronen mit Mechanismen zur Volumenregulation ausgestattet sind, können Veränderungen im Zellvolumen bis zu einem gewissen Maß ausgeglichen werden (Pasantes-Morales et al., 2000).

Neben dem bereits erwähnten regulatorischen Einfluss des Volumens auf den Zellstoffwechsel können Volumenänderungen bei Neuronen weitere Prozesse auslösen. Die Dehnung der Plasmamembran bei einer Volumenzunahme löst  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Fusion von Vesikeln mit der Membran aus (Lang et al., 1998 a). Der Inhalt dieser Vesikel wird in den Extrazellulärraum entleert und die Vesikelmembran in die Plasmamembran eingefügt. Handelt es sich bei dem Vesikelinhalt um Neurotransmitter, so können umliegende Neurone durch die Aktivierung von ionotropen oder metabotropen Rezeptoren beeinflusst werden. Enthält die Vesikelmembran Ionenkanäle oder Rezeptoren, so können die von der Schwellung betroffenen Neuronen, durch den Einbau dieser Komponenten in ihre Plasmamembran, deutliche funktionelle Veränderungen erfahren.

#### *Pathophysiologische Volumenänderungen bei Nervenzellen*

Neuronale Aktivität kann unter physiologischen Bedingungen einen Anstieg der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration ( $[\text{K}^+]_a$ ) auf bis zu 10 mM verursachen (Baylor & Nicholls, 1969). Da eine erhöhte  $[\text{K}^+]_a$  eine Depolarisation verursacht und die Inaktivierung spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle erst nach einer Repolarisation der Membran unter den Schwellenwert aufgehoben wird, können Neuronen erst nach Rückkehr zu  $[\text{K}^+]_a$ -Ruhewerten wieder Aktionspotentiale generieren (Syková, 1997). Eine schnelle Rückregulierung der  $[\text{K}^+]_a$  ist also erforderlich, um die Aufrechterhaltung neuronaler Erregbarkeit zu gewährleisten. Einen wichtigen Beitrag hierzu leistet die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase der Neuronen und Gliazellen. Weiterhin sind an diesem Prozess gliale Mechanismen beteiligt, die durch „räumliche Pufferung“ (*spatial buffering*) für eine Umverteilung von  $\text{K}^+$ -Ionen aus Bereichen hoher  $[\text{K}^+]_a$  zu Bereichen niedriger  $[\text{K}^+]_a$  sorgen (Amédée et al., 1997). Unter pathophysiologischen Bedingungen reichen diese Mechanismen häufig nicht aus, um  $[\text{K}^+]_a$  aufrecht zu erhalten. In der Retina von Hühnchen und im Hippocampus der Ratte wurden während einer „Spreading Depression“  $[\text{K}^+]_a$ -Anstiege auf bis zu 50 mM gemessen (Scheller et al., 1998; Müller & Somjen, 2000). Auch bei epileptischer Aktivität sind  $[\text{K}^+]_a$ -Anstiege beschrieben, die durch *spatial buffering* in weite Bereiche des Gewebes verteilt werden und dort die Ausbreitung epileptischer Aktivität

begünstigen (Lux et al., 1986). Häufig gehen solche Anstiege von  $[K^+]_a$  mit Zellschwellungen einher (Lang et al., 1998 a), die vermutlich auf die Aufnahme von KCl zurückzuführen sind (Walz, 1992). Bei Ischämien wurde parallel zum  $[K^+]_a$ -Anstieg eine Volumenabnahme des Extrazellulärraums beschrieben, die wahrscheinlich die Folge von neuronalen und glialen Zellschwellungen ist (Syková, 1997).

Eine starke Zunahme des Zellvolumens von Neuronen tritt auch beim „exzitotoxischen Zelltod“ auf. Dieser Begriff wurde von Olney (1986) geprägt und beschreibt die toxische Wirkung von erregend wirkenden Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) auf Neuronen bei fortgesetzter Applikation. Die Toxizität äußert sich in Hirnschnitten der Ratte zunächst in einer massiven Zellschwellung (Colwell & Levine, 1996) und führt meist über weitere Schritte, wie der Degeneration intrazellulärer Organellen, zum nekrotischen Zelltod (Choi, 1992). Als Auslöser des exzitotoxischen Zelltods wird die tonische Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren angesehen. Glutamat-Rezeptoren, die in den Zentralnervensystemen von Vertebraten und Invertebraten weit verbreitet sind, lassen sich in metabotrope und ionotrope Rezeptoren einteilen. Die Gruppe der ionotropen Glutamatrezeptoren wird in NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und nonNMDA-Rezeptoren unterteilt, wobei die nonNMDA-Rezeptoren wiederum in Kainat- und AMPA-Rezeptoren aufgeteilt werden. Sowohl für NMDA- als auch für nonNMDA-Rezeptoren ist eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen beschrieben (Bettler & Mülle, 1995). Erstaunlicherweise scheinen hier die Mechanismen des RVD der Zellschwellung nicht entgegenzuwirken. Bostel et al. (2002) nennen als mögliche Gründe für diese Unwirksamkeit die unter diesen Bedingungen auftretende, anhaltende Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), welche die osmoregulatorischen Mechanismen stören könnte. Denkbar ist auch, dass die Zellen nicht in der Lage sind, solche Elektrolyte zur Volumenregulation einzusetzen, die die Änderungen des Zellvolumens mit verursachen. Sicher ist in jedem Fall, dass  $Ca^{2+}$  sowohl bei der Volumenregulation als auch beim Glutamat-vermittelten Zelltod eine wichtige Rolle spielt. Bei der Volumenregulation wird  $Ca^{2+}$  vor allem bei den in den RVD involvierten Mechanismen eine große Bedeutung zugeschrieben (Pierce & Politis, 1990). Bis auf wenige Ausnahmen regulieren Zellen, für die ein  $Ca^{2+}$ -abhängiger RVD-Prozess beschrieben ist, ihr Volumen durch den Ausstrom von  $K^+$  und  $Cl^-$ . Dabei ist nicht klar, ob  $Ca^{2+}$  die Leitfähigkeit für diese Ionen direkt oder über intrazelluläre Signalwege erhöht (McCarty &

O'Neil, 1992). Die Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  beim exzitotoxischen Zelltod ist eher in seiner Signal-vermittelnden Wirkung zu suchen, denn hier spielt der Weg, durch den  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle gelangt und die Art der in diesem Bereich der Plasmamembran in Clustern zusammengefassten Proteine eine Rolle (Sattler & Tymianski, 2000). Ob und inwieweit  $\text{Ca}^{2+}$  als Osmolyt die Volumenzunahme mitverursacht, ist nicht beschrieben. Colwell & Levine (1996) vermuten jedoch eine eher nebensächliche Beteiligung und schreiben die wesentliche Rolle  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  zu.

Auch der Neurotransmitter 5-HT (5-Hydroxytryptamin, Serotonin) kann pathophysiologische Prozesse auslösen. Yim et al. (2000) beobachteten einen Serotonin-induzierten neuronalen Zelltod, der eine mögliche Ursache für neurodegenerative und neuropsychiatrische Störungen darstellen könnte. Sie demonstrierten, dass der durch Serotonin vermittelte Zelltod in einer Epiphyse-Tumorzelllinie (PGT- $\beta$  Zellen) typische apoptotische Merkmale aufweist. Auch Azmitia (2001) beschrieb eine Beteiligung von 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren an apoptotischen Vorgängen. Eine neurotoxische Wirkung von 5-HT, welche mit einer Veränderung im Zellvolumen einhergeht, wurde bisher noch nicht beschrieben.

#### *Zellvolumenänderungen im Blutegel-Zentralnervensystem*

Das Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* stellt ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung ionaler Transportprozesse bei Neuronen und Gliazellen dar. Bei beiden Zelltypen wurde eine Vielzahl von Kanal- und Transportproteinen beschrieben, die in ihren funktionellen Eigenschaften denen bei Vertebraten ähneln (z.B. Dierkes et al., 1996; Munsch et al., 1995; Schlue & Deitmer, 1984). Weiterhin bietet das Nervensystem des Blutegels die Möglichkeit, Untersuchungen im intakten Gewebe durchzuführen, in dem die synaptischen Kontakte zwischen einzelnen Neuronen sowie die Wechselwirkungen zwischen Neuronen und Gliazellen aufrechterhalten bleiben.

In früheren Arbeiten wurde die Technik ionensensitiver Glasmikroelektroden (Ballanyi et al., 1990; Neumann, 2000) und die Mikrofluorimetrie (Dierkes, 1998; Wüsten, 2000) angewendet, um Zellvolumenänderungen bei Blutegel-Neuronen und -Gliazellen näher zu untersuchen. Aus diesen Arbeiten geht hervor, dass pathophysiologische Volumen-

änderungen wie im Nervensystem von Vertebraten auch im Blutegel-Nervensystem beobachtet werden können. In Arbeiten von Ballanyi et al. (1990) und Neumann et al. (2001) konnte nachgewiesen werden, dass die isoosmotische Erhöhung von  $[K^+]_a$  bei Retzius-Neuronen und Neuropil-Gliazellen zu einer Volumenzunahme führt. Auch die Aktivierung ionotroper Glutamat-Rezeptoren bei Retzius-Neuronen verursacht eine Volumenzunahme (Müller, 2000).

Die Retzius-Neuronen des Blutegel-Nervensystems ermöglichen wegen ihrer Größe die Anwendung ionensensitiver Dreikanal-Mikroelektroden. Diese Elektroden lassen die simultane Bestimmung von Änderungen des Zellvolumens, einer intrazellulären Ionensorte wie  $Na^+$ ,  $Cl^-$  oder  $K^+$  ( $[Na^+]_i$ ,  $[Cl^-]_i$  oder  $[K^+]_i$ ) und des Membranpotentials ( $E_m$ ) zu. Die gleichzeitige Ermittlung von Zellvolumenänderungen und intrazellulären Ionenkonzentrationen ( $[Ion]_i$ ) ermöglicht eine genaue Charakterisierung der Volumenänderungen. Die Aufnahme von Wasser, welche zu einer Volumenzunahme führt, bedeutet immer auch eine Abnahme von  $[Ion]_i$ . Umgekehrt führt die Abgabe von Wasser, die eine Volumenabnahme verursacht, zu einer Erhöhung von  $[Ion]_i$ . In beiden Fällen würden die gemessenen  $[Ion]_i$ -Änderungen nicht nur die Aufnahme oder die Abgabe von Ionen anzeigen, sondern auch Änderungen des zellulären Wassergehalts widerspiegeln. Durch die simultane Bestimmung des Zellvolumens wird eine Korrektur der gemessenen  $[Ion]_i$  um gleichzeitige Volumenänderungen möglich, so dass Ionenbewegungen über der Zellmembran, die eine Volumenänderung verursachen, zuverlässig beschrieben werden können.

### *Zielsetzung*

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, an identifizierten Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems Volumenänderungen und ihre ionalen Ursachen zu charakterisieren. Hierbei soll der Schwerpunkt auf solchen Volumenänderungen liegen, die im Gehirn von Vertebraten unter pathophysiologischen Bedingungen wie zum Beispiel beim „exzitotoxischen Zelltod“, Epilepsie oder Spreading Depression auftreten. Die Überaktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren, wie sie beim „Exzitotoxischen Zelltod“ auftritt, wurde in der vorliegenden Arbeit durch die ein- bzw. zweiminütige Badapplikation des Neurotransmitters 5-HT bzw. des glutamatergen Agonisten Kainat simuliert. Hierdurch sollten Volumenänderungen ausgelöst werden, die denen beim „exzitotoxi-

schen Zelltod“ auftretenden Volumenzunahmen ähneln. Die in Folge erhöhter neuronaler Aktivität auftretende hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration wurde durch Versuchslösungen nachgeahmt, in denen die  $K^+$ -Konzentration erhöht und die  $Na^+$ -Konzentration zu gleichen Teilen abgesenkt wurde. Hierdurch wurden Bedingungen geschaffen, die zum Beispiel bei epileptischen Anfällen Volumenzunahmen auslösen. Die quantitative Bestimmung von Ionenbewegungen sowie die Charakterisierung beteiligter Transportproteine soll Aufschluss über die Prozesse geben, die das Zellvolumen beeinflussen. Vor allem sollten relative  $[Ion]_i$ -Änderungen, die durch Änderungen des Wassergehalts der Zelle verursacht wurden, von Änderungen der totalen  $[Ion]_i$ , die durch Ionenbewegungen über der Plasmamembran verursacht wurden, getrennt werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden teilweise bereits als Originalarbeiten (Neumann et al., 2001; Dierkes et al., 2002 a; Dierkes et al., 2002 b) veröffentlicht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Präparation**

#### **2.1.1 Der medizinische Blutegel**

Die Experimente wurden an identifizierten Neuronen isolierter Segmentalganglien des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* durchgeführt (Abb. 1A). Es wurden ausschließlich adulte Tiere für die Versuche verwendet, die von den Firmen Zaug GmbH (Biebertal) oder Moser Blutegelhandel (Schorndorf) stammten.

Der medizinische Blutegel gehört zum Stamm der Annelida [Ringelwürmer; Klasse: Clitellata (Gürtelwürmer), Unterklasse: Hirudinea (Blutegel), Ordnung: Gnathobdellida (Kieferegell)] und weist den für diesen Tierstamm charakteristischen segmentierten Körperbau auf. Der Hautmuskelschlauch eines jeden der insgesamt 32 Körpersegmente ist in 5 Segmentringe (Annuli) unterteilt, wobei die Segmente im vorderen und hinteren Körperbereich mit 1 bis 4 Segmentringen eine Ausnahme bilden (Mann, 1962). Die Segmentierung des Körperbaus wird auch durch die Organisation des ventral liegenden Zentralnervensystems deutlich, das sich jedoch vom typischen Strickleiternnervensystem anderer Anneliden durch eine deutliche Zentralisierung unterscheidet. Die ursprünglich in jedem Segment vorkommenden paarigen Ganglien sind unter Reduktion der Kommissuren zu je einem Ganglion verschmolzen. Von den ursprünglich 32 Ganglien sind die ersten vier anterioren Ganglien zu einem Cerebralganglion und die letzten sieben posterioren Ganglien zu einem Analganglion verschmolzen. Die übrigen 21 Ganglien sind untereinander sowie mit dem Cerebral- bzw. Analganglion durch paarige Konnektive und den Faivre-Nerv zu einer Ganglionkette verbunden, die durch den ventralen Blutsinus umhüllt wird (Muller et al., 1981; Abb. 1B).

Die gleichförmig aufgebauten Segmentalganglien sind von einer Bindegewebshülle, der Ganglionkapsel, umgeben. Sie enthalten etwa 400 Neuronen, 6 Paket- und 2 Neuropilgliazellen (Macagno, 1980). Die Neuronzellkörper sind auf 6 Pakete aufgeteilt, die jeweils von den Ausläufern einer Paketgliazelle umgeben sind (Abb. 2). Die axonalen Ausläufer der Neuronen bilden im Ganglioninnern das Neuropil, wo die synaptische Verbindung zwischen den Neuronen erfolgt. Die neuronalen Fortsätze werden von Ausläufern der Neuropilgliazellen umhüllt. Die die Geschlechtsorgane innervierenden Segmentalganglien 5 und 6 zeigen eine deutliche Abweichung von diesem gleichförmigen Aufbau. Sie enthalten über 750 Neuronen und unterscheiden sich hinsichtlich der Zusammensetzung der Neurotransmitter-Rezeptoren und der synaptischen Verschaltung (Kristan et al., 1993; Szczupak et al., 1993). Diese Ganglien 5 und 6 wurden für die Experimente nicht verwendet.

Die Untersuchungen wurden an Retzius- und an P (pressure)- Neuronen durchgeführt, deren Zellkörper auf der ventralen Seite des Ganglions im anterior-medianen Paket (Retzius-Neuronen) sowie in den beiden posterior-lateralen Paketen (P-Neuronen) liegen.

### **2.1.2 Präparation**

Der Blutegel wurde zur Isolierung der Ganglien, mit der Ventralseite nach unten, in einer mit Wachs ausgegossenen Präparierschale fixiert. Hierzu wurde je eine Stecknadel am Vorder- und Hinterende befestigt. Mit einer feinen Schere und unter flacher Schnitführung wurde der Hautmuskelschlauch und die dorsale Darmwand von anterior nach posterior entlang der Dorsomedianlinie geöffnet. Hinter dem anterioren Saugnapf wurde mit einem tiefen, quer zur Längsachse verlaufenden Schnitt, mit einer Augenschere das Cerebralganglion vom Rest der Ganglienkette abgetrennt. Anschließend wurde der geöffnete Hautmuskelschlauch zu beiden Seiten mit weiteren Stecknadeln aufgespannt. Um den Blutegel vor dem Austrocknen zu bewahren sowie Darminhalt und Gewebereste zu entfernen, wurde das Präparat regelmäßig mit Normalsalzlösung (NSL) überspült. Die weiteren Präparationsschritte erfolgten unter optischer Kontrolle (Binokular). Zunächst musste die über dem Blutsinus liegende ventrale Darmwand entfernt werden,

anschließend konnte der Blutsinus direkt über dem Ganglion mit einer Pinzette angehoben und mit der Augenschere aufgeschnitten werden. Die Konnektive und Seitenwurzeln wurden ca. 1 bis 2 mm von der Ganglionkapsel entfernt durchtrennt und das freigelegte Ganglion in ein Blockschälchen mit NSL überführt. Die Präparation und die Aufbewahrung der Ganglien sowie die Durchführung der Experimente erfolgten bei Raumtemperatur.

## **2.2 Identifizierung der untersuchten Neuronen**

Die Zellen wurden anhand ihrer Größe, Lage und elektrophysiologischen Eigenschaften identifiziert. Retzius-Neuronen sind die größten Zellen im anterior-medianen Paket (Abb. 2) und eindeutig zu identifizieren. Die P-Neuronen in den posterior-lateralen Paketen fallen ebenfalls durch ihre Größe auf. Sie sind von den in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden Leydig-Neuronen durch fehlende elektrische Spontanaktivität leicht zu unterscheiden (Abb. 2).

## **2.3 Glasmikroelektroden zur Farbstoffinjektion**

Einzelkanal-Mikroelektroden wurden zur iontophoretischen Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2 und SBFI verwendet. Sie wurden aus 15 cm langen Einzelkanal-Glaskapillaren mit Innenfilament (Borosilikatglas, GC 150 F-15, Clark Electromedical Instruments) hergestellt, welche auf 7,5 cm halbiert und mit einem Vertikal-Elektrodenziehgerät (PE-2, Narishige) zu zwei Mikrokapillaren ausgezogen wurden. Die verwendeten Mikrokapillaren wurden von der hinteren Öffnung über eine Glaskapillare mit wässriger Farbstoff-Lösung (Fura-2: 50 mM; SBFI: 25 mM) gefüllt. Diese Füllkapillare wurde an das Innenfilament der Mikroelektrode gehalten, wobei sich eine Flüssigkeitsbrücke bildete, über die Farbstofflösung durch Kapillarkräfte bis in die Spitze der Mikroelektrode gezogen wurde. Anschließend wurde ein feiner Silberdraht eingeführt und die Einzelkanal-Mikroelektrode mit Hartklebewachs (Deiberit 502, Ludwig

Böhme KG) verschlossen. Der in NSL gemessene Widerstand dieser Glasmikroelektroden lag zwischen 30 und 100 M $\Omega$ .

## **2.4 Ionensensitive Mikroelektroden**

Ionensensitive Mikroelektroden dienen der Bestimmung intrazellulärer Ionenaktivitäten. In dieser Arbeit wurden Mehrkanal-Mikroelektroden mit jeweils einem Referenzkanal sowie ein oder zwei ionensensitiven Kanälen verwendet (Abb. 3). Der Referenzkanal wurde zur Bestimmung des Referenzpotentials ( $E_{\text{Ref}}$ ) mit einer hochkonzentrierten Elektrolytlösung gefüllt. In die Spitze des ionensensitiven Kanals wurde ein Sensorcocktail eingebracht, der aus einer organischen Flüssigmembran besteht. In dieser Flüssigmembran liegen Carriermoleküle gelöst vor, die spezifischen Ionen (Messionen) den Eintritt aus der Versuchslösung in die organische Phase ermöglichen. Das hierbei entstehende Grenzflächenpotential ist vom Eintritt der Messionen in die Flüssigmembran abhängig und verhält sich proportional zum Logarithmus der Messionenkonzentration. Da vom ionensensitiven Kanal das Summenpotential aus Ionenpotential ( $E_{\text{Ion}}$ ) und  $E_{\text{Ref}}$  gemessen wird, muss zur Ermittlung von  $E_{\text{Ion}}$  das über den Referenzkanal bestimmte  $E_{\text{Ref}}$  vom Summenpotential subtrahiert werden (Abb. 3A). Der Referenzkanal einer Mehrkanal-Mikroelektrode ist besonders bei den in dieser Arbeit durchgeführten intrazellulären Messungen von großem Vorteil. Das intrazellulär gemessene  $E_{\text{m}}$  unterscheidet sich vom Potential der Badlösung und verändert sich oftmals im Verlauf der experimentellen Untersuchungen, so dass die Subtraktion vom Summenpotential kontinuierlich erfolgen muss. Die Zelle wird durch die Integration des Referenzkanals in einer Mehrkanal-Mikroelektrode weniger belastet als durch den Einstich einer weiteren Mikroelektrode.

Ionensensitive Zweikanal-Mikroelektroden des Theta-Typs sowie ionensensitive Zwei- bzw. Dreikanal-Mikroelektroden des gedrehten Typs wurden für die Experimente verwendet (Schlue et al., 1997; Dierkes et al., 2002a). Die Sensorcocktails in den Spitzen der ionensensitiven Kanäle wurden mit Elektrolytlösungen (Backfill-Lösung) überschichtet, die das jeweilige Mession in definierter Konzentration enthielten. In der

Elektrolytlösung im Referenzkanal war das Mession nicht enthalten, um mögliche Verfälschungen der intrazellulären Ionenkonzentration durch einen Ionenleckstrom aus dem Referenzkanal zu verhindern. In Tabelle 1 sind die verwendeten Sensorcocktails mit den jeweiligen Backfill- und Referenzlösungen angegeben.

**Tabelle 1: Kombination der Sensorcocktails mit Backfill- und Referenzlösungen**

Mession	Sensorcocktail	Backfill	Referenz
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>K<sup>+</sup>-Ionophor</b> I-Cocktail B Valinomycin (Fluka)	100 mM KCl	3 M LiAcetat
	<b>K<sup>+</sup>-Ionophor</b> Corning 477317 (potassium tetrakis (p-chlorophenylborate)) Klassischer Ionenaustauscher	100 mM KCl	3 M LiAcetat
<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup>-Ionophor</b> I-Cocktail A (ETH 227, Fluka)	100 mM NaCl	3 M KCl
<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>Cl<sup>-</sup>-Ionophor</b> I-Cocktail A (Fluka) Lagerung unter Stickstoff	500 mM KCl	3 M LiAcetat

*Bei den Na<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden wurde auf Grund der Sensitivität des Sensorcocktails für Li<sup>+</sup> 3 M KCl als Referenzlösung verwendet*

#### 2.4.1 Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden des Theta-Typs

Um ionensensitive Zweikanal-Mikroelektroden des Theta-Typs herzustellen, wurden 15 cm lange Theta-Glaskapillaren (TGC 150-15, Clark Electromedical Instruments) zunächst halbiert. Anschließend wurden die 7,5 cm langen Teilstücke in dem Vertikal-Elektrodenziehgerät zu je zwei Mikrokapillaren mit geringem Spitzendurchmesser (< 1µm) ausgezogen.

Da die Sensorcocktails sehr hydrophob sind und durch die wässrige Backfill-Lösung von der hydrophilen Glasoberfläche verdrängt werden, musste die Glasoberfläche des ionensensitiven Kanals durch Silanisierung hydrophob gemacht werden. Hierzu wurde

das von Kilb (1994) modifizierte Dampfdruckverfahren nach Coles und Tsacopoulos (1977) angewandt. Ein mit 8 Öffnungen versehener Silanisierungshalter wurde auf einen mit ca. 10 ml Hexamethyldisilazan (HMDS, Fluka) gefüllten 500 ml Weithalskolben aufgesetzt. In jeder Öffnung befand sich jeweils eine Kanülenspitze, die über Schläuche mit einer Pressluftzufuhr verbunden waren. Bereits 20 Minuten vor der Silanisierung wurde der Weithalskolben auf eine auf 40°C erwärmte Heizplatte gestellt, um eine Silan-gesättigte Atmosphäre zu schaffen. Um den Referenzkanal vor der Silanisierung zu schützen, wurden die Mikrokapillaren so auf die Öffnungen des Halters gesteckt, dass die Kanüle in den Referenzkanal hineinreichte. Dieser Kanal wurde während der Silanisierung mit ca. 1,5 bar Pressluft durchströmt, während der andere Kanal dem verdampfenden Silan ausgesetzt war. Während des 90 Minuten andauernden Vorganges reagieren die Silanverbindungen mit den Hydroxyl-Gruppen der Glasoberfläche, wobei Trimethylsilanreste gebunden und die Glasoberfläche hydrophob gemacht wird (Ammann 1986). Anschließend wurden die Mikrokapillaren mindestens zwei Stunden bei 200°C im Ofen erhitzt, um die Silanisierungsreaktion zu beenden. Die Lagerung der Mikrokapillaren im Exsikkator über Kieselgel ermöglichte die Aufrechterhaltung des Silanisierungseffektes über mehrere Tage hinweg.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zweikanal-Mikroelektroden des Theta-Typs als Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- sowie K<sup>+</sup>-sensitive Mikroelektroden eingesetzt, wobei die in Tabelle 1 aufgelisteten Sensorcocktails (mit Ausnahme des K<sup>+</sup>-Ionophors Corning 477317) mit den dazugehörigen Backfill- und Referenzlösungen verwendet wurden. Beim Füllen der Mikrokapillaren wurde zunächst der Sensorcocktail für Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- oder K<sup>+</sup>-Ionen in die Spitze des ionensensitiven Kanals eingebracht. Hierzu wurde ein ausgezogener Kunststoffschlauch mit der Spitze in den Sensorcocktail eingetaucht. Durch Kapillarkräfte wurde der Schlauch mit einer geringen Menge des Sensorcocktails beladen und anschließend durch die hintere Öffnung des silanisierten Kanals in die Mikrokapillare eingeführt. Mit Hilfe einer auf das hintere Ende des Schlauchs aufgesetzten Spritze wurde der Sensorcocktail in den silanisierten Kanal gespritzt und durch Kapillarkräfte entlang der mittleren Trennwand in die Kanalspitze gezogen. Nachdem der Sensorcocktail die Spitze erreicht hatte, wurde ebenfalls mit Hilfe eines ausgezogenen Schlauchs und einer Spritze die entsprechende Referenzlösung in den nicht silanisierten Kanal gefüllt. Die Beseitigung von Luftblasen erfolgte in einem Exsikkator, wo die Elektroden einem Un-

terdruck ausgesetzt wurden. Schließlich konnte der Sensorcocktail mit der jeweiligen Backfill-Lösung überschichtet, beide Kanäle mit einem chlorierten Silberdraht versehen und mit Hartklebewachs verschlossen werden. Die chlorierten Silberdrähte, die den Kontakt zum Messverstärker herstellten, wurden im elektrodennahen Bereich zur Isolation ebenfalls mit Hartklebewachs überzogen, um mögliche Interferenzen zwischen den beiden Elektrodenkanälen zu vermeiden. Die gefüllten Mikroelektroden konnten aufrecht, mit der Spitze in NSL getaucht, über mehrere Tage aufbewahrt werden. Da Elektroden des Theta-Typs, basierend auf Corning 477317, nicht über einen längeren Zeitraum haltbar waren wurden hierfür Elektroden des gedrehten Typs eingesetzt (siehe 2.4.2).

#### **2.4.2 Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden des gedrehten Typs**

Um ionensensitive Zweikanal-Mikroelektroden des gedrehten Typs herzustellen, wurden 15 cm lange Einzelkanal-Glaskapillaren (GC 150 F-15, Clark Elektromedical Instruments) halbiert. Die 7,5 cm langen Teilstücke wurden an Einzelkanal-Glaskapillaren (GC 100 F-15, Clark Electromedical Instruments, gekürzt auf 6,5 cm) angeklebt, so dass sie diese an beiden Enden um 0,5 cm überragten. Die Glaskapillaren wurden zum Aushärten des Zweikomponentenklebers (Araldit) für eine Stunde auf 60°C erwärmt.

Die ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden wurden mit Theta-Glaskapillaren (TGC 150-15, Clark Electromedical Instruments) hergestellt. Die Einzelkanal-Glaskapillare (GC 100 F-15, Clark Electromedical Instruments) wurde stets an einen der beiden Kanäle der Theta-Glaskapillare geklebt, so dass alle drei Kanäle nebeneinander lagen.

Die Glaskapillaren wurden in dem Vertikal-Elektrodenziehgerät in zwei Schritten ausgezogen. Zunächst wurden sie im mittleren Bereich stark erhitzt, so dass durch Drehen der unteren Halterung um 180° die Einzelkanal-Glaskapillare um die Theta-Glaskapillare gewunden wurde. Die Kapillaren wurden bei diesem Vorgang nicht mehr als 2 mm vorgezogen. Nach einer Abkühlphase von ca. 65 Sekunden wurden die Glaskapillaren im zweiten Schritt vollständig ausgezogen.

Mehrkanal-Mikroelektroden des gedrehten Typs wurden nach dem Dampfverfahren (Berridge & Schlue, 1978) silanisiert. Hierbei wurde die als Referenzelektrode vorgesehene, kürzere Einzelkanal-Glaskapillare vor dem Silanisierungsprozess mit destilliertem Wasser gefüllt, um den Kontakt der Glasoberfläche mit dem Silan zu verhindern. Weiterhin besaß die verwendete Halterung 8 Öffnungen ohne Kanüle, in die nur die längeren Glaskapillaren hineingesteckt werden konnten, so dass lediglich der zu silanisierende, bzw. die zu silanisierenden Kanäle unmittelbaren Kontakt zur Silanatmosphäre hatten. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt. Das destillierte Wasser im Referenzkanal verdampfte während der Erhitzung über zwei Stunden im Ofen.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zweikanal-Mikroelektroden des gedrehten Typs wurden ausschließlich mit dem  $K^+$ -Ionophor Corning 477317 und der in Tabelle 1 genannten Backfill- bzw. Referenzlösung gefüllt. Der silanisierte Kanal der Zweikanal-Mikroelektroden des Theta-Typs enthielt stets einen der für  $Na^+$ -,  $Cl^-$ - oder  $K^+$ -Ionen sensitiven Sensorcocktails, wobei zur Messung von  $K^+$  der neutrale Carrier Valinomycin verwendet wurde. Bei den Dreikanal-Mikroelektroden wurde stets der mittlere Kanal mit dem  $K^+$ -Ionophor Corning 477317 gefüllt. Der äußere Kanal enthielt einen für  $Na^+$ -,  $Cl^-$ - oder  $K^+$ -Ionen sensitiven Sensorcocktail; der  $K^+$ -sensitive Kanal wurde immer mit dem  $K^+$ -Ionophor I-Cocktail B Valinomycin gefüllt. Die jeweilige Backfill-Lösung ist in Tabelle 1 angegeben. Als Referenzlösung wurde außer bei  $Na^+$ -sensitiven Mikroelektroden (3 M KCl) 3 M LiAcetat verwendet.

## **2.5 Eichung ionensensitiver Mikroelektroden**

Mit Hilfe ionensensitiver Mikroelektroden werden Ionenpotentiale ( $E_{Ion}$ ) gemessen, die nach Eichung in Ionenaktivitäten bzw. Ionenkonzentrationen umgerechnet werden können. Diese Berechnungen beruhen auf der Nernst- (1) bzw. Nicolsky-Eisenman-Gleichung (3).

Ideale Flüssigmembran-Ionophore sind ausschließlich für eine Ionensorte permeabel, so dass sich das Potential  $E$ , welches sich über der Flüssigmembran einstellt, proportional zum Logarithmus der Aktivität dieser Ionensorte ( $\log a_i$ ) verhält. Dieses Verhalten wird durch die Nernst-Gleichung (1) beschrieben (Ammann, 1986):

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

- E: Potential der ionensensitiven Messzelle  
E<sub>0</sub>: Standardpotential  
s: Nernst-Steigung  
a<sub>i</sub>: Aktivität des Messions

Die Nernst-Steigung  $s$  ist definiert durch (2):

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

- R: allgemeine Gaskonstante (8,314 Jmol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>)  
T: absolute Temperatur  
z<sub>i</sub>: Wertigkeit des Messions  
F: Faradaykonstante (96487 Cmol<sup>-1</sup>)

Bei einer Temperatur von 25°C beträgt die Nernst-Steigung  $s$  für ein einfach positiv/negativ geladenes Ion +/-59 mV pro Dekade. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Flüssigmembran-Ionophore wiesen jedoch Interferenzen mit anderen Ionen (Störionen) auf. Daraus resultiert bei niedrigen Messionenaktivitäten eine Abweichung in der Proportionalität zwischen Elektrodenpotential und dem Logarithmus der Messionenaktivität. Der Zusammenhang zwischen Elektrodenpotential, Messionen- und Störionenaktivität wird durch die Nicolsky-Eisenman-Gleichung (3) beschrieben (Eisenman, 1962; Ammann, 1986). Der potentiometrische Selektivitätskoeffizient des Ionophors ( $k_{i,j}^{pot}$ ) stellt ein Maß für die Bevorzugung des Messions gegenüber einem definierten Störion dar.

$$E = E_0 + s \cdot \log \left[ a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} \left( a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (3)$$

- $a_i, a_j$ :      Aktivität des Messions, Störions  
 $z_i, z_j$ :      Wertigkeit des Messions, Störions  
 $k_{i,j}^{pot}$ :      potentiometrischer Selektivitätskoeffizient

Für die hier verwendeten Flüssigmembran-Ionophore wurde jeweils nur eine Störionensorte angenommen. Daraus ergibt sich folgende Vereinfachung der Nicolsky-Eisenman-Gleichung:

$$E = E_0 + s \cdot \log \left[ a_i + k_{i,j}^{pot} \left( a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (4)$$

Das Potential  $E$  verhält sich für hohe Messionenaktivitäten proportional zum Logarithmus der Messionenaktivität, so dass sich Gleichung (4) der Nernst-Gleichung (1) annähert. Bei niedriger Messionen- und hoher Störionenaktivität nähert sich  $E$  einem konstanten Wert an, der dem Potentialbeitrag der Störionenaktivität entspricht. Der Punkt an dem der Beitrag des Störions zum Potential  $E$  genauso groß ist wie der Beitrag des Messions, ist als Detektionslimit  $a_i^0$  der ionensensitiven Mikroelektrode definiert. Dieses Detektionslimit stellt die kleinste messbare Messionenaktivität vor dem Hintergrund des Störions dar, das sich graphisch aus dem Schnittpunkt der beiden Asymptoten der Eichkurve bestimmen lässt (Abb. 4). Die rechnerische Bestimmung des Detektionslimits einer ionensensitiven Mikroelektrode wird durch Gleichsetzen der Gleichungen (1) und (4) ermöglicht:

$$\begin{aligned}
 E_i = E_j &\Rightarrow a_i^0 \\
 E_0 + s \cdot \log a_i^0 &= E_0 + s \cdot \log \left[ k_{i,j}^{pot} \left( a_j \right)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (5a)
 \end{aligned}$$

- $E_i, E_j$ :      Potential der ionensensitiven Messzelle in Gegenwart des Messions bzw. Störions

Das Auflösen der Gleichung (5a) führt zu:

$$a_i^0 = k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_j}{z_i}} \quad (5b)$$

Das Einsetzen von Gleichung (5b) in Gleichung (4) liefert folgende neue Gleichung (6), nach der das Potential E dem Logarithmus der Summe von Messionenaktivität und Detektionslimit proportional ist:

$$E = E_0 + s \cdot \log(a_i + a_i^0) \quad (6)$$

Durch Umwandeln der Ionenaktivität in die Ionenkonzentration c ( $a = c \cdot \gamma$ ,  $\gamma$  = Aktivitätskoeffizient) ergibt sich:

$$E = E_0 + s \cdot \log[\mathbf{g}_i \cdot c_i + \mathbf{g}_i \cdot c_i^0] \quad (7)$$

Die Gleichung (7) kann nochmals vereinfacht werden, da der Aktivitätskoeffizient  $\gamma_i$  des Messions in den Eichlösungen zwischen höchster und niedrigster Messionenkonzentration nur um maximal 2% variiert (siehe Kapitel 2.5.1) und das Standardpotential  $E_0$  und die Nernst-Steigung s konstant sind.

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

bzw. mit ( $E_0 + s \cdot \log \mathbf{g}_i = E_0'$ ):

$$E = E_0' + s \cdot \log(c_i + c_i^0) \quad (8)$$

Aus den Eichkurven der ionensensitiven Mikroelektroden (Abb. 4) wurden jeweils die maximale Steigung, die im Idealfall der Nernst'schen Steigung s entspricht, und der Störionenbeitrag anhand des Messwertes für die Messionen-freien Eichlösungen ermittelt. Die Bestimmung des Detektionslimits  $c_i^0$  erfolgte aus dem Schnittpunkt der beiden Asymptoten. Das Standardpotential  $E_0'$  wurde durch Iteration unter Minimierung der Summe der quadratischen Abweichungen zwischen gemessenen und berechneten Eich-

signalen ermittelt (Methode der kleinsten Fehlerquadrate nach Gauß). Die Berechnungen wurden mit Hilfe eines Tabellen-Kalkulationsprogramms (Excel, Microsoft) durchgeführt.

### **2.5.1 Eichung Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>-und K<sup>+</sup>-sensitiver Mikroelektroden**

Die ionensensitiven Mikroelektroden wurden vor und nach jeder Messung geeicht. Berechnungen nach dem Debye-Hückel Formalismus (Ammann, 1986) zeigen, dass sich die Aktivitätskoeffizienten für Na<sup>+</sup>-Ionen zwischen der höchsten und der niedrigsten Messionenkonzentration in den verwendeten Eichlösungen um weniger als 2% ändern, obwohl die Gesamtionenstärke in diesen Eichlösungen nicht exakt gleich war. Aus diesem Grund konnte, ebenso wie für die Eichung Cl<sup>-</sup>- und K<sup>+</sup>-sensitiver Mikroelektroden mit Eichlösungen unveränderter Ionenstärke (Tabelle 2 und 3), Gleichung 8 (Kapitel 2.5) verwendet werden.

Auf Grund der starken Interferenz des Na<sup>+</sup>-Sensors gegenüber Ca<sup>2+</sup>-Ionen wurden die zur Eichung Na<sup>+</sup>-sensitiver Mikroelektroden hergestellten Lösungen mit jeweils 1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis[2-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Sigma) und 0,73 mM CaCl<sub>2</sub> auf eine Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 10<sup>-7</sup> M gepuffert (Berechnung nach Pershadsingh & McDonald, 1980). Dies entspricht in etwa der in Retzius-Neuronen bestimmten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Hochstrate & Schlue, 1994; Hochstrate et al., 1995). Die Lösungen enthielten außerdem einen konstanten Ionenhintergrund (in mM): 80 KCl, 0,5 MgCl<sub>2</sub> und 10 HEPES (pH-Puffer, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Appli Chem). Die Na<sup>+</sup>-Konzentration betrug 50, 10, 2,5 bzw 0 mM. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,3 eingestellt.

Die Eichung Cl<sup>-</sup>-sensitiver Mikroelektroden erfolgte in Eichlösungen mit Gluconatsalzen der Kationen K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Mg<sup>2+</sup>. Die gewünschte Cl<sup>-</sup>-Konzentration wurde durch Austausch der entsprechenden Menge an K<sup>+</sup>-Gluconat gegen KCl eingestellt, wodurch sich eine konstante Gesamtionenstärke ergab (Tabelle 2). Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Gesamtionenstärke in Eichlösungen für K<sup>+</sup>-sensitiven Mikroelektroden wurde die NaCl-Konzentration entsprechend variiert (Tabelle 3).

**Tabelle 2: Eichlösungen für Cl<sup>-</sup>-sensitive Mikroelektroden**

<b>Cl<sup>-</sup>-Konzentration</b>	<b>KCl (mM)</b>	<b>K-Gluconat (mM)</b>
<b>50 mM</b>	50	30
<b>10 mM</b>	10	70
<b>2,5 mM</b>	2,5	77,5
<b>0 mM</b>	0	80

*Die Eichlösungen enthielten als konstanten Ionenhintergrund 5 mM Na-Gluconat, 0,5 mM Mg-Gluconat und 10 mM HEPES. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,3 eingestellt.*

**Tabelle 3: Eichlösungen für K<sup>+</sup>-sensitive Mikroelektroden**

<b>K<sup>+</sup>-Konzentration</b>	<b>KCl (mM)</b>	<b>NaCl (mM)</b>
<b>100 mM</b>	100	0
<b>25 mM</b>	25	75
<b>5 mM</b>	5	95
<b>0 mM</b>	0	100

*Die Eichlösungen enthielten als konstanten Ionenhintergrund 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM HEPES. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt.*

Nur solche ionensensitiven Mikroelektroden wurden verwendet, deren Steigung im linearen Messbereich mindestens 70% (Cl<sup>-</sup>) bzw. 75% (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) der Nernst-Steigung betrug und deren Detektionslimit unterhalb der zu erwartenden Messionenkonzentration lag.

Tabelle 4 gibt die Mittelwerte für Steigung und Detektionslimit der verschiedenen ionensensitiven Mikroelektroden wieder. Für die jeweiligen Sensoren wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Zwei- bzw. Dreikanal-Mikroelektroden gefunden, so dass diese Werte zusammengefasst werden konnten.

**Tabelle 4: Steigung (s) und Detektionslimit ( $c_i^0$ ) der verwendeten ionensensitiven Mikroelektroden**

Sensitivität	Anzahl der Kanäle	s (mV)	$c_i^0$ (mM)	s gesamt (mV)	$c_i^0$ gesamt (mM)
<b>K<sup>+</sup></b> (Valinomycin)	2	-54,9 ± 1,3 n=10	0,26 ± 0,10 n=10	-53,7 ± 3,4 n=28	0,44 ± 0,37 n=28
	3	-53,6 ± 4,2 n=18	0,53 ± 0,42 n=18		
<b>K<sup>+</sup></b> (Corning 477317)	2	-49,1 ± 1,6 n=9	1,13 ± 0,14 n=9	-50,1 ± 2,3 n=21	1,12 ± 0,15 n=21
	3	-50,8 ± 2,4 n=12	1,11 ± 0,16 n=12		
<b>Na<sup>+</sup></b>	2	-47,8 ± 3,4 n=12	0,92 ± 0,25 n=12	-48,5 ± 5,6 n=27	0,91 ± 0,28 n=27
	3	-49,2 ± 6,9 n=15	0,89 ± 0,30 n=15		
<b>Cl<sup>-</sup></b>	2	51,3 ± 6,4 n=18	0,29 ± 0,15 n=18	52,8 ± 5,9 n=56	0,27 ± 0,16 n=56
	3	53,6 ± 5,6 n=38	0,26 ± 0,17 n=38		

Die K<sup>+</sup>-sensitiven Zweikanal-Mikroelektroden mit Corning 477317 waren vom gedrehten Typ, während alle anderen Zweikanal-Mikroelektroden vom Theta-Typ waren.

### **2.5.2 Sensitivität des klassischen Ionenaustauschers Corning 477317 für quaternäre Ammoniumionen**

Der Flüssigmembran-Ionophor Corning 477317, ursprünglich als  $K^+$ -Sensor hergestellt, zeigt eine wesentlich höhere Sensitivität gegenüber quaternären Ammoniumionen (Neher & Lux, 1973). Diese Eigenschaft kann zur Bestimmung des relativen Zellvolumens genutzt werden (Reuss, 1985; Ballanyi et al., 1990; Alvarez-Leefmans, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck ausschließlich Tetramethylammonium<sup>+</sup> ( $TMA^+$ ) verwendet (siehe auch Kapitel 2.6). Zur Eichung Corning 477317 gefüllter ionensensitiver Mikroelektroden wurden Eichlösungen hergestellt, die folgenden ionalen Hintergrund aufwiesen (in mM): 80 KCl, 5 NaCl, 0,5  $MgCl_2$  und 10 HEPES. In diesen Lösungen wurde der pH-Wert auf Grund der  $K^+$ -Sensitivität des Sensors mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Die  $TMA^+$ -Konzentration wurde durch Zugabe von TMA-Cl auf 10, 2,5 bzw. 0,5 mM eingestellt. In Abb. 5 sind Registrierbeispiele von Eichungen ionensensitiver Dreikanal-Mikroelektroden dargestellt, deren mittlerer Kanal mit Corning 477317 gefüllt war, während der zweite silanisierte Kanal ein Flüssigmembran-Ionophor enthielt, das entweder für  $Cl^-$ ,  $K^+$  oder  $Na^+$  sensitiv war. Die in den  $TMA^+$ -Eichungen ermittelten Werte für Steigung und Detektionslimit betragen bei Zweikanal-Mikroelektroden des gedrehten Typs  $-59,6 \pm 6,3$  mV und  $0,13 \pm 0,04$  mM ( $n=37$ ). Dreikanal-Mikroelektroden wiesen das bereits von Ballanyi & Schlue (1989) beschriebene Hyper-Nernst-Verhalten mit einer Steigung von  $-68,1 \pm 11,8$  mV ( $n=69$ ) auf und unterschieden sich hinsichtlich dieser Eigenschaft und im Detektionslimit ( $0,24 \pm 0,14$  mM) signifikant von den verwendeten Zweikanal-Mikroelektroden. Die  $K^+$ -Sensitivität des klassischen Ionenaustauschers Corning 477317 wird durch  $TMA^+$  vollständig unterdrückt (Abb. 6). In einer vorhergehenden Arbeit wurde gezeigt, dass bereits bei einer  $TMA^+$ -Konzentration, die dem 2,5-fachen des  $TMA^+$ -Detektionslimits der Elektrode entspricht, der Sensor  $K^+$ -insensitiv wird (Neumann, 2000).

## 2.6 Messung des Zellvolumens mit Hilfe ionensensitiver Mikroelektroden

Die Messung des Zellvolumens mit ionensensitiven Mikroelektroden erfordert die Markierung des intrazellulären Volumens mit einer Ionensorte (Volumenmarker), deren Registrierung durch ionensensitive Mikroelektroden möglich ist. Um eine Fehlinterpretation des Ionensignals ausschließen zu können, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Ionen, die als Volumenmarker eingesetzt werden, sollten unter physiologischen Bedingungen in der Zelle nicht vorkommen.
- Die Registrierung des Volumenmarkers sollte mit Hilfe eines Sensors geschehen, der nur für diese Ionensorte sensitiv ist und der andere in der Zelle vorkommende Ionensorten nicht erkennt.
- Der Volumenmarker sollte nicht in den Metabolismus der Zelle eingebunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Grund seiner bekannten hohen Sensitivität für quaternäre Ammoniumionen Corning 477317 für die Volumenmessungen verwendet. Frühere Experimente zeigten, dass ionensensitive Mikroelektroden mit diesem Sensor auf verschiedene quaternäre Ammoniumionen unterschiedlich ansprechen, wobei die Antworten auf  $\text{TMA}^+$  die größte Stabilität besaßen (Neumann et al., 2001). Daher wurde in dieser Arbeit auf  $\text{TMA}^+$  als Volumenmarker zurückgegriffen. Die Beladung der Retzius-Neuronen mit  $\text{TMA}^+$  erfolgte durch die Applikation von 5 mM TMA-Cl in NSL. Anhand von Änderungen der intrazellulären  $\text{TMA}^+$ -Konzentration ( $[\text{TMA}^+]_i$ ) war es möglich, auf relative Volumenänderungen der Zelle zu schließen: Ein Anstieg von  $[\text{TMA}^+]_i$  bedeutet eine Volumenabnahme, während ein Absinken von  $[\text{TMA}^+]_i$  eine Volumenzunahme anzeigt. Die prozentuale Volumenänderung ( $\Delta\text{Vol. in } \%$ ) lässt sich aus den  $\text{TMA}^+$ -Konzentrationen unter Kontrollbedingungen ( $[\text{TMA}^+]_{\text{Kon}}$ ) und unter experimentellen Bedingungen ( $[\text{TMA}^+]_{\text{Exp}}$ ) wie folgt berechnen (Ballanyi et al., 1990):

$$\Delta\text{Vol.}(\%) = 100 \cdot \frac{[\text{TMA}^+]_{\text{Kon}}}{[\text{TMA}^+]_{\text{Exp}}} - 100 \quad (9)$$

Diese Gleichung ist nur anwendbar, wenn  $[TMA^+]_i$  ausschließlich durch Änderungen des Zellvolumens beeinflusst wird. Da bei den in dieser Arbeit untersuchten Neuronen des Blutegels ein kontinuierlicher Verlust von  $[TMA^+]_i$  auftrat, waren zusätzliche Berechnungen nötig. Der  $TMA^+$ -Verlust der Zellen nach Wegnahme des TMA-Cl aus der Badlösung erfolgte deutlich langsamer als die  $TMA^+$ -Aufnahme und konnte mit einer Exponentialfunktion angefitet werden (Berechnung in Excel, Microsoft; Abb. 7 A). Diese berechneten  $[TMA^+]_i$ -Werte entsprachen der unter Annahme eines konstanten Zellvolumens in der Zelle befindlichen  $[TMA^+]$  und konnten als Kontrollwerte ( $[TMA^+]_{Kon}$ ) verwendet werden. Das Verhältnis  $[TMA^+]_{Exp} / [TMA^+]_{Kon}$  lieferte die relative  $[TMA^+]_i$  ( $[TMA^+]_{rel.}$ , Abb. 7 B), bei der der Verlust an  $TMA^+$  während der Messung herausgerechnet ist. Der Kehrwert von  $[TMA^+]_{rel.}$  entspricht dem relativen Zellvolumen ( $Vol_{rel.}$ ; Abb. 7 C).

## **2.7 Versuchsaufbau**

Die Versuchsanordnung (Versuchswanne, Mikromanipulator und Messköpfe der Verstärker) wurde zur Abschirmung von elektrischen Störeinflüssen in einem Faraday-Käfig untergebracht. Nach der Voreichung der ionensensitiven Mikroelektrode wurde ein einzelnes Blutegel-Ganglion in eine mit Sylgard (Dow Corning) ausgegossene und mit NSL gefüllte Versuchswanne (Volumen ca. 0,2 ml) überführt. Mit Hilfe von je zwei Minutiennadeln wurde das Ganglion an beiden Konnektiven so festgesteckt, dass die Ventralseite und somit die Zellkörper von Retzius- und P-Neuronen nach oben wiesen. Der Lösungsaustausch fand über ein Perfusionssystem statt, wobei der Lösungszufluss über eine Rollenpumpe (Watson-Marlow) und der Lösungsabfluss über eine Vakuumpumpe (Hyflo, Medcalf Bros. LTD) erfolgte. Der Lösungszufluss wurde über einen Windkessel geleitet, um den Eintritt von Luftblasen in die Versuchswanne zu vermeiden. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 2,7 ml/min. Die Badlösung wurde über eine Agarbrücke (3% Agar in 3 M KCl) geerdet. Die ionensensitiven Mikroelektroden wurden unter Sichtkontrolle (Binokular, Zeiss) mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz) über den Neuronen positioniert und eingestochen.

Die Signale der ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektroden wurden über einen Zweikanal-Differenzverstärker (WPI FD 223) registriert, der zwei hochohmige Eingänge ( $10^{15} \Omega$ ) besaß. Der ionensensitive Kanal der Mikroelektrode wurde mit dem Eingang  $A_1$  und der Referenzkanal mit dem Eingang  $B_1$  des Verstärkers verbunden. Durch einen integrierten Differenzverstärker konnte  $E_{\text{Ref}}$  (Kanal  $B_1$ ) vom Summenpotential ( $E_{\text{Ref}} + E_{\text{Ion}}$ , Kanal  $A_1$ ) subtrahiert und  $E_{\text{Ion}}$  ermittelt werden (Abb. 3 A). Die Messdaten wurden erneut verstärkt und gefiltert (Zwischenverstärker, Eigenbau der Universitätswerkstatt), mit einer Abtastrate von 20 Hz digitalisiert (Analog-Digital-Wandlerkarte, PCL-812P6, Advantech) und durch einen Computer aufgezeichnet.  $E_{\text{Ref}}$  wurde zusätzlich mit Hilfe eines Tintenschreiber (Gould) registriert. Bei Messungen mit ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden wurde ein weiterer Verstärker (WPI Duo 773) verwendet. Auf Grund der unterschiedlichen Eingangswiderstände der beiden Kanäle dieses Verstärkers (Kanal  $A_2$  hochohmig  $R=10^{15} \Omega$ , Kanal  $B_2$  niederohmig  $R=10^{11} \Omega$ ) wurde Kanal  $B_2$  nicht zur Korrektur des Summenpotentials auf Kanal  $A_2$  um  $E_{\text{Ref}}$  herangezogen. Die Summenpotentiale auf Kanal  $A_1$  und  $A_2$  wurden abgeleitet und  $E_{\text{Ref}}$  auf Kanal  $B_1$  wurde vom Aufzeichnungscomputer von beiden Potentialen subtrahiert (Abb. 3 B). Ansonsten erfolgte die Aufzeichnung der Messdaten entsprechend derjenigen ionensensitiver Zweikanal-Mikroelektroden. Die Konvertierung der Messdaten in ein Format, das in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) eingelesen werden konnte, wurde mit Hilfe eines Datenwandlungsprogramms durchgeführt (E. von Berg, Institut für Neurobiologie, Universität Düsseldorf).

## **2.8 Mikrofluorimetrische Messungen**

Die selektive Bindung von Ionen an Fluoreszenz-Farbstoffe bietet neben der Methode der ionensensitiven Mikroelektroden eine weitere Möglichkeit, um intrazelluläre freie Ionenkonzentrationen zu bestimmen. Dieses Messprinzip beruht auf der Änderung der Extinktions- bzw. Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Bindung bestimmter Ionen (Tsien, 1989). Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (Molecular Probes; Grynkiewicz et al., 1985) und  $[\text{Na}^+]_i$  mit

Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate, Molecular Probes; Minta & Tsien, 1989) bestimmt.

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

Die Bindung von  $Ca^{2+}$  an Fura-2 folgt einer 1:1 Stöchiometrie und bewirkt eine Verschiebung des Extinktionsspektrums in den kurzwelligeren Bereich. Die *Ratio*-Methode nutzt diese Eigenschaft, um aus dem Verhältnis (*Ratio*) der Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen  $[Ca^{2+}]_i$  zu ermitteln (Grynkiewicz et al., 1985). Im Gegensatz zu mikrofluorimetrischen Messungen mit nur einer Anregungswellenlänge eignet sich die *Ratio*-Methode besonders für physiologische Untersuchungen, da  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig von der Farbstoffkonzentration und verschiedenen apparativen Parametern bestimmt werden kann. Experimentelle Schwankungen, welche die Fluoreszenzemission bei beiden Anregungswellenlängen gleichermaßen beeinflussen, beispielsweise ein Ausbleichen des Farbstoffs, werden bei der *Ratio*-Methode umgangen. Der Farbstoff wird alternierend mit zwei Wellenlängen ( $\lambda_1$  und  $\lambda_2$ ) angeregt, wobei mit  $\lambda_1=340$  nm vorwiegend die  $Ca^{2+}$ -beladene und mit  $\lambda_2=380$  nm die  $Ca^{2+}$ -freie Form des Farbstoffs angeregt wird.  $[Ca^{2+}]_i$  wird aus dem Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten ( $F_1$  und  $F_2$ ,  $R=F_1/F_2$ ) bestimmt.  $F_1$  und  $F_2$  lassen sich durch folgende Gleichungen beschreiben (Grynkiewicz et al., 1985):

$$F_1 = S_{f1} \cdot c_f + S_{b1} \cdot c_b \quad (10)$$

$$F_2 = S_{f2} \cdot c_f + S_{b2} \cdot c_b \quad (11)$$

$c_f, c_b$ : Konzentration des  $Ca^{2+}$ -freien,  $Ca^{2+}$ -beladenen Farbstoffs

$S_{f1}, S_{f2}$ : Proportionalitätsfaktoren (apparative Parameter, physikalische Farbstoffparameter) des  $Ca^{2+}$ -freien Farbstoffs bei Anregung mit  $\lambda_1$  bzw.  $\lambda_2$

$S_{b1}, S_{b2}$ : Proportionalitätsfaktoren des  $Ca^{2+}$ -beladenen Farbstoffs

Die Konzentrationen  $c_f$  und  $c_b$  sind über die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) des  $Ca^{2+}$ -Fura-2-Komplexes mit  $[Ca^{2+}]$  verknüpft:

$$c_b = \frac{c_f \cdot [Ca^{2+}]}{K_d} \quad (12)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (12) in Gleichung (10) und (11) ergibt sich für das Verhältnis  $R=F_1/F_2$  folgender Zusammenhang:

$$R = \frac{S_{f1} + \frac{S_{b1} \cdot [Ca^{2+}]}{K_d}}{S_{f2} + \frac{S_{b2} \cdot [Ca^{2+}]}{K_d}} \quad (13)$$

Die Auflösung nach  $[Ca^{2+}]$  ergibt Gleichung (14):

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - \frac{S_{f1}}{S_{f2}}}{\frac{S_{b1}}{S_{b2}} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (14)$$

Das Verhältnis  $S_{f1}/S_{f2}$  stellt den minimalen Wert für  $R$  ( $R_{min}$ ) dar, der sich bei völliger Abwesenheit von  $[Ca^{2+}]$  einstellt.  $S_{b1}/S_{b2}$  stellt den maximalen Wert für  $R$  ( $R_{max}$ ) dar, der sich bei völliger  $Ca^{2+}$ -Sättigung von Fura-2 einstellt. Auf dieser Grundlage ergibt sich:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (15)$$

Die Werte für  $R_{min}$ ,  $R_{max}$  und  $S_{f2}/S_{b2}$  wurden durch eine *in-vitro*-Eichung bestimmt (Hochstrate et al., 1995) und für  $K_d$  wurde ein Literaturwert (Grynkiewicz et al., 1985) verwendet. Folgende Kalibrierungsfaktoren wurden erhalten:

$$R_{min}=0,27 \quad , \quad R_{max}=7,56 \quad , \quad S_{f2}/S_{b2}=11,3 \quad , \quad K_d=135 \text{ nM}$$

Abb. 8 A zeigt die Anregungsspektren der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Form des Farbstoffs. Der Zusammenhang zwischen R und  $[\text{Ca}^{2+}]$  ist in Abb. 8 B dargestellt.

### 2.8.2 Messung von $[\text{Na}^+]_i$ mit SBFI

Der Fluoreszenzfarbstoff SBFI wurde zur mikrofluorimetrischen Bestimmung von  $[\text{Na}^+]_i$  verwendet. Die Bindung von  $\text{Na}^+$  an den Farbstoff folgt einer 1:1 Stöchiometrie. Das Emissionsspektrum von SBFI verschiebt sich durch die Bindung von  $\text{Na}^+$  zu kürzeren Wellenlängen. Auch die SBFI-Fluoreszenz wurde anhand der Änderung im Anregungsspektrum nach der Ratio-Methode ausgewertet. Die Anregung erfolgte ebenfalls bei den Wellenlängen  $\lambda_1=340$  nm und  $\lambda_2=380$  nm. Für  $[\text{Na}^+]_i$  ergibt sich entsprechend zu Gleichung (15):

$$[\text{Na}^+]_i = K_d \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (16)$$

Da sich die *in vitro*-Eichung von SBFI nicht auf die intrazellulären Verhältnisse übertragen (Dierkes et al., 1996) ließ, wurde das bei Retzius-Neuronen gemessene Fluoreszenzsignal anhand von Messungen der  $[\text{Na}^+]_i$  mittels ionensensitiver Mikroelektroden geeicht. Zu diesem Zweck wurden Werte für R unter identischen Versuchsbedingungen ermittelt wie Werte für  $[\text{Na}^+]_i$  mit ionensensitiven Mikroelektroden. Als Eichparameter wurden folgende Werte verwendet:

$$R_{\min}=0,68 \quad , \quad R_{\max}=2,18 \quad , \quad S_{f2}/S_{b2}=4,72 \quad , \quad K_d=17 \text{ mM}$$

Für die iontophoretische Injektion von SBFI wurden Elektroden mit einem größeren Spitzendurchmesser verwendet als für die Injektion von Fura-2, da die mit SBFI gefüllten Elektroden leichter verstopften und der Injektionsstrom schnell abnahm.

### **2.8.3 Mikrofluorimeter**

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem kommerziellen Mikrofluorimeter (Deltascan 4000; PTI, Photon Technology International) durchgeführt. Das Licht aus einer Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio, UXL-75XE; 75 W) wurde mit Hilfe einer rotierenden Sektorenscheibe (Chopper) alternierend auf zwei Gitter-Monochromatoren (PTI Model 01-001; 1200 Furchen/mm) geleitet und in seine spektralen Anteile zerlegt. Über einen Quarzlichtleiter gelangte Licht der gewünschten Anregungswellenlängen in den Epi-fluoreszenzeingang eines inversen Mikroskops (Diaphot-TMD, Nikon) und über das Objektiv (Nikon, Fluor 40 Ph3DL, 40-fach) auf das Ganglion im Versuchsbad, das sich auf dem Kreuztisch des Mikroskops befand. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde über das Objektiv zu einem Sperrfilter (Nikon, BA 510/540) geleitet, der das Anregungslicht herausfilterte und gelangte schließlich zum Photomultiplier (PMT 4000, PTI). Das Signal des Photomultipliers wurde zur Datenerfassung und Datenauswertung an einen Computer (Software PTI) weitergeleitet. Die Frequenz der Abtastrate von R ( $F_1/F_2$ ) betrug 1 Hz.

### **2.8.4 Durchführung mikrofluorimetrischer Messungen**

Die Ganglien wurden mit einem Halter fixiert bei dem mit Hilfe von zwei, flach auf eine 10 x 5 mm große Deckglasscheibe (Dicke: 0,15 mm) aufgeklebten Minutiennadeln die Konnektive so eingeklemmt wurden, dass die Ventralseite des Ganglions nach oben wies. Die iontophoretische Injektion des Farbstoffs mit den unter 2.3 beschriebenen Einzelkanal-Mikroelektroden erfolgte unter optischer Kontrolle mittels hyperpolarisierender Ströme (Iontophorese-Verstärker L/M-1, List). Anschließend wurde der Halter mit dem Ganglion in das Versuchsbad des Mikrofluorimeters überführt, das zum Lösungsaustausch an ein gravitationsgetriebenes Perfusionssystem angeschlossen war. Der Arbeitsabstand zum Objektiv betrug 300  $\mu\text{m}$ .

## **2.9 Messung des Zellvolumens mit Fura-2**

Bei Messungen von Zellvolumenänderungen mit Fura-2 diente der Fluoreszenzfarbstoff als Volumenmarker (Muallem et al., 1992; Dierkes, 1998). Die Fluoreszenzanregung erfolgt bei dieser Methode am Isofluarpunkt (360 nm), der den Schnittpunkt der Anregungsspektren der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Form von Fura-2 darstellt (Abb. 8 A). Am Isofluarpunkt ist die Fluoreszenzemission unabhängig von der Konzentration des bindenden Ions, jedoch abhängig von der Farbstoffkonzentration. Veränderungen der Fluoreszenzemission am Isofluarpunkt spiegeln demnach Veränderungen in der Farbstoffkonzentration (Volumenmarkerkonzentration) wider. Diese Methode erfordert eine Optik mit hoher Auflösung, so dass die Messung der Fluoreszenzemission auf ein kleines Areal beschränkt bleibt. Innerhalb dieses Areals entspricht eine Abnahme der Fluoreszenzemission einer Volumenzunahme (Wasseraufnahme) und umgekehrt eine Zunahme in der Fluoreszenzemission einer Volumenabnahme (Wasserabgabe). In diesem Areal ist die Fluoreszenzemission umgekehrt proportional zur Volumenänderung. Zur simultanen Messung von Volumenänderungen und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde Fura-2 mit den Wellenlängen 360 nm bzw. 340 und 380 nm alternierend angeregt.

## **2.10 Versuchslösungen und Pharmaka**

Die Versuchslösungen wurden mit Hilfe von Stammlösungen (NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und TMA-Cl) hergestellt, deren Konzentration jeweils 1 M betrug. Zusätzlich wurden eine 0,2 M HEPES- und eine 0,5 M NMDG-Cl (N-Methyl-D-Glucamin-OH + HCl)-Stammlösung verwendet. Zur Herstellung der NMDG-Cl-Stammlösung wurden NMDG-OH und HCl zu gleichen Teilen gemischt. Der pH-Wert 7,4 wurde bei  $\text{Na}^+$ -haltigen Lösungen mit NaOH und bei  $\text{Na}^+$ -freien Lösungen mit NMDG-OH eingestellt. Alle Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt (Entsalzungsanlage: Millipore, spezifischer Widerstand:  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) und mit 10 mM HEPES gepuffert. Die Versuchslösungen wurden mit Hilfe eines Osmometers (Gonotec Osmomat 030) hinsichtlich ihrer Osmolalität überwacht.

Die Normalsalzlösung enthielt die Chloridsalze folgender Kationen (in mM): 85 Na<sup>+</sup>, 4 K<sup>+</sup>, 2 Ca<sup>2+</sup> und 1 Mg<sup>2+</sup>. Die Osmolalität betrug 192,6 mOsm/kg. In der Na<sup>+</sup>-freien Lösung war NaCl durch NMDG-Cl ersetzt. Um Cl<sup>-</sup>-freie Lösung herzustellen, wurden Gluconatsalze anstelle der Chloridsalze verwendet. Da Gluconate divalente Kationen wie Mg<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup> binden, wurde zur Aufrechterhaltung einer konstanten Osmolalität zusätzlich 5 mM Na-Gluconat hinzugegeben. Die Cl<sup>-</sup>-freie Lösung war folgendermaßen zusammengesetzt (in mM): 90 Na<sup>+</sup>, 4 K<sup>+</sup>, 2 Ca<sup>2+</sup> und 1 Mg<sup>2+</sup>; die Osmolalität der Lösung betrug 192 mOsm/kg. In Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung war das CaCl<sub>2</sub> durch 5 mM EGTA ersetzt. Die Zusammensetzung der Versuchslösungen mit veränderter K<sup>+</sup>-Konzentration ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Bei Lösungen mit erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentration wurde zur Aufrechterhaltung einer konstanten Osmolalität ein entsprechender Anteil von NaCl durch KCl ersetzt, während bei der K<sup>+</sup>-freien Lösung NaCl um 4 mM erhöht wurde.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Versuchslösungen mit veränderter K<sup>+</sup>-Konzentration**

<b>K<sup>+</sup> (mM)</b>	-	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>89</b>
<b>NaCl (mM)</b>	89	79	77	74	71	69	59	49	-
<b>KCl (mM)</b>	-	10	12	15	18	20	30	40	89
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Beeinflussung verschiedener Rezeptoren unterschiedliche Pharmaka eingesetzt (Tabelle 6), von denen lediglich Kainat und Glutamat aus einer wässrigen Stammlösung (25 mM und 1 M) zu den Versuchslösungen hinzupipettiert wurden, während alle weiteren Agonisten bzw. Antagonisten abgewogen und in den Versuchslösungen direkt gelöst wurden.

Tabelle 6: Pharmake zur Beeinflussung von Rezeptoren

Substanz	Wirkung; vollständiger Name	Quelle
<b>L-Glutamat</b>	Physiologischer Agonist glutamaterger Rezeptoren; L-Glutaminsäure Natriumsalz	Sigma
<b>Kainat</b>	Agonist glutamaterger Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ; 2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidin	Sigma, Tocris
<b>(S)-AMPA</b>	Agonist glutamaterger Rezeptoren vom AMPA-Typ; (S)- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-propionsäure	Tocris
<b>(RS)- Willardiine</b>	Agonist glutamaterger Rezeptoren vom AMPA-Typ; (RS)- $\alpha$ (Amino)-3,4-dihydro-2,4-dioxo- 1(2H)pyridinpropionsäure	Tocris
<b>SYM 2081</b>	Agonist glutamaterger Rezeptoren vom Kainat-Typ; (2S,4R)-4-Methylglutaminsäure	Tocris
<b>5-HT</b>	physiologischer Agonist von 5-HT-Rezeptoren; 3-(2-Aminoethyl)-5-hydroxyindol (5-Hydroxytryptamin, Creatinsulfat-Komplex, anderer Name: Serotonin)	Sigma
<b>DNQX</b>	Antagonist glutamaterger Rezeptoren vom AMPA/Kainat- Typ; 6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dien	Tocris
<b>d-Tubocurarin</b>	nikotinischer Antagonist (Chloridsalz)	Sigma

## 2.11 Auswertung der Daten

Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des t-Tests nach *Student* überprüft, der mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel durchgeführt wurde. Das Signifikanzniveau wurde zu  $p \leq 0,05$  (hochsignifikant  $p \leq 0,01$ ) festgelegt. Die Standardabweichungen in den Ionenbilanzen wurden folgendermaßen berechnet: Die Varianzen der Standardabweichungen der einzelnen Mittelwerte wurden gebildet. Die Wurzel aus der Summe der Varianzen entsprach der gesamten Standardabweichung.

Da die Messungen mit ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden eine simultane Bestimmung des Zellvolumens und einer intrazellulären Ionenkonzentration ermöglichten, war es möglich zu prüfen, ob eine Änderung der Ionenkonzentrationen auf einen Io-

nentransport in bzw. aus dem Cytosol heraus beruhte oder auf der Aufnahme bzw. Abgabe von Wasser. Die Messwerte der intrazellulären Ionenkonzentrationen wurden mit den Werten für  $\text{Vol.}_{\text{rel.}}$  multipliziert. Hieraus ergaben sich intrazelluläre Ionenkonzentrationen unter Annahme eines konstanten Zellvolumens. Eine Abweichung dieses Produktes von den Messwerten der intrazellulären Ionenkonzentrationen ließ auf einen Ionentransport schließen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Membranpotential und intrazelluläre Ionenkonzentrationen im Ruhezustand

Durch den Einstich der Elektrode wurde die Plasmamembran der Zellen verletzt, so dass unmittelbar nach dem Einstich stets eine Verschiebung des Membranpotentials zu weniger negativen Werten auftrat. Ebenso erfolgte ein Anstieg der intrazellulären Ionenkonzentrationen von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Cl}^-]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$ ) sowie ein Abfall der intrazellulären Ionenkonzentration von  $\text{K}^+$  ( $[\text{K}^+]_i$ ). Diese Änderungen waren jedoch transient und wurden nach einigen Minuten wieder zurückreguliert. Sobald dieser Einheilungsprozess der Elektrode abgeschlossen war und Membranpotential sowie intrazelluläre Ionenkonzentrationen konstante Werte erreicht hatten, wurden das Membranruhepotential ( $E_{m\text{-Ruhe}}$ ) und die Ruhewerte von  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{K}^+]_i$  bestimmt. Anschließend erfolgte die Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker  $\text{TMA}^+$  durch Umspülen des Ganglions mit 5 mM TMA-Cl in NSL (Abb. 7).

##### 3.1.1 Retzius-Neuronen

Mit Zweikanal-Mikroelektroden wurde im Mittel ein  $E_{m\text{-Ruhe}}$  von  $-48,8 \pm 9,9$  mV ( $n=75$ ) bestimmt. Mit Dreikanal-Mikroelektroden wurde ein Wert von  $-46,4 \pm 8,9$  mV ( $n=78$ ) ermittelt. Beide Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Insgesamt ergibt sich daraus für Retzius-Neuronen ein mittleres  $E_{m\text{-Ruhe}}$  von  $-47,5 \pm 9,5$  mV ( $n=153$ ).

Die intrazellulären Konzentrationen von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  wurden mit ionensensitiven Zweikanal und Dreikanal-Mikroelektroden bestimmt, wobei zur Ermittlung von  $[\text{K}^+]_i$  sowohl der klassische Ionenaustauscher Corning 477317 als auch der neutrale Carrier Valinomycin herangezogen wurden. Die mit den beiden Elektrodentypen erhaltenen

Messwerte unterschieden sich nicht signifikant von einander und konnten daher insgesamt gemittelt werden. Auch die mit den zwei verschiedenen  $K^+$ -Sensoren ermittelten Werte für  $[K^+]_i$  wichen nicht signifikant voneinander ab (Tabelle 7).

**Tabelle 7:  $[Cl^-]_i$ ,  $[Na^+]_i$  und  $[K^+]_i$  von Retzius-Neuronen unter Ruhebedingungen**

	Zweikanal-Elektroden	Dreikanal-Elektroden	Gesamt
$[Cl^-]_i$ (mM) n	7,6 $\pm 0,8$ 4	10,4 $\pm 3,8$ 29	10,1 $\pm 3,7$ 33
$[Na^+]_i$ (mM) n	7,5 $\pm 3,2$ 5	10,0 $\pm 2,6$ 9	9,1 $\pm 3,0$ 14
$[K^+]_i$ Corning 477317 (mM) n	87,7 $\pm 18,6$ 11	88,9 $\pm 19,4$ 12	88,3 $\pm 18,6$ 23
$[K^+]_i$ Valinomycin (mM) n	69,3 $\pm 10,6$ 6	84,5 $\pm 16,4$ 14	80,5 $\pm 16,6$ 19

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SBFI wurde für  $[Na^+]_i$  ein Ruhewert von  $6,6 \pm 1,6$  mM (n=4) ermittelt, welcher sich nicht signifikant von dem mit ionensensitiven Mikroelektroden ermittelten Wert unterschied. Der Ruhewert der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 zu  $65 \pm 26$  nM (n=11) bestimmt.

### 3.1.2 P-Neuronen

Die elektrophysiologischen Messungen bei P-Neuronen wurden ausschließlich mit Hilfe von ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektroden durchgeführt, da sich diese Zellen im Unterschied zu Retzius-Neuronen vom Einstich einer Dreikanal-Mikroelektrode nicht oder nur sehr langsam erholten. Dies wurde daran deutlich, dass durch den Elektrodeneinstich hervorgerufene Anstiege in  $[Na^+]_i$  oder Abfälle in  $[K^+]_i$  nicht oder nur unvollständig zurück reguliert wurden.  $[K^+]_i$  wurde ausschließlich mit dem neutralen Carrier Valinomycin bestimmt. Das  $E_{m-Ruhe}$  betrug bei P-Neuronen  $-53,2 \pm 8,6$  mV (n=49). Die Ruhewerte für  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  lagen bei  $12,6 \pm 2,6$  mM (n=20),  $67,7 \pm 21,8$  mM (n=6) und  $9,6 \pm 3,2$  mM (n=13).

## 3.2 Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker TMA<sup>+</sup>

### 3.2.1 TMA<sup>+</sup>-Aufnahme

Alle bislang untersuchten Neuronen des medizinischen Blutegels sind in der Lage, TMA<sup>+</sup> aus der Badlösung aufzunehmen (Neumann et al., 2001). Die Ermittlung der TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate erfolgte im linearen Bereich des [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstiegs (Abb. 7). Bei Retzius-Neuronen betrug die mittlere TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate, bestimmt mit ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektroden,  $0,32 \pm 0,26$  mM/min (n=27). Ein identischer Wert wurde mit ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden bestimmt:  $0,30 \pm 0,19$  mM/min (n=62). Hieraus ergab sich ein Mittelwert von  $0,31 \pm 0,21$  mM/min (n=89). Die bei P-Neuronen ermittelte TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate von  $0,51 \pm 0,31$  mM/min (n=7) war signifikant höher als bei Retzius-Neuronen.

### 3.2.2 Einfluss der TMA<sup>+</sup>-Beladung auf [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> sowie auf das Membranpotential

Um zu überprüfen, ob die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme der Zellen Einfluss auf [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ausübte, wurden in den Messungen mit Dreikanal-Mikroelektroden die intrazellulären Ionenkonzentrationen nach jeweils 5-minütiger TMA<sup>+</sup>-Beladung mit den entsprechenden Konzentrationen zu Beginn der TMA<sup>+</sup>-Beladung verglichen (Tabelle 8). Eine Beeinflussung der Ionenpotentiale ( $E_{\text{Ion}}$ ) durch die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme der Zellen lag nur beim Sensor Corning 477317 ( $E_{\text{C}}$ ) vor. Alle anderen  $E_{\text{Ion}}$  zeigten keine oder vernachlässigbare Änderungen, so dass ein Effekt der steigenden [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> auf [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> oder [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ausgeschlossen werden konnte. Abb. 9 zeigt die TMA<sup>+</sup>-Beladung von Retzius-Neuronen anhand typischer Registrierbeispiele mit ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden. Das  $E_{\text{m}}$  der einzelnen Retzius-Neuronen reagierte auf die Applikation von TMA<sup>+</sup> sehr unterschiedlich (Abb. 9 C, 10 A-C). Die Membranantwort fiel in den meisten Fällen mehrphasisch aus. Meist folgte auf eine schnelle, transiente

Depolarisation eine langanhaltende De- oder Hyperpolarisation. Die Ausprägung der Antwortkomponenten war sehr variabel, so traten gelegentlich nur transiente bzw. anhaltende Komponenten auf (Abb. 10 C). Die Änderungen waren jedoch stets reversibel, denn nach Beendigung der TMA<sup>+</sup>-Beladung kehrte E<sub>m</sub> immer auf den vorherigen Wert zurück. Somit konnte ein langanhaltender Effekt der TMA<sup>+</sup>-Beladung auf die physiologischen Eigenschaften von Retzius-Neuronen ausgeschlossen werden.

**Tabelle 8: D[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, D[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und D[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> nach 5-minütiger TMA<sup>+</sup>-Beladung**

		D[TMA <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> (mM)	DE <sub>m</sub> (mV)
D[Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> (mM) n	-1,4 ± 3,0 25	1,02 ± 0,72 25	0,4 ± 4,6 25
D[K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> (mM) n	2,1 ± 3,9 9	1,15 ± 0,68 9	-1,4 ± 5,2 9
D[Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> (mM) n	1,9 ± 1,9 11	0,97 ± 0,57 11	2,7 ± 3,4 11

*Angegeben sind außerdem die jeweils simultan bestimmten Änderungen von [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und E<sub>m</sub>.*

Bei P-Neuronen erreichte [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub> nach 5-minütiger TMA<sup>+</sup>-Beladung durchschnittlich  $1,93 \pm 1,24$  mM (n=9). Sie zeigten im Vergleich zu Retzius-Neuronen jedoch nur eine geringe Membranpotentialantwort auf die Applikation von TMA<sup>+</sup>. Meist trat nur eine kleine transiente Änderung des E<sub>m</sub> auf (Abb. 10 D). Im Mittel war E<sub>m</sub> nach 5-minütiger TMA<sup>+</sup>-Beladung praktisch unverändert ( $0,6 \pm 3,0$  mV; n=9). Die Wirkung der TMA<sup>+</sup>-Beladung auf die intrazellulären Konzentrationen von Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> wurde bei P-Neuronen nicht untersucht. Die geringen Änderungen im E<sub>m</sub> lassen jedoch vermuten, dass diese Parameter während der Beladung nicht beeinflusst wurden.

### 3.3 Wirkung von 5-HT auf Zellvolumen, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und E<sub>m</sub>

5-HT ist ein wichtiger Neurotransmitter sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten. Bei Vertebraten werden einige grundlegende Eigenschaften wie Blutdruck, Körpertemperatur, Schlaf-Wach-Rhythmik und Nahrungsaufnahme von 5-HT moduliert

(Schloss & Williams, 1998). Beim Blutegel beeinflusst 5-HT unter anderem das Schwimm- und Fressverhalten (Lent & Dickinson, 1984). Die Wirkung von 5-HT wird durch mehrere unterschiedliche Rezeptoren vermittelt, die sich in 7 Hauptgruppen (5-HT<sub>1</sub> - 5-HT<sub>7</sub>) aufteilen lassen (Humphrey et al., 1993). Mit Ausnahme des ionotropen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors gehören die 5-HT-Rezeptoren zu den metabotropen Rezeptoren. Bei Retzius-Neuronen sprechen pharmakologische Befunde für metabotrope 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren (Lucht, 1997), die in der Regel über ein G-Protein die Phospholipase C aktivieren, die ihrerseits durch Spaltung von Phosphatidylinositol zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt (Brown et al., 1984). Bei P-Neuronen wurden neben 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren auch die ebenfalls metabotropen 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren postuliert (Lucht, 1997), die über ein G-Protein die Adenylatcyclase sowohl hemmen (5-HT<sub>1B-F</sub>) als auch aktivieren können (5-HT<sub>1A</sub>; Humphrey et al. 1993).

Bei Retzius-Neuronen führt 5-HT zu einer Hyperpolarisation, die auf einer Aktivierung von Cl<sup>-</sup>-Kanälen beruht (Munsch & Schlue, 1993). Bei P-Neuronen induziert 5-HT sowohl die Aktivierung von Cl<sup>-</sup>-Kanälen als auch die von unselektiven Kationenkanälen (Drapeau & Sanchez-Armass, 1988; Lucht, 1997). In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung von 5-HT auf das Zellvolumen von Retzius- und P-Neuronen untersucht.

### 3.3.1 Retzius-Neuronen

Die Wirkung von 5-HT auf das Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$ ,  $[Na^+]_i$  und  $E_m$  ist in Abb. 11 anhand typischer Registrierbeispiele von Messungen mit ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektroden dargestellt. Die 1-minütige Applikation von 5 mM 5-HT beeinflusste das Zellvolumen nicht und rief nur geringe Änderungen in den intrazellulären Ionenkonzentrationen hervor. Die Wirkung von 5-HT auf das  $E_m$  war uneinheitlich. 5-HT löste abhängig vom  $E_{m-Ruhe}$  und dem Cl<sup>-</sup>-Gleichgewichtspotential ( $E_{Cl}$ ) der Zellen entweder eine Depolarisation oder eine Hyperpolarisation aus, wobei  $E_m$  meist in Richtung von  $E_{Cl}$  verschoben wurde (Abb. 12). Auf die Applikation von 0,5 mM 5-HT reagierten 7 von 18 Zellen mit einer Depolarisation ( $2,2 \pm 1,6$  mV), die übrigen mit einer Hyperpolarisation ( $-4,4 \pm 3,9$  mV; n=11). Bei Applikation von 5 mM 5-HT

ergaben sich sehr ähnliche Verhältnisse: 7 von 19 Zellen depolarisierten ( $3,6 \pm 2,8$  mV) und 12 Zellen hyperpolarisierten ( $-5,5 \pm 2,6$  mV;  $n=12$ ). Tabelle 9 fasst die Wirkung von 5-HT auf das Zellvolumen und die intrazellulären Ionenkonzentrationen zusammen.

**Tabelle 9: Wirkung von 5-HT auf Zellvolumen,  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{K}^+]_i$  bei Retzius-Neuronen**

5-HT (mM)	DVol <sub>rel.</sub> (%)	D $[\text{Cl}^-]_i$ (mM)	D $[\text{Na}^+]_i$ (mM)	D $[\text{K}^+]_i$ (mM)
<b>0,5</b>	-0,9 $\pm 0,8$ n=3	-1,4 $\pm 1,2$ n=6	-0,1 $\pm 0,3$ n=3	0,9 $\pm 0,7$ n=6
<b>5</b>	-1,8 $\pm 6,6$ n=3	-0,6 $\pm 1,1$ n=4	0,4 $\pm 0,8$ n=4	2,2 $\pm 0,3$ n=4

Lediglich die  $[\text{K}^+]_i$ -Änderungen unterschieden sich in Abhängigkeit der Konzentration signifikant voneinander.

### 3.3.2 P-Neuronen

Die Messungen zur Wirkung von 5-HT auf Zellvolumen, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und  $E_m$  bei P-Neuronen wurden aus den unter 3.1.2 erwähnten Gründen ausschließlich mit ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektroden durchgeführt. 5-HT hatte in einer Konzentration von 0,5 mM nahezu keinen Effekt auf die genannten Parameter (siehe Tabelle 10), bewirkte jedoch in einer Konzentration von 5 mM eine deutliche Volumenzunahme sowie markante Änderungen von  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $E_m$ . In Tabelle 10 ist die Wirkung von 5-HT auf Zellvolumen,  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $E_m$  zusammengefasst.

**Tabelle 10: Wirkung von 5 mM 5-HT auf Zellvolumen,  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $E_m$  bei P-Neuronen**

5-HT (mM)	DVol <sub>rel.</sub> (%)	D $[\text{Cl}^-]_i$ (mM)	D $[\text{Na}^+]_i$ (mM)	D $[\text{K}^+]_i$ (mM)	DE <sub>m</sub> (mV)
<b>0,5</b>	-1,0 $\pm 1,4$ n=4	0,0 $\pm 0,8$ n=10	0,1 $\pm 0,0$ n=2	-0,5 $\pm 1,9$ n=3	1,3 $\pm 1,7$ n=21
<b>5</b>	40,5 $\pm 4,6$ n=5	15,8 $\pm 4,6$ n=12	92,4 $\pm 32,2$ n=8	-55,0 $\pm 16,1$ n=8	45,2 $\pm 8,7$ n=40

Abb. 13 zeigt typische Registrierbeispiele der Wirkung von 5 mM 5-HT auf Zellvolumen, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und  $E_m$  bei P-Neuronen. Die 5-HT-induzierte Membranpotentialänderung erfolgte häufig mehrphasisch, wobei sich einer anfänglichen, stark ausgeprägten Depolarisation (siehe Tabelle 10) bei 17 von 40 Zellen eine Nachhyperpolarisation anschloss ( $-9,7 \pm 8,0$  mV,  $n=17$ ). Die frühe Depolarisation erfolgte häufig biphasisch, indem sie von einer kleinen transienten Repolarisation unterbrochen wurde. Die Zellen depolarisierten maximal auf einen  $E_m$ -Wert ( $E_{m,max}$ ) von  $-6,6 \pm 6,7$  mV ( $n=40$ ) und hyperpolarisierten danach auf  $-58,8 \pm 7,7$  mV ( $n=17$ ). Aus Abb. 13 geht weiterhin hervor, dass die Repolarisation und die sich anschließende Hyperpolarisation mit dem  $K^+$ -Gleichgewichtspotential ( $E_K$ ) annähernd übereinstimmten.

Da die 5-HT-induzierten  $[Na^+]_i$ -Änderungen eine sehr große Streuung aufwiesen und 5 mM 5-HT bei P-Neuronen einen deutlichen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg induzierten (Dierkes, 1998), konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die ermittelten Ionenpotentiale durch eine  $Ca^{2+}$ -Interferenz des Sensors beeinflusst wurden. Um dies zu prüfen, wurden die 5-HT-induzierten Veränderungen in  $[Na^+]_i$  zusätzlich mit dem  $Na^+$ -Indikator SBFI bestimmt. Hierbei ergab sich ein  $[Na^+]_i$ -Anstieg von  $79,9 \pm 12,6$  mM ( $n=4$ ), welcher sich von den Ergebnissen mit ionensensitiven Mikroelektroden nicht signifikant unterschied. Weiterhin konnte in Kontroll-Experimenten mit ionensensitiven Mikroelektroden eine  $Ca^{2+}$ -Interferenz mit dem  $Na^+$ -Sensor ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration von 4 auf 89 mM ( $Na^+$  vollständig durch  $K^+$  ersetzt) induziert einen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der mit der Wirkung von 5 mM 5-HT vergleichbar ist (Dierkes, 1998). Die einminütige Applikation von 89 mM  $K^+$  verursachte einen Abfall im Ionenpotential der  $Na^+$ -sensitiven Mikroelektrode, der eine  $[Na^+]_i$ -Abnahme widerspiegelt (Abb. 14). Eine  $Ca^{2+}$ -Interferenz würde dagegen einen Anstieg des Ionenpotentials verursachen.

Da die verwendeten ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektroden eine gleichzeitige Bestimmung des Zellvolumens und einer intrazellulären Ionensorte nicht zuließen, wurde zur Volumen-Korrektur der gemessenen Konzentrationsänderungen eine aus 5 Volumenmessungen gemittelte Spur verwendet (Abb. 13). Nach Korrektur der Konzentrationswerte um die maximale Volumenänderung dieser Spur (39 %) ergaben

sich für  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  folgende Änderungen:  $26,6 \pm 6,5$  mM (n=12),  $-52,1 \pm 16,7$  mM (n=8) und  $133,4 \pm 44,0$  mM (n=8).

### **3.3.3 Ionenbilanz der 5-HT-Wirkung bei P-Neuronen**

Aus der Summe der Konzentrationsänderungen bei einminütiger Applikation von 5 mM 5-HT ergibt sich ohne Volumen-Korrektur eine Osmolyt-Nettoaufnahme von  $53,2 \pm 36,3$  mM bzw. von  $107,9 \pm 47,5$  mM nach der Volumen-Korrektur. In diesen Berechnungen sind alle in Tabelle 10 zusammengefassten  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$ - und  $[Na^+]_i$ -Änderungen berücksichtigt. Sie machen deutlich, dass nach 5-HT-Stimulation 54,7 mM mehr Kationen aufgenommen werden als Anionen (Abb. 15). Somit sollte die 5-HT-induzierte Osmolyt-Aufnahme bei P-Neuronen nicht elektroneutral verlaufen. Möglicherweise sind an der 5-HT-induzierten Antwort weitere Ionensorten beteiligt, die in der vorliegenden Arbeit aber nicht registriert wurden.

## **3.4 Glutamaterge Stimulation**

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Vertebraten (Headley & Grillner, 1990; Zorumski & Thio, 1992) und spielt bei der neuronalen Plastizität sowie bei der Entwicklung des Nervensystems und Neurodegenerationsvorgängen eine wichtige Rolle (Nakanishi et al., 1998). Glutamat-Rezeptoren werden wie 5-HT-Rezeptoren in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterteilt. NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren sind die drei Hauptgruppen von ionotropen Glutamat-Rezeptoren, die alle Glutamat-gesteuerte, unselektive Kationenkanäle darstellen (Bettler & Mülle, 1995; Mori & Mishina, 1995). Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR1-mGluR8) gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Nakanishi et al., 1998).

Neben seinen physiologischen Funktionen ist Glutamat auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt, die häufig dadurch eingeleitet werden, dass sich Glutamat extrazellulär über einen längeren Zeitraum in hohen Konzentrationen anreichert (Bettler

& Mülle, 1995). Die toxische Wirkung von Glutamat auf Nervenzellen beginnt meist mit einer Volumenzunahme und kann bis zum Zelltod führen (Exzitotoxizität; Choi, 1992; Sattler & Tymianski, 2000).

Im Zentralnervensystem des Blutegels wurden ionotrope Glutamat-Rezeptoren, welche pharmakologisch den AMPA- bzw. Kainat-Rezeptoren von Vertebraten ähneln, bei verschiedenen Nervenzellen aber auch bei Neuropil-Gliazellen nachgewiesen (Ballanyi et al., 1989; Brodfuehrer & Cohen, 1992; Dierkes et al., 1996). Bei Retzius-Neuronen wurde gezeigt, dass die Aktivierung dieser Glutamat-Rezeptoren über längere Zeit ebenfalls eine Volumenzunahme auslöst (Müller, 2000). In den folgenden Experimenten sollen die ionalen Änderungen, die einer Glutamat-induzierten Volumenänderung bei Blutegel-Neuronen zu Grunde liegen, charakterisiert werden.

#### **3.4.1 Wirkung verschiedener glutamaterger Agonisten auf Zellvolumen, $[Cl^-]_i$ und $E_m$ bei Retzius-Neuronen**

Die Wirkung verschiedener glutamaterger Agonisten auf Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen wurde zur genaueren pharmakologischen Charakterisierung der Glutamat-Rezeptoren mit Hilfe ionensensitiver Dreikanal-Mikroelektroden untersucht (Abb. 16). Neben dem physiologischen Agonisten L-Glutamat wurde auch Kainat ein Agonist von non-NMDA-Rezeptoren zur Aktivierung glutamaterger Rezeptoren des AMPA- und des Kainat-Typs eingesetzt. Zusätzlich wurden spezifischere Agonisten zur genaueren Unterscheidung zwischen diesen Rezeptoren verwendet. (S)-AMPA und (RS)-Willardiine dienten zur Aktivierung von AMPA-Rezeptoren, während SYM 2081 zur Aktivierung von Kainat-Rezeptoren benutzt wurde. Die Wirkung der Agonisten war sehr unterschiedlich. Während SYM 2081 keinen Effekt ausübte, verursachten Willardiine und Glutamat kleine Veränderungen im  $E_m$ , ließen jedoch Zellvolumen und  $[Cl^-]_i$  unbeeinflusst. AMPA verursachte eine Volumenzunahme, einen  $[Cl^-]_i$ -Anstieg und eine Depolarisation. Da Kainat die größte Wirkung sowohl auf das Zellvolumen als auch auf  $E_m$  und  $[Cl^-]_i$  ausübte, wurde in allen weiteren Experimenten dieser Agonist zur Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren verwendet.

In Tabelle 11 ist die Wirkung der glutamatergen Agonisten auf Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  zusammengefasst.

**Tabelle 11: Wirkung glutamaterger Agonisten auf Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$**

Agonist	Glutamat	AMPA	Willardiine	SYM 2081	Kainat
DVol <sub>rel.</sub> (%)	-2,5 ± 1,4	12,8 ± 7,5	0,9 ± 4,8	-0,8 ± 2,2	23,0 ± 14,6
D $[Cl^-]_i$ (mM)	1,7 ± 0,9	6,1 ± 3,0	2,6 ± 2,1	0,5 ± 0,5	9,6 ± 4,0
DE <sub>m</sub> (mV)	4,4 ± 2,6	10,3 ± 5,5	10,6 ± 7,5	2,0 ± 0,8	17,5 ± 5,7

Messungen mit Dreikanal-Mikroelektroden; Simultane Bestimmung von Vol<sub>rel.</sub>,  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$ . Mittelwerte ± Standardabweichung aus jeweils n=4 (Kainat: n=7). Glutamat 5 mM, alle anderen 100 mM.

### 3.4.2 Wirkung von Kainat auf Zellvolumen, $[Cl^-]_i$ , $[K^+]_i$ , $[Na^+]_i$ und $E_m$ bei Retzius-Neuronen

Die zweiminütige Applikation von 100  $\mu$ M Kainat verursachte bei Retzius-Neuronen eine Volumenzunahme um  $20,1 \pm 9,9$  % (n=33; Abb. 17 A), die mit einer Depolarisation um  $17,0 \pm 5,7$  mV (n=40) einherging. Die Depolarisation erreichte ein  $E_{m,max}$  von  $-28,9 \pm 6,5$  mV (n=40; Abb. 17 C). Die Zeitverläufe beider Änderungen waren unterschiedlich. Die maximale Volumenzunahme trat erst ca. 4 Minuten nach dem Rückwechsel in NSL auf, während  $E_{m,max}$  früher erreicht wurde. Auf Grund der deutlichen Zellschwellung erfolgte eine Verdünnung intrazellulärer Ionenkonzentrationen, so dass die gemessenen Konzentrationsänderungen nicht den genauen Ionenbewegungen über der Zellmembran entsprachen. Die simultane Messung des relativen Zellvolumens ermöglichte die Volumen-Korrektur der Messwerte, also die Berechnung der Konzentrationsänderungen unter Annahme eines konstanten Zellvolumens. Abb. 17 B zeigt typische Registrierbeispiele für Kainat-induzierte  $[Cl^-]_i$ -,  $[K^+]_i$ - und  $[Na^+]_i$ -Änderungen sowie die Änderungen, die sich aus der Volumen-Korrektur ergaben.

In Tabelle 12 sind Mittelwerte der durch Kainat induzierten Änderungen von  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  sowie die Mittelwerte der korrigierten Änderungen ( $\Delta[\text{Cl}^-]_{i,\text{korr}}$ ,  $\Delta[\text{K}^+]_{i,\text{korr}}$  und  $\Delta[\text{Na}^+]_{i,\text{korr}}$ ) zusammengefasst. Die Volumen-Korrektur ergab einen um ca. 50 % reduzierten  $[\text{K}^+]_i$ -Abfall, während die Anstiege von  $[\text{Cl}^-]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  um ca. 40 bzw. 15 % vergrößert waren.

**Tabelle 12: Kainat-induzierte Änderungen von  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  bei Retzius-Neuronen**

$D[\text{Cl}^-]_i$ (mM)	$D[\text{Cl}^-]_{i,\text{korr}}$ (mM)	$D[\text{K}^+]_i$ (mM)	$D[\text{K}^+]_{i,\text{korr}}$ (mM)	$D[\text{Na}^+]_i$ (mM)	$D[\text{Na}^+]_{i,\text{korr}}$ (mM)
9,6	14,2	-15,7	-8,3	15,4	17,4
$\pm 4,0$	$\pm 7,1$	$\pm 4,4$	$\pm 5,4$	$\pm 7,7$	$\pm 9,2$
n=7	n=7	n=7	n=7	n=4	n=4

### 3.4.2.1 Ionenbilanz der Kainat-Wirkung bei Retzius-Neuronen

Die Summe der Konzentrationsänderungen nach der Volumen-Korrektur liefert ein Maß für die Kainat-induzierte Nettobewegung von Osmolyten über der Zellmembran ( $23,4 \pm 12,8$  mM). Im Gegensatz dazu liefert die Summe der Konzentrationsänderungen vor der Volumen-Korrektur ein Maß für die Kainat-induzierte Änderung der intrazellulären Osmolarität ( $9,2 \pm 9,7$  mM). Für diese Berechnung wurden alle in Tabelle 12 zusammengefassten Messungen von  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  berücksichtigt. Abb. 18 fasst die Kainat-induzierten Konzentrationsänderungen von  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  zusammen. Die nicht um das Volumen korrigierte Bilanz täuscht eine Nettoaufnahme von Osmolyten vor, die sich nur aus Anionen zusammensetzt. Die Volumen-Korrektur verdeutlicht, dass tatsächlich ein annähernd gleichgroßer Anteil an Kationen aufgenommen wird, wobei der  $\text{K}^+$ -Ausstrom von einem  $\text{Na}^+$ -Einstrom kompensiert wird. Hieraus ergibt sich eine annähernd elektroneutrale Osmolyt-Aufnahme. Im Gegensatz zu den 5-HT-induzierten ionalen Änderungen bei P-Neuronen (3.3.3) wurden bei den Kainat-induzierten Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen weitgehend alle Ionensorten, die an der Volumenänderung beteiligt waren, erfasst.

### 3.4.2.2 Wirkung $\text{Cl}^-$ , $\text{Na}^+$ - oder $\text{K}^+$ -freier Lösung auf die Kainat-induzierte Volumenzunahme

Die ionalen Mechanismen der Kainat-induzierten Volumenzunahme wurden zur genaueren Charakterisierung durch Gabe von Kainat in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  untersucht. Das Präparat wurde während der zweiminütigen Kainat-Gabe und jeweils 5 Minuten vor- und nachher mit einer  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -freien Lösung umspült.  $\text{Cl}^-$ -freie Lösung führte in den meisten Experimenten zu einer reversiblen Volumenabnahme, die auch während der zweiminütigen Kainat-Applikation nicht unterbrochen wurde (Abb. 19 A). Auch  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -freie Lösung löste oftmals eine Volumenabnahme aus (Abb. 20 A, 21 A). Bei der Applikation von Kainat in  $\text{Cl}^-$ - oder  $\text{Na}^+$ -freier Lösung blieb eine Volumenzunahme aus ( $n=10$  bzw. 14). Dagegen trat in  $\text{K}^+$ -freier Lösung nach wie vor eine Volumenzunahme auf ( $13,7 \pm 9,2$  %;  $n=10$ ), deren Amplitude im Bereich der Kontrollwerte lag (Abb. 21 A). Abb. 22 zeigt eine Zusammenfassung des Effekts von Kainat auf das Zellvolumen in NSL sowie in  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -freier Lösung. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl  $\text{Na}^+$  als auch  $\text{Cl}^-$  an der Kainat-induzierten Volumenzunahme beteiligt sind.

### 3.4.2.3 Wirkung $\text{Cl}^-$ , $\text{Na}^+$ - oder $\text{K}^+$ -freier Lösung auf die Kainat-induzierten Änderungen in $[\text{Cl}^-]_i$ , $[\text{Na}^+]_i$ , $[\text{K}^+]_i$ und $E_m$

Die  $\text{Cl}^-$ -freie Lösung bewirkte einen  $[\text{Cl}^-]_i$ -Abfall, der durch Kainat-Applikation nicht beeinflusst wurde. Die  $[\text{K}^+]_i$ -Abnahme war im Vergleich zu den Kontrollwerten (Tabelle 12) leicht vergrößert ( $-19,8 \pm 7,0$  mM;  $n=3$ ), während der  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg verringert war (Abb 19 B). Der Wechsel in  $\text{Cl}^-$ -freie Lösung verursachte in den meisten Experimenten eine transiente Depolarisation um 5-17 mV, beim Rückwechsel in NSL erfolgte eine Hyperpolarisation vergleichbarer Amplitude. Durch Kainat wurde in  $\text{Cl}^-$ -freier Lösung eine Depolarisation um  $19,7 \pm 7,0$  mV ( $n=13$ ) ausgelöst, die im Mittel ein  $E_{m,\max}$ -Wert von  $-29,3 \pm 10,2$  mV ( $n=13$ ) erreichte. Diese Kainat-induzierten  $E_m$ -Verschiebungen in  $\text{Cl}^-$ -freier Lösung unterschieden sich von den Kontrollen durch eine deutlich schnellere Kinetik (Abb. 19 C).

Beim Wechsel in Na<sup>+</sup>-freie Lösung sanken [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ab, dagegen wurde [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> nicht beeinflusst. Die Applikation von Kainat in Na<sup>+</sup>-freier Lösung verursachte keine Änderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen (Abb. 20 B). Die Kainat-induzierte Depolarisation war unterdrückt (Abb. 20 C).

K<sup>+</sup>-freie Lösung verursachte eine [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>- und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Abnahme sowie einen [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg. Durch die Kainat-Applikation wurde auch in K<sup>+</sup>-freier Lösung ein [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg ausgelöst, dessen Kinetik und Amplitude mit den Kontrollen in NSL übereinstimmten. Zusätzlich wurden sowohl der [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abfall als auch der [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg durch die Kainat-Applikation drastisch verstärkt (Abb. 21 B). Die Kainat-induzierte Depolarisation blieb in K<sup>+</sup>-freier Lösung erhalten. Die Repolarisation erfolgte jedoch stark verzögert und war erst nach Wechsel in NSL vollständig (Abb. 21 C).

### **3.4.3 Wirkung von Kainat auf Zellvolumen, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> sowie auf E<sub>m</sub> bei P-Neuronen**

Die Registrierbeispiele in Abb. 23 zeigen die Wirkung von Kainat auf das Zellvolumen, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und E<sub>m</sub> bei P-Neuronen. P-Neuronen reagierten auf die Applikation von 100 μM Kainat mit einer Depolarisation um  $5,7 \pm 3,4$  mV (n=10), dagegen blieb das Zellvolumen unverändert. [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> wurden durch die Kainat-Applikation ebenfalls kaum beeinflusst.

## **3.5 Einfluss des extrazellulären K<sup>+</sup> auf Zellvolumen, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und E<sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen**

Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel Spreading Depression, wurden in Hippocampusschnitten von Ratten Anstiege der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration ([K<sup>+</sup>]<sub>a</sub>) bis auf 50 mM beobachtet (Müller & Somjen, 2000). Im Blutegel-Nervensystem treten bei erhöhter neuronaler Aktivität Anstiege von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> auf bis zu 10 mM auf (Baylor & Nicholls, 1969). Eine Erhöhung von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> verursacht in der

Regel eine Zunahme des Zellvolumens, wie entsprechende Experimente an kultivierten Astrocyten, Schnecken-Neuronen und Neuropil Gliazellen des Blutegels zeigten (Walz, 1992; Ayrapetyan & Suleymanian, 1979; Ballanyi et al., 1990).

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss einer Veränderung von  $[K^+]_a$  auf das Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  sowie auf das  $E_m$  von Retzius-Neuronen untersucht. Registrierbeispiele dieser Experimente mit ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden sind in den Abbildungen 24, 25 und 26 wiedergegeben. Die gemessenen Änderungen von  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  sind in den jeweiligen Teilabbildungen unter B wiedergegeben, während die simultan gemessenen Änderungen im Zellvolumen und  $E_m$  in den jeweiligen Teilabbildungen unter A und C dargestellt sind.

Der Entzug des extrazellulären  $K^+$  bewirkte in den meisten Fällen eine schwache Volumenabnahme. Die Erhöhung des extrazellulären  $K^+$  auf 10 mM beeinflusste das Zellvolumen kaum, während eine deutlichere Erhöhung des extrazellulären  $K^+$  auf 20 mM und mehr starke Volumenzunahmen verursachten (Abb. 24 A, 25 A und 26 A).

Die  $K^+$ -freie Lösung bewirkte einen geringen Abfall in  $[Cl^-]_i$  und  $[K^+]_i$  sowie einen Anstieg in  $[Na^+]_i$ . Die Erhöhung der  $[K^+]_a$  auf 10 mM bewirkte einen leichten  $[Cl^-]_i$ -Anstieg, während  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  unbeeinflusst waren. Nach Volumen-Korrektur ergab sich für  $[K^+]_i$  ein leichter Anstieg, was auf eine  $K^+$ -Aufnahme hindeutete. Die weitere Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 20 und 30 mM löste deutliche  $[Cl^-]_i$ -Anstiege aus. Auch hier blieben  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  annähernd konstant, jedoch zeigte sich nach der Volumen-Korrektur ein deutlicher  $[K^+]_i$ -Anstieg, während  $[Na^+]_i$  wiederum kaum beeinflusst war (Abb. 24 B, 25 B und 26 B).

Der Entzug des extrazellulären  $K^+$  bewirkte eine deutliche Hyperpolarisation, während die Erhöhung des extrazellulären  $K^+$  von 4 auf 10 mM eine schwache Depolarisation auslöste. Bei höheren  $[K^+]_a$  von 20 und 30 mM war die Depolarisation erheblich vergrößert (Abb. 24 C, 25 C und 26 C).

Die Volumenzunahme sowie die Änderungen in  $[Cl^-]_i$  und  $[K^+]_i$  traten im Vergleich zur Depolarisation verzögert auf, wiesen eine langsamere Kinetik auf und erreichten ihr Maximum erst nach Ende der 5-minütigen  $[K^+]_a$ -Erhöhung. Die Mittelwerte der

Änderungen von Zellvolumen und  $E_m$  sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Daten der Tabelle 13 sind in Abb. 27 graphisch wiedergegeben.

**Tabelle 13: Wirkung veränderter  $[K^+]_a$  auf Zellvolumen und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen**

$[K^+]_a$	$K^+$ -frei	10 mM	12 mM	15 mM	18 mM	20 mM	30 mM	40 mM
<b>DVol<sub>rel.</sub></b> (%)	-1,1	3,6	8,6	10,4	14,0	14,6	29,6	37,0
n	$\pm 5,1$	$\pm 3,2$	$\pm 2,6$	$\pm 1,5$	$\pm 4,4$	$\pm 6,6$	$\pm 7,8$	$\pm 6,3$
n	13	12	3	3	4	16	34	4
<b><math>E_{m,max.}</math></b> (mV)	-57,4	-38,8	-40,9	-38,3	-34,6	-31,9	-25,6	-19,8
n	$\pm 10,1$	$\pm 6,7$	$\pm 2,0$	$\pm 1,0$	$\pm 4,3$	$\pm 4,8$	$\pm 5,3$	$\pm 2,6$
n	25	18	4	4	5	18	46	4
<b><math>DE_m</math></b> (mV)	-12,0	5,7	9,2	9,5	11,2	16,2	22,6	20,1
n	$\pm 6,3$	$\pm 4,4$	$\pm 5,0$	$\pm 6,0$	$\pm 6,7$	$\pm 6,9$	$\pm 7,5$	$\pm 1,8$
n	25	18	4	4	5	18	46	4

Die Änderungen von  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  oder  $[Na^+]_i$  sowie die bezüglich der Volumenänderung korrigierten Werte sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Eine graphische Darstellung der Daten findet sich in Abb. 28. Aus den Daten ergibt sich, dass die Erhöhung von  $[K^+]_a$  zur Nettoaufnahme von KCl führt.

**Tabelle 14: Wirkung veränderter  $[K^+]_a$  auf  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$**

$[K^+]_a$	$D[Cl^-]_i$ (mM)	$D[Cl^-]_{i,korr}$ (mM)	$D[K^+]_i$ (mM)	$D[K^+]_{i,korr}$ (mM)	$D[Na^+]_i$ (mM)	$D[Na^+]_{i,korr}$ (mM)
<b><math>K^+</math> frei</b>	-2,8	-3,1	-9,6	-9,7	9,5	9,7
n	$\pm 1,8$	$\pm 2,0$	$\pm 5,0$	$\pm 3,7$	$\pm 7,1$	$\pm 6,5$
n	4	4	3	3	6	6
<b>10 mM</b>	2,6	3,0	0,4	2,5	-1,2	-0,6
n	$\pm 1,0$	$\pm 1,2$	$\pm 1,9$	$\pm 2,8$	$\pm 0,7$	$\pm 0,5$
n	4	4	4	4	4	4
<b>20 mM</b>	7,9	10,7	1,0	11,7	-0,8	0,2
n	$\pm 1,2$	$\pm 3,0$	$\pm 3,3$	$\pm 5,1$	$\pm 1,9$	$\pm 1,8$
n	4	4	5	5	6	6
<b>30 mM</b>	15,9	24,2	0,7	26,9	-0,6	1,5
n	$\pm 4,3$	$\pm 6,6$	$\pm 5,2$	$\pm 7,1$	$\pm 1,4$	$\pm 2,1$
n	4	4	4	4	4	4

### 3.5.1 Ionenbilanz der $K^+$ -induzierten Änderungen bei Retzius-Neuronen

Die Summe der  $K^+$ -induzierten Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen ist in Abb. 29 wiedergegeben, in der zum Vergleich auch eine Bilanzierung der unkorrigierten Konzentrationsänderungen dargestellt ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung von  $[K^+]_a$  zur Nettoaufnahme von Osmolyten führt, die bei konstantem Zellvolumen zu einem Anstieg der cytosolischen Osmolarität um  $4,8 \pm 3,1$  mM (10 mM  $K^+$ ),  $22,6 \pm 6,1$  mM (20 mM  $K^+$ ) bzw.  $52,6 \pm 9,9$  mM (30 mM  $K^+$ ) führen würde. Wegen der Zunahme des Zellvolumens sind die tatsächlichen Anstiege der Osmolarität jedoch geringer:  $1,8 \pm 2,2$  mM (10 mM  $K^+$ ),  $8,1 \pm 4,0$  mM (20 mM  $K^+$ ) sowie  $16,0 \pm 6,9$  mM (30 mM  $K^+$ ). Die nicht korrigierten Werte täuschen bei allen Lösungen eine Osmolytaufnahme vor, die nur aus Anionen besteht. Durch die Volumen-Korrektur wird deutlich, dass die Zellen vielmehr zu gleichen Teilen Anionen und Kationen elektroneutral aufnehmen, und zwar  $Cl^-$  und  $K^+$  (siehe Tabelle 14 und Abb. 28). In  $K^+$ -freier Lösung nimmt die cytosolische Osmolarität um  $3,0 \pm 8,9$  mM ab. Auf Grund der geringen Volumenänderung entspricht dies auch der Osmolyt-Nettoabgabe ( $-3,1 \pm 7,8$  mM). Hierbei wurde der deutliche  $[Na^+]_i$ -Anstieg von einem gleich großen  $[K^+]_i$ -Abfall kompensiert, so dass die Osmolyt-Abgabe nur aus Anionen besteht (siehe Tabelle 14 und Abb. 28, 29). Sowohl die  $[Na^+]_i$ - als auch die  $[K^+]_i$ -Änderungen sind auf die Hemmung der  $Na^+/K^+$ -Pumpe in  $K^+$ -freier Lösung zurückzuführen.

### 3.5.2 Wirkung von $Cl^-$ -freier Lösung auf die $K^+$ -induzierte Volumenzunahme und Depolarisation

Um die Abhängigkeit der  $K^+$ -induzierten Volumenzunahmen vom extrazellulären  $Cl^-$  zu überprüfen, wurde die Wirkung einer 30 mM  $K^+$ -haltigen Lösung unter  $Cl^-$ -freien Bedingungen untersucht.  $Cl^-$ -freie Lösung verursachte zunächst eine transiente Depolarisation sowie eine deutliche Volumenabnahme (10-20 %; Abb. 30). Die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 30 mM führte unter  $Cl^-$ -freien Bedingungen zu einer deutlichen Depolarisation, die im Vergleich zur Kontrolle ( $E_{m,max}$ :  $-32,5 \pm 13,0$  mV; n= 4) ein positiveres  $E_m$  erreichte ( $E_{m,max}$ :  $-24,2 \pm 7,1$  mV; n=4). Die  $K^+$ -induzierte

Volumenzunahme war unter Cl<sup>-</sup>-freien Bedingungen unterdrückt. Die Membranrepolarisation setzte sofort nach Absenken von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> auf 4 mM ein. Die Kinetik der Depolarisation und der Repolarisation war deutlich schneller als in den Kontrollen. Durch den Rückwechsel in NSL wurde zunächst eine transiente Hyperpolarisation der Membran hervorgerufen, doch sowohl E<sub>m</sub> als auch das Zellvolumen nahmen schnell ihre ursprünglichen Werte an. Eine erneute Erhöhung von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> zeigte, dass die Veränderungen unter Cl<sup>-</sup>-freien Bedingungen vollständig reversibel waren.

### 3.5.3 Wirkung von Ni<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung auf die K<sup>+</sup>-induzierten Änderungen von Zellvolumen, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und E<sub>m</sub>

Hochstrate et al. (1995) zeigten bei Retzius-Neuronen des Blutegels, dass eine Erhöhung von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> auf 10 mM keinen Einfluss auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ausübt, während bei [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> ab 20 mM ein deutlicher [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg auftritt, der mit zunehmender [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> immer größer wird. Dieser [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg beruht auf einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Da Ca<sup>2+</sup> eine entscheidende Rolle bei der Volumenregulation zuzuschreiben ist, vor allem durch die Erhöhung der K<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit bei Mechanismen des RVD (McCarty & O'Neil, 1992), wurde untersucht, ob der K<sup>+</sup>-induzierte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg an der K<sup>+</sup>-induzierten Volumenzunahme von Retzius-Neuronen beteiligt ist.

Die mikrofluorimetrischen Messungen ergaben für [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> = 30 mM einen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg um 172 ± 89 nM auf 243 ± 98 nM (n=8). Der K<sup>+</sup>-induzierte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg war bei Blockade der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch 2 mM Ni<sup>2+</sup> vollständig unterdrückt (Abb. 31 A). Die Nachkontrolle wies im Vergleich zur Vorkontrolle einen vergrößerten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg um 232 ± 89 nM auf 297 ± 113 nM (n=7) auf. Die K<sup>+</sup>-induzierte Volumenzunahme betrug in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> lediglich 47 ± 30 % (n=5) der Vorkontrollen und war somit signifikant verringert. Die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation erreichte in den Vorkontrollen ein E<sub>m,max</sub> von -24,7 ± 2,5 mV und in Gegenwart von Ni<sup>2+</sup> einen Wert von -31,8 ± 2,7 mV (n=12). Diese beiden Werte unterschieden sich hochsignifikant voneinander (Abb.31 B und 35).

Um die Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der  $\text{K}^+$ -induzierten Volumenzunahme genauer zu untersuchen, wurden Experimente in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung durchgeführt (Abb. 32). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung verursachte eine leichte Volumenabnahme, die bei Erhöhung von  $[\text{K}^+]_a$  auf 30 mM in eine Volumenzunahme überging. Diese Volumenzunahme war jedoch im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Die Membran depolarisierte deutlich schneller und stärker. Die Membranreparisation und die Abnahme der Zellschwellung traten nach Reduzierung von  $[\text{K}^+]_a$  auf 4 mM noch in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung ein. Einige Zellen reagierten auf den Entzug des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  mit  $E_m$ -Oszillationen, die durch Erhöhung von  $[\text{K}^+]_a$  reversibel unterdrückt waren (Abb. 33).

### **3.5.4 Wirkung von Rezeptorblockern auf die $\text{K}^+$ -induzierten Änderungen von Zellvolumen und $E_m$**

Um die mögliche Beteiligung einer Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren an der  $\text{K}^+$ -induzierten Volumenänderung zu untersuchen, wurden die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren und die Glutamat-Rezeptoren der Retzius-Neuronen durch die spezifischen Blocker d-Tubocurarin bzw. DNQX gehemmt (Abb. 34). In Gegenwart dieser Blocker war die  $\text{K}^+$ -induzierte Volumenzunahme hochsignifikant auf  $54 \pm 12\%$  der Kontrollexperimente reduziert ( $n=4$ ; Abb. 35). Unter diesen Bedingungen war  $E_{m,\max}$  mit  $-33,3 \pm 3,6$  mV hochsignifikant negativer als in den Kontrollexperimenten ( $-30,2 \pm 3,1$  mV;  $n=5$ ). Die Wirkungen von d-Tubocurarin und DNQX waren vollständig reversibel.

## **4. Diskussion**

Die in Kapitel 3 beschriebenen Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen sollen im Folgenden mit den 5-HT-, Kainat- und  $K^+$ -induzierten Volumenänderungen bei Blutegel-Neuronen in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei sollen mit Hilfe der Literatur den Volumenänderungen zu Grunde liegende ionale Mechanismen aufgedeckt werden.

### **4.1 Ruhewerte**

#### **4.1.1 Membranruhepotential bei Retzius- und P-Neuronen**

Das bei Retzius-Neuronen und P-Neuronen gemessene mittlere  $E_{m-Ruhe}$  stimmt gut mit Werten aus früheren Arbeiten überein (Deitmer & Schlue, 1981; Frey & Schlue, 1993; Lucht, 1997; Schlue, 1991).

#### **4.1.2 Intrazelluläre Ionenkonzentrationen bei Retzius- und P-Neuronen**

Der bei Retzius-Neuronen gemessene Ruhewert für  $[Cl^-]_i$  von 10,1 mM ist mit Werten aus früheren Arbeiten in Einklang (Munsch & Schlue, 1993; Müller, 2000). Die niedrige  $[Cl^-]_i$  der Retzius-Neuronen spricht für eine aktive Verteilung von  $Cl^-$ , wie sie bereits von Munsch & Schlue (1993) beschrieben wurde. Bei einer passiven  $Cl^-$ -Verteilung wäre bei  $E_m = -47,5$  mV und  $[Cl^-]_a = 95$  mM eine höhere  $[Cl^-]_i$  von 14,4 mM zu erwarten. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Ruhewert für  $[Na^+]_i$  steht ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den von Günzel & Schlue (1996), Kilb & Schlue (1999) sowie Müller (2000) beschriebenen Werten. Die gemessenen Ruhewerte für  $[K^+]_i$  sind dagegen deutlich niedriger als die von Deitmer & Schlue (1981) ermittelte  $[K^+]_i$  von 135 mM, stimmen jedoch gut mit den Ergebnissen von Müller (2000) und Neumann (2000)

überein. Der höhere  $[K^+]_i$ -Wert von Deitmer & Schlue könnte auf der höheren Osmolarität der verwendeten NSL beruhen. Die mit Hilfe des neutralen Carriers Valinomycin bestimmte  $[K^+]_i$  lag unter der mittels des klassischen Ionenaustauschers Corning 477317 gemessenen  $[K^+]_i$ , was an der Selektivität des Corningssensors für quaternäre Ammoniumionen liegen könnte, da intrazellulär vorkommendes Cholin möglicherweise das Ionensignal beeinflusst. Der in mikrofluorimetrischen Messungen mit Fura-2 bestimmte Ruhewert für  $[Ca^{2+}]_i$  lag im Bereich der von Hochstrate & Schlue (1994) sowie Hochstrate et al. (1995) angegebenen Werte.

Der bei P-Neuronen gemessene Ruhewert für  $[Na^+]_i$  stimmt mit früher ermittelten Werten gut überein (Lucht, 1997; Hintz et al., 1999). Dagegen liegt der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Ruhewert für  $[K^+]_i$  deutlich unter dem von Schlue et al. (1985) bestimmten Wert von 98,7 mM. Zwei mögliche Ursachen sind denkbar: Zum Einen wurden in der Arbeit von Schlue et al. (1985) Ergebnisse aus Messungen mit dem klassischen Ionenaustauscher Corning 477317 und dem neutralen Carrier Valinomycin zusammengefasst, zum Anderen erfolgten die Messungen in der bereits erwähnten NSL mit höherer Osmolarität. Da in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung von  $[K^+]_i$  bei P-Neuronen ausschließlich Valinomycin herangezogen wurde, könnten beide Faktoren zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen. Der gemessene Ruhewert für  $[Cl^-]_i$  steht in guter Übereinstimmung mit den von Munsch et al. (1995) angegebenen Messwerten. Die von Munsch et al. beschriebene passive Verteilung von  $Cl^-$  bei P-Neuronen konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden, da sich, unter Berücksichtigung des bestimmten  $E_{m-Ruhe}$  von  $-53,2$  mV und der in der NSL vorhandenen  $[Cl^-]$  von 95 mM nach Nernst eine  $[Cl^-]_i$  von 11,5 mM berechnen lässt, die in gutem Einklang mit dem gemessenen Wert von 12,6 mM steht.

#### 4.1.3 TMA<sup>+</sup>-Aufnahme der Neuronen

Die für Retzius- und P-Neuronen ermittelten TMA<sup>+</sup>-Aufnahmeraten stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (Klees, 2002; Neumann, 2000), jedoch beschrieb Coulon (2001) für Retzius-Neuronen eine höhere Aufnahmerate (0,60 mM/min). Dies ist möglicherweise auf die in dieser Arbeit angewendete Kombination

der Technik ionensensitiver Mikroelektroden mit der *voltage-clamp*-Technik zurückzuführen, die den Einstich einer zusätzlichen Elektrode zur Strominjektion erfordert.

Beim Blutegel sind bisher keine genauen Kenntnisse über die Aufnahmemechanismen von quaternären Ammoniumionen beschrieben. Bei Retzius-Neuronen sprechen frühere Ergebnisse für eine spannungsunabhängige TMA<sup>+</sup>-Aufnahme (Dierkes et al., 2002b). Auch der Na<sup>+</sup>-abhängige Kationen-Transporter (OCTN2; Ohashi et al., 1999) scheint zumindest bei Retzius-Neuronen für die TMA<sup>+</sup>-Aufnahme nicht in Frage zu kommen, da parallel zur TMA<sup>+</sup>-Aufnahme keine Na<sup>+</sup>-Aufnahme erfolgt (siehe Abb. 9). Weiterhin wurde bereits früher gezeigt, dass Retzius-Neuronen auch in Na<sup>+</sup>-freier Lösung in der Lage sind TMA<sup>+</sup> aus der Badlösung aufzunehmen (Neumann, 2000). Denkbar ist eine Beteiligung anderer organischer Kationen-Transporter (OCT), die eine große Familie unterschiedlicher Transportproteine darstellen. Organische Kationen-Transporter zeichnen sich durch eine geringe Selektivität aus und transportieren unter anderem quaternäre Ammoniumionen, wie TMA<sup>+</sup>, Tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>) oder Cholin. Weiterhin kann der Substrattransport bei einigen Subfamilien eine Abhängigkeit von E<sub>m</sub>, Na<sup>+</sup> oder pH aufweisen. In der Niere verschiedener Säugetiere wurde ein spannungsabhängiger Transport von TEA<sup>+</sup> und Cholin beschrieben (Koepsell et al., 1999).

Eine Beteiligung des OCTN1 an der TMA<sup>+</sup>-Aufnahme bei Blutegel-Neuronen ist denkbar, da dieser Transportertyp weder Na<sup>+</sup>- noch spannungsabhängig, sondern vielmehr pH-abhängig ist. (Yabuuchi et al., 1999). Der in der Literatur beschriebene intrazelluläre pH-Wert bei Retzius-Neuronen (um 7,3; Deitmer & Schlue, 1988; Günzel et al., 1997; Kilb & Schlue, 2001) unterscheidet sich deutlich von dem bei Neuropil-Gliazellen des Blutegels beschriebenen pH-Wert (6,87; Deitmer & Schlue, 1987), für die eine sehr viel höhere TMA<sup>+</sup>-Aufnahmerate (~11,2 mM/min) beschrieben wurde (Ballanyi & Schlue, 1989). Die unterschiedlichen TMA<sup>+</sup>-Aufnahmeraten bei Retzius- und P-Neuronen können aber auch andere Gründe haben, wie zum Beispiel Unterschiede in der Transporterdichte oder im Oberflächen / Volumen-Verhältnis.

#### 4.1.3.1 TMA<sup>+</sup>-induzierte E<sub>m</sub>-Änderungen bei Retzius- und P-Neuronen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Applikation von TMA<sup>+</sup> bei Retzius-Neuronen zu einer raschen, transienten Depolarisation und zu einer anhaltenden E<sub>m</sub>-Verstellung führt. Im Unterschied zu Retzius-Neuronen wurde bei P-Neuronen kaum eine Wirkung von TMA<sup>+</sup> auf E<sub>m</sub> festgestellt (Abb. 10). In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass TMA<sup>+</sup> sowohl muskarinische als auch nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren aktivieren kann (Shi et al., 1999; Papke et al., 1996) und als unspezifischer cholinerg Agonist zu bezeichnen ist. Diese agonistische Wirkung von TMA<sup>+</sup> wurde auch für die Acetylcholin-Rezeptoren der Neuropil-Gliazellen nachgewiesen (Ballanyi & Schlue, 1989; Hochstrate & Schlue, 1995). Bei Retzius-Neuronen sind zwei unterschiedliche Typen von Acetylcholin-Rezeptoren vorhanden, die pharmakologisch dem nikotinischen Typ von Vertebraten ähneln (Szczupak et al., 1993). Acetylcholin aktiviert zum Einen einen unspezifischen Kationenkanal, der durch seine schnelle Desensitivierung charakterisiert ist, und für die rasche transiente Depolarisation verantwortlich ist. Zum Anderen aktiviert Acetylcholin bei Retzius-Neuronen einen Cl<sup>-</sup>-Kanal, der eine sehr langsame Desensitivierung aufweist. Die Aktivierung dieses Kanals erklärt die anhaltende E<sub>m</sub>-Verstellung recht gut. Dass sowohl eine Depolarisation als auch eine Hyperpolarisation zu beobachten war, könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Cl<sup>-</sup>-Gleichgewichtspotential bei den einzelnen Zellen mal positiver oder mal negativer war als das E<sub>m-Ruhe</sub>. Die geringe Wirkung von Acetylcholin auf das E<sub>m</sub> von P-Neuronen deutet darauf hin, dass durch Acetylcholin aktivierte Kationenkanäle bei P-Neuronen fehlen.

## 4.2 5-HT-Rezeptoren

Eine direkte Wirkung der Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren auf das Zellvolumen wurde bisher nur bei Neuropil-Gliazellen beschrieben (Ballanyi et al., 1990). An kultivierten Astrocyten des cerebralen Cortex neugeborener Ratten und an kultivierten Gliomazellen (MG-251) wurde jedoch gezeigt, dass 5-HT eine Rolle bei der Volumenregulation spielt (Hansson & Ronnback, 1992; Behnam-Motlagh et al. 1999).

#### 4.2.1 5-HT-Effekt bei Retzius-Neuronen

Bei Retzius-Neuronen wurde eine Hyperpolarisation als Antwort auf die Applikation von 5-HT beschrieben (Walker & Smith, 1973; Lucht, 1997). Munsch (1991) zeigte jedoch, dass die 5-HT-induzierte Membranantwort bei Retzius-Neuronen vom  $E_{m-Ruhe}$  der Zellen abhängt. Er beschrieb für  $E_{m-Ruhe}$  unterhalb von -60 mV eine depolarisierende Membranantwort. Da das  $Cl^-$ -Gleichgewichtspotential ( $E_{Cl}$ ) in diesen Untersuchungen bei -60 mV lag, postulierte er eine Beteiligung von  $Cl^-$  an der 5-HT-Antwort, ähnlich wie von Walker & Smith (1973) beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen diese Beobachtungen zu bestätigen: Mit  $[Cl^-]_i = 10,1$  mM und  $[Cl^-]_a = 95$  mM ergibt sich  $E_{Cl}$  zu -56,5 mV und entsprechend depolarisierten in Gegenwart von 5-HT 60 % der Neuronen bei denen  $E_m$  negativer als  $E_{Cl}$  war. Umgekehrt induzierte 5-HT bei 71 % der Zellen, bei denen  $E_m$  positiver als  $E_{Cl}$  war, eine Hyperpolarisation (Abb 12). Auch Lessmann & Dietzel (1991) fanden bei Retzius-Neuronen nur sehr geringe 5-HT-induzierte  $K^+$ - bzw.  $Na^+$ -Ströme im Gegensatz zu einem deutlichen, nicht inaktivierenden  $Cl^-$ -Strom. Die von Acosta-Urquidi et al. (1989) bei Retzius-Neuronen beschriebenen durch 5-HT modulierten spannungsabhängigen  $K^+$ -Ströme  $I_A$  (transient) und  $I_K$  (verzögert) können für die beschriebenen  $E_m$ -Änderungen nicht verantwortlich sein, da diese Ströme erst bei -35 bzw. -20 mV aktivieren.

Die 5-HT-induzierten Änderungen von  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  (Abb. 12) sind zu gering, um die intrazelluläre Osmolarität und das Volumen der Retzius-Neuronen zu beeinflussen.

#### 4.2.2 5-HT Effekt bei P-Neuronen

Bei P-Neuronen induzierte 5-HT im Vergleich zu Retzius-Neuronen eine sehr viel stärkere  $E_m$ -Antwort, die mit großen Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen verbunden war (Abb. 13). Sanchez-Armass et al. (1991) zeigten, dass die Stimulation des 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptors zur Aktivierung eines  $Cl^-$ -Kanals führt, während die Stimulation des 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptors die Aktivierung eines unselektiven Kationenkanals auslöst. Ver-

gleichbare Wirkungen einer Aktivierung von 5-HT<sub>1</sub>- bzw. 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden auch bei anderen Präparaten beschrieben (Garner et al., 1993; Lee et al., 1999).

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Na<sup>+</sup>-Einstrom und die dadurch ausgelöste Depolarisation könnten auf die Öffnung des durch den 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor aktivierten, unselektiven Kationenkanals zurückzuführen sein. Die häufig beobachtete anschließende Hyperpolarisation beruht wahrscheinlich auf einem K<sup>+</sup>-Ausstrom. Die mögliche Beteiligung einer erhöhten Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit widerspricht den von Lessmann & Dietzel (1995) beschriebenen Befunden eines 5-HT-aktivierten schnell desensitivierenden Cl<sup>-</sup>-Stroms (Desensitivierung nach ca. 100 ms), der bei den anhaltenden E<sub>m</sub>-Änderungen keine Rolle spielt. Dieser transiente 5-HT-aktivierte Cl<sup>-</sup>-Strom erklärt jedoch recht gut die beobachtete zweiphasige Depolarisation (Abb. 14). Der Vergleich des gemessenen E<sub>m</sub> mit dem berechneten E<sub>K</sub> (Abb. 13) spricht dafür, dass sowohl die Repolarisation als auch die anschließende Hyperpolarisation primär auf eine erhöhte K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit zurückzuführen sind. Die negative Abweichung des E<sub>m</sub> vom E<sub>K</sub> ist möglicherweise auf den Beitrag der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe zur Repolarisation zurückzuführen. Frühere Befunde sprechen für die Existenz Na<sup>+</sup>-aktivierter K<sup>+</sup>-Kanäle bei P-Neuronen (siehe Schlue & Deitmer, 1984; Schlue, 1991). Diese Kanäle werden durch hohe [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> aktiviert, zum Beispiel in den Dorsalwurzel-Ganglien der Ratte durch eine [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> zwischen 20 und 30 mM (Bischoff et al., 1998). Der 5-HT-induzierte [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg würde zu einer starken Aktivierung solcher Kanäle führen.

#### 4.2.3 5-HT-induzierte Volumenänderung bei P-Neuronen

Durch die Applikation von 0,5 mM 5-HT wurden bei P-Neuronen keine signifikanten Änderungen des Zellvolumens und der intrazellulären Ionenkonzentrationen hervorgerufen. Die Erhöhung der 5-HT-Konzentration auf 5 mM induzierte dagegen deutliche Änderungen des Zellvolumens und drastische Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen (Abb. 13). Die Ergebnisse zeigen, dass der beobachtete K<sup>+</sup>-Verlust durch eine Na<sup>+</sup>-Aufnahme kompensiert wurde und eine Netto-Aufnahme von Osmolyten (NaCl) erfolgte (Tabelle 10, Abb. 15). Die Bilanz der Änderungen von [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> nach der Volumen-Korrektur zeigt, dass die Aufnahme von NaCl einem Konzentrationsanstieg um 108 mM bei konstantem Volumen entspricht. Diese deutliche

Erhöhung der intrazellulären Osmolarität erklärt die beobachtete Volumenzunahme. Das Prinzip einer weitgehend elektroneutralen Aufnahme von Osmolyten, welches für die Kainat- oder  $K^+$ -induzierten Aufnahmen von NaCl bzw. KCl (vergl. Abb. 18, 29) eingehalten wurde, war bei der 5-HT-induzierten Osmolyt-Aufnahme nicht zu beobachten. Dieser Widerspruch könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei P-Neuronen eine simultane Bestimmung von Änderungen des Zellvolumens und der intrazellulären Ionenkonzentrationen nicht möglich war. Da der zeitliche Verlauf der ionalen Änderungen und der Volumenänderungen variieren kann, sind bei der Volumen-Korrektur Ungenauigkeiten möglich, die bei der Messung mit ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektroden vermieden werden. Zusätzlich werden durch die Stimulierung der metabotropen 5-HT-Rezeptoren *second-messenger-Systeme* aktiviert, die ihrerseits weitere Transportsysteme aktivieren und zu den 5-HT-induzierten ionalen Änderungen beitragen könnten (Baekgaard & Bindslev, 1998; Heinzinger et al., 2001). An der 5-HT-induzierten Antwort könnten also Anionen oder Kationen beteiligt sein, die in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurden. Eine Volumenzunahme um 40 % erfordert bei einer angenommenen intrazellulären Osmolarität von 190 mOsm/l die Aufnahme von 76 mOsm/l. Die Aufnahme von  $Na^+$  und  $Cl^-$  (108 mM) lag jedoch um ca. 32 mM höher. Dies spricht neben dem unter 3.3.3 beschriebenen Überschuss an positiver Ladung dafür, dass zusätzlich zu den in der vorliegenden Arbeit registrierten ionalen Änderungen weitere Kationen abgegeben werden müssen.

#### 4.2.4 Mechanismus der 5-HT-induzierten Volumenänderung

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine 5-HT-induzierte Volumenzunahme nur dann auftritt, wenn durch die Aktivierung der 5-HT-Rezeptoren die  $Na^+$ -Leitfähigkeit erhöht wird. Bei Retzius-Neuronen bleibt bei Rezeptor-Aktivierung eine Erhöhung der  $Na^+$ -Leitfähigkeit aus, lediglich die  $Cl^-$ -Leitfähigkeit wird erhöht. Die durch einen  $Na^+$ -Einstrom hervorgerufene Depolarisation, die eine  $Cl^-$ -Aufnahme begünstigen würde, bleibt somit aus. Im Gegensatz dazu führt bei P-Neuronen die 5-HT-induzierte Aktivierung unselektiver Kationenkanäle, die keine Desensitivierung zeigen, zu einer lang anhaltenden Erhöhung der  $Na^+$ -Leitfähigkeit. Der  $Na^+$ -Einstrom bewirkt eine Depolarisation, die die Aufnahme von  $Cl^-$  hervorruft, welche wiederum der Depolarisation entgegenwirkt. Die bei P-Neuronen vorhandene hohe  $Cl^-$ -Leitfähigkeit der

Membran und die lang anhaltende Aktivierung des unselektiven Kationenkanals führen zu einer deutlichen Aufnahme von NaCl und somit zu einer großen Volumenzunahme.

### **4.3 Glutamaterge Stimulation**

Im Zentralnervensystem des Blutegels wurden Glutamat-Rezeptoren bei vielen Zellen nachgewiesen, so zum Beispiel bei Neuropil-Gliazellen und den multifunktionalen Retzius-Neuronen, bei neuromodulatorischen Leydig-Neuronen und verschiedenen Motoneuronen, wie AE-, L-, 8- und 101-Neuronen (Dörner et al., 1994; Dierkes et al., 1996). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Glutamat-Rezeptoren im Blutegel-Zentralnervensystem durch die Agonisten AMPA und Kainat aktiviert werden, NMDA jedoch wirkungslos ist. Eine Aktivierung der Glutamat-gesteuerten unselektiven Kationenkanäle führt bei allen genannten Zellen zu einer deutlichen Depolarisation. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bei Retzius-Neuronen Glutamat-Rezeptoren des AMPA-Typs exprimiert werden. Hierfür spricht, dass der AMPA-selektive Agonist Willardiine eine deutlich höhere Depolarisation auslöst als der Kainat-selektive Agonist SYM 2081 (Abb. 16). Im Hinblick auf die Änderungen von Zellvolumen und  $[Cl^-]_i$  zeigten die verschiedenen glutamatergen Agonisten folgendes Wirkungsprofil: Kainat > AMPA > Willardiine > SYM 2081 > Glutamat. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Glutamat in einer deutlich höheren Konzentration eingesetzt wurde als die anderen Substanzen.

Der Befund, dass die Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren bei Retzius-Neuronen zu einer deutlichen  $[Cl^-]_i$ -Aufnahme führt, deutet darauf hin, dass die Volumenzunahme bei glutamaterger Stimulation von einer  $Cl^-$ -Aufnahme abhängt. Die hohe Wirksamkeit von Kainat könnte darauf beruhen, dass bei Aktivierung durch Kainat eine Desensitivierung von AMPA-Rezeptoren ausbleibt, die bei Aktivierung durch Glutamat und AMPA erfolgt (Ohno et al, 1997; Bleakman & Lodge et al, 1998).

Die Bedeutung von Glutamat-Rezeptoren bei neurotoxischen Vorgängen ist unumstritten, wobei in erster Linie NMDA-Rezeptoren für den Zelltod verantwortlich gemacht werden (Choi, 1992; Sattler & Tymianski, 2000). Die hierfür verantwortlichen Mecha-

nismen werden unterschieden in  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte degenerative Prozesse und in Schädigungen, die durch die hohe Aufnahme von Elektrolyten induziert werden. Colwell & Levine (1996) zeigten, dass die beim Glutamat-induzierten Zelltod auftretende Zellschwellung durch die Aktivierung sowohl von NMDA- als auch von nonNMDA-Rezeptoren ausgelöst wird. Die durch NMDA und Kainat induzierten Volumenzunahmen ähnelten einander sowohl im Zeitverlauf als auch in der Konzentrationsabhängigkeit, jedoch war die NMDA-induzierte Zellschwellung im Unterschied zur Kainat-induzierten irreversibel. Colwell & Levine (1996) vermuteten, dass die Volumenzunahme hauptsächlich auf die Aufnahme von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  zurückgeht.

#### 4.3.1 Charakterisierung der Kainat-induzierten Volumenzunahme bei Retzius-Neuronen

Die Kainat-induzierte Nettoaufnahme von Osmolyten verursacht eine Aufnahme von Wasser, die für die deutliche Volumenzunahme (20 %) verantwortlich ist. Die Bilanz der Kainat-induzierten Änderungen der intrazellulären Konzentrationen (Abb. 18) macht deutlich, dass die Volumenkorrektur nicht nur entscheidenden Aufschluss über die Osmolytbewegung über der Plasmamembran, sondern auch über die Ladungsverschiebungen gibt. Vor der Korrektur ergibt sich im Mittel eine Osmolytaufnahme, die allein von Anionen ( $\text{Cl}^-$ ) getragen wird und somit das Prinzip der Elektroneutralität verletzt. Hinzu kommt, dass Kainat eine Depolarisation induziert, die durch den Einstrom von Kationen bedingt ist. Die Berücksichtigung der Kainat-induzierten Volumenzunahme bei der Bewertung der intrazellulären Konzentrationsänderungen zeigt jedoch, dass die Abgabe von  $\text{K}^+$  um 50 % überschätzt, während die Aufnahme von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$  unterschätzt wurde. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichung kann hier von einer annähernd elektroneutralen Osmolytaufnahme ausgegangen werden.

Die Gleichgewichtspotentiale für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ ), die sich aus den unter 3.1.1 beschriebenen Ruhewerten für  $[\text{Cl}^-]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  ergeben, liegen bei  $-56,5$  bzw.  $57,7$  mV. Hieraus ergeben sich für die beiden Ionensorten bei einem  $E_{m\text{-Ruhe}}$  von  $-47,5$  mV einwärtsgerichtete elektromotorische Triebkräfte von  $\text{EMK}_{\text{Cl}} = 8,9$  mV bzw.  $\text{EMK}_{\text{Na}} = -105,3$  mV. Eine  $[\text{K}^+]_i$  von  $80,5$  mM bedeutet ein  $E_{\text{K}}$  von  $-75,6$  mV. Hieraus resultiert

eine auswärtsgerichtete  $EMK_K$  von 28,1 mV, die deutlich unter der für  $Na^+$  ermittelten, entgegengesetzt gerichteten EMK liegt. Der Netto-Ionenstrom durch den Kainat-gesteuerten, unselektiven Kationenkanal ist dementsprechend einwärts gerichtet. Die Kainat-induzierte Membrandepolarisation auf -28,9 mV erhöht die im Ruhezustand recht kleine  $EMK_{Cl}$  auf 27,5 mV, so dass  $Cl^-$  als Gegenion zu  $Na^+$  in die Zelle strömt, vorausgesetzt die  $Cl^-$ -Leitfähigkeit ist groß genug.

Die Ionensubstitutionsexperimente deuten auf eine hohe  $Cl^-$ -Leitfähigkeit im Ruhezustand hin. Die Entfernung des extrazellulären  $Cl^-$  bewirkte in den meisten Fällen eine deutliche Depolarisation, die auf einer  $[Cl^-]_i$ -Abnahme beruhen könnte. Der Wechsel von  $Cl^-$ -freier Lösung in NSL hingegen verursachte meist eine deutliche Hyperpolarisation, die wahrscheinlich auf eine  $Cl^-$ -Aufnahme zurückgeht (Abb. 19). Während der Rezeptor-Aktivierung in  $Cl^-$ -freier Lösung ist nicht nur der  $Cl^-$ -Einstrom unterbunden, sondern auch der  $Na^+$ -Einstrom reduziert. Da der  $K^+$ -Ausstrom unverändert erfolgt und die Zellschwellung ausbleibt, tritt in  $Cl^-$ -freier Lösung nur ein Austausch von  $K^+$  gegen  $Na^+$  ein, so dass die Volumenzunahme ausbleibt (Abb. 19). Dieses Experiment macht deutlich, dass eine Volumenzunahme nur im Zusammenhang mit einer  $Cl^-$ -Aufnahme erfolgen kann. Die  $EMK_{Na}$  nimmt mit zunehmender Depolarisation der Membran ab, und der  $Na^+$ -Einstrom benötigt ein Gegenion, das der weiteren Membrandepolarisation entgegenwirkt. Die Experimente in  $Na^+$ -freier Lösung lieferten mit dieser Sichtweise in Einklang stehende Ergebnisse. Der  $Cl^-$ -Einstrom unterbleibt auf Grund der fehlenden, auf dem  $Na^+$ -Einstrom beruhenden Depolarisation und auch die Volumenzunahme bleibt aus (Abb. 20). In  $K^+$ -freier Lösung war die Volumenzunahme dagegen unverändert. Die deutlich größere  $K^+$ -Abgabe der Zelle war von einer im gleichen Maße verstärkten  $Na^+$ -Aufnahme begleitet (Abb. 21), die vermutlich beide auf die Hemmung der  $Na^+/K^+$ -Pumpe durch den Entzug des extrazellulären  $K^+$  zurückzuführen sind. Die Hemmung der  $Na^+/K^+$ -Pumpe ist wahrscheinlich auch die Ursache dafür, dass die Repolarisation der Zelle in  $K^+$ -freier Lösung nur sehr langsam erfolgt (Dörner et al., 1994). Die vollständige Repolarisation setzt erst mit dem Wechsel von  $K^+$ -freier Lösung in NSL ein. Der Kainat-induzierte  $Cl^-$ -Einstrom war in  $K^+$ -freier Lösung unverändert, was darauf schließen lässt, dass die  $Cl^-$ -Aufnahme zusammen mit dem Gegenion  $Na^+$  das Ausmaß der Volumenzunahme bestimmt.

### **4.3.2 Wirkung von Kainat auf das Zellvolumen von P-Neuronen**

Bisherige Ergebnisse sprechen dafür, dass P-Neuronen Glutamat als Neurotransmitter ausschütten, selbst jedoch keine Glutamatrezeptoren exprimieren (Dierkes et al., 1996). Die vorliegenden Experimente bestätigen diese Befunde, da die Kainat-induzierte Depolarisation nur sehr schwach ausgeprägt war und eine Beeinflussung des Zellvolumens oder von intrazellulären Ionenkonzentrationen nicht oder nur geringfügig auftrat (Abb. 23).

### **4.3.3 Mechanismus der Kainat-induzierten Volumenzunahme bei Retzius-Neuronen**

Die Wirkung von Kainat auf das Zellvolumen von Retzius-Neuronen wird über eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit vermittelt. Die durch den  $\text{Na}^+$ -Einstrom bedingte Depolarisation führt zu einer Erhöhung der  $\text{EMK}_{\text{Cl}}$  und zum  $\text{Cl}^-$ -Einstrom auf Grund der vermuteten hohen  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit. Da Kainat bei Retzius-Neuronen ebenfalls einen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg auslöst (Dierkes, 1998), ist eine zusätzliche Erhöhung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit durch die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ - oder spannungsabhängiger  $\text{Cl}^-$ -Kanäle denkbar. Die geringe Wirkung des physiologischen Agonisten Glutamat auf das Zellvolumen ist darauf zurückzuführen, dass die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit wegen der Desensitivierung des Rezeptors nur kurzfristig erhöht wird (Dörner, 1991; Dierkes et al., 1996). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in den pharmakologischen Eigenschaften der AMPA-Rezeptoren, die in Anwesenheit von Glutamat sehr schnell desensitivieren, wohingegen in Anwesenheit von Kainat keine Desensitivierung auftritt (Ohno et al., 1997; Bleakman & Lodge, 1998). Die für AMPA beschriebene Desensitivierung scheint bei Retzius-Neuronen eher schwach zu sein, was möglicherweise an einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten liegt. Der von Dierkes et al. (1996) beschriebene AMPA-induzierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg und die deutliche Depolarisation (Abb. 16) erklären die  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme und damit die Volumenzunahme.

## 4.4 Volumenänderungen von Retzius-Neuronen bei verändertem extrazellulärem $K^+$

### 4.4.1 Beteiligung von $Cl^-$ , $K^+$ und $Na^+$ an der $K^+$ -induzierten Volumenänderung

Die Entfernung von  $K^+$  aus der extrazellulären Lösung beeinflusste das Zellvolumen nicht (Abb. 23), auch wenn  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$  abnahmen und  $[Na^+]_i$  anstieg (Abb. 28). Da kaum Netto-Ionenbewegungen auftraten (Abb. 29), wurde das Zellvolumen nicht beeinflusst. Die Ionenbewegungen werden durch die Hemmung der  $Na^+/K^+$ -Pumpe in  $K^+$ -freier Lösung verursacht.

Die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 10 mM übte nahezu keinen Einfluss auf die intrazellulären Ionenkonzentrationen aus und dementsprechend trat auch keine Volumenänderung auf. Die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 20 mM und mehr hingegen verursachte Anstiege in  $[K^+]_i$  und  $[Cl^-]_i$ , welche mit zunehmender  $[K^+]_a$  größer wurden.  $[Na^+]_i$  wurde durch eine Erhöhung von  $[K^+]_a$  dagegen nicht beeinflusst (Abb. 28). Mit  $[K^+]_i = 80,5$  mM und  $E_{m-Ruhe}$  von  $-47,5$  mV ergibt sich bei  $[K^+]_a < 12$  mM eine nach außen gerichtete  $EMK_K$  und bei  $[K^+]_a = 12$  mM beträgt die  $EMK_K \sim 0$  mV. Eine  $[K^+]_a$  von 15 mM bewirkt eine einwärtsgerichtete  $EMK_K$  von  $-5,0$  mV, die bei höheren  $[K^+]_a$  verstärkt nach innen gerichtet ist. Diese Berechnungen erklären die vorliegenden Ergebnisse recht gut, da erst bei einer  $[K^+]_a$  von 20 mM und mehr eine deutliche  $K^+$ -Aufnahme beobachtet wurde, wobei eine verstärkte  $K^+$ -Aufnahme immer mit einer verstärkten  $Cl^-$ -Aufnahme einherging. Die Experimente in  $Cl^-$ -freier Lösung ergaben bei  $[K^+]_a = 30$  mM eine Volumenabnahme (Abb. 30), wodurch deutlich wird, dass auch hier eine Volumenzunahme an eine  $Cl^-$ -Aufnahme gekoppelt ist. Bei  $[K^+]_a = 30$  mM und  $[K^+]_i = 80,5$  mM beträgt  $E_K$   $-24,9$  mV. Eine Depolarisation der Neuronen auf ca.  $-24$  mV, wie sie in den vorliegenden Experimenten in  $Cl^-$ -freier Lösung auftrat, bedeutet eine Aufhebung der  $EMK_K$  und somit ein Ende des  $K^+$ -Stroms.  $Na^+$  ist an den  $[K^+]_a$ -induzierten Volumenänderungen nicht beteiligt.

#### 4.4.2 Beteiligung von $\text{Ca}^{2+}$ an der $[\text{K}^+]_a$ -induzierten Volumenzunahme

Für Neuropil-Gliazellen und Retzius-Neuronen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Erhöhung der  $[\text{K}^+]_a$  auf über 10 mM einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursacht, der auf eine Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zurückzuführen ist. Bei Retzius-Neuronen liegt das Schwellenpotential zur Aktivierung dieser Kanäle bei  $-35$  mV (Hochstrate et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses  $E_m$  bei einer  $[\text{K}^+]_a$  zwischen 15 und 18 mM erreicht. Da der  $\text{K}^+$ -induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ungefähr bei denselben  $[\text{K}^+]_a$  einsetzt wie die Volumenzunahme, ist eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  an der Volumenzunahme denkbar.

Die simultanen Messungen von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und Zellvolumen mit Hilfe von Fura-2 zeigten eine vollständige Unterdrückung des  $\text{K}^+$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch die Blockade spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle mit  $\text{Ni}^{2+}$  (2 mM; Abb. 31). Da auch die Volumenzunahme unter diesen Bedingungen signifikant verkleinert war, scheint  $\text{Ca}^{2+}$  an der  $[\text{K}^+]_a$ -induzierten Volumenänderung beteiligt zu sein (Abb. 31). Eine direkte Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  als Osmolyt kann ausgeschlossen werden, da der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zu gering ist, um osmotisch wirksam zu sein (Hochstrate et al., 1995). Aus diesem Grund muss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beitrag zur Volumenänderung über eine Modulation von Leitfähigkeiten für  $\text{K}^+$  oder  $\text{Cl}^-$  geschehen. Hierfür kommen beispielsweise  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ - oder  $\text{Cl}^-$ -Kanäle in Frage (McCarron et al., 2002; Toland et al., 2000).

Ferner ist in einem intakten Netzwerk durch die dauerhafte Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die Veränderung von Zelleigenschaften durch die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren denkbar. Wie bereits gezeigt, kann die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren eine Volumenzunahme auslösen (Abb. 17), wohingegen 5-HT keinen Effekt auf das Zellvolumen von Retzius-Neuronen hat (Abb. 11). Da außer glutamatergen und serotonergen Rezeptoren auch cholinerge Rezeptoren bei Retzius-Neuronen beschrieben sind (Szczipak et al., 1993), wurde die Aktivierung von Glutamat- und Acetylcholin-Rezeptoren durch die spezifischen Antagonisten DNQX und d-Tubocurarin während der  $[\text{K}^+]_a$ -Erhöhung auf 30 mM gehemmt (Abb. 34). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Blockade der erregenden synaptischen Transmission zu einer Verringerung der Volumenzunahme führt. Die  $\text{K}^+$ -induzierte Membrandepolarisation war in den Experimenten mit  $\text{Ni}^{2+}$  und den Rezeptorblockern hochsignifikant verringert, erreichte jedoch Werte

oberhalb der Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, so dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den Experimenten mit den Rezeptorblockern nicht unterdrückt sein sollte (Abb. 35).

Die  $\text{K}^+$ -induzierte Volumenänderung in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung (Abb. 32) unterschied sich deutlich von der in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ . Obwohl unter beiden Bedingungen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle verhindert wird, ist der hemmende Effekt von  $\text{Ni}^{2+}$  auf die Volumenänderung größer. Die Ursache ist wahrscheinlich in der durch  $\text{Ni}^{2+}$  verursachten vollständigen Blockade der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu suchen. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung hingegen bieten spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Durchtrittsmöglichkeit für monovalente Kationen, da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen in der Kanalpore nicht belegt sind und der Durchtritt für andere Ionen nicht blockiert ist (Almers et al., 1986). Aufgrund dessen könnte hier ein  $\text{K}^+$ -Einstrom ( $\text{EMK}_K$  bei  $[\text{K}^+]_a = 30 \text{ mM}$  einwärts gerichtet) durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle erfolgen. Die in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung auftretende höhere Depolarisation könnte die Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (Jentsch et al., 1999) begünstigen. Dies wiederum würde die Volumenzunahme durch einen zusätzlichen  $\text{Cl}^-$ -Einstrom verstärken.

Aus der Bilanz der  $\text{K}^+$ -induzierten Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen (Abb. 29) geht hervor, dass die Osmolytaufnahme elektroneutral erfolgt. Dies wird jedoch ebenso wie bei der Bilanz der Kainat-induzierten Konzentrationsänderungen (4.3.1.) erst nach der Volumen-Korrektur sichtbar. Aus den beschriebenen Experimenten geht weiterhin deutlich hervor, dass die  $\text{K}^+$ -induzierte Volumenzunahme nur dann erfolgt, wenn die  $\text{K}^+$ -Aufnahme von einer  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme begleitet wird.

## 4.5 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei pathophysiologische Szenarien simuliert. Zum einen wurden die Bedingungen, die bei Vertebraten zum exzitotoxischen Zelltod führen können, durch eine Badapplikation des Neurotransmitters 5-HT und des glutamatergen Agonisten Kainat nachgeahmt, zum anderen wurden die Folgen der massiven extrazellulären  $K^+$ -Anstiege, die während eines epileptischen Anfalls oder während einer Spreading Depression auftreten können, durch eine definierte Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration untersucht. Unter beiden Bedingungen werden Zellschwellungen beobachtet, die jedoch verschiedene ionale Ursachen haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Neurotransmitter-induzierten Änderungen des Zellvolumens durch die Aufnahme von NaCl bedingt sind. Voraussetzung hierfür ist eine Rezeptor-induzierte Erhöhung der  $Na^+$ -Leitfähigkeit, die auf Grund der einwärtsgerichteten  $EMK_{Na}$  zu einem  $Na^+$ -Einstrom führt. Eine messbare  $Na^+$ -Aufnahme erfolgt jedoch nur, wenn sie von einer  $Cl^-$ -Aufnahme begleitet wird. Die  $Cl^-$ -Aufnahme setzt eine recht hohe  $Cl^-$ -Leitfähigkeit voraus, die bei P- und auch bei Retzius-Neuronen im Ruhezustand gegeben zu sein scheint und sich möglicherweise  $Ca^{2+}$ - oder spannungsabhängig verstärken lässt.

Die Desensitivierung der AMPA-Rezeptoren bei Aktivierung durch den physiologischen Neurotransmitter Glutamat könnte einen Schutzmechanismus gegen neurotoxische Vorgänge darstellen. Ein solcher Mechanismus würde zwar die schnelle Signaltransduktion gewährleisten, jedoch eine langanhaltende Erhöhung der  $Na^+$ -Leitfähigkeit und somit eine Volumenzunahme verhindern.

Die durch Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration hervorgerufene Volumenzunahme bei Retzius-Neuronen basiert auf einer KCl-Aufnahme. Unter physiologischen Bedingungen ist die  $EMK_K$  auswärts gerichtet und die  $Na^+$ -Leitfähigkeit klein. Größere Änderungen in  $[K^+]_a$  führen zu einer einwärtsgerichteten  $EMK_K$ . Auf Grund der im Ruhezustand hohen  $K^+$ -Leitfähigkeit bewirken hohe  $[K^+]_a$  einen  $K^+$ -Einstrom, welcher zu einer Depolarisation und zum Einstrom von  $Cl^-$  führt. Die Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger

Cl<sup>-</sup>-Kanäle könnte zusätzlich zu einer hohen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit beitragen, wodurch die Aufnahme dieses Gegenions zu K<sup>+</sup> verstärkt wird.

## 5. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurden Änderungen des Zellvolumens unter isoosmotischen Bedingungen und die ihnen zu Grunde liegenden ionalen Mechanismen bei Retzius- und P-Neuronen des Bluteigel-Zentralnervensystems untersucht. Hierzu wurden ionensensitive Mehrkanal-Mikroelektroden verwendet, welche die simultane Messung von bis zu drei verschiedenen Parametern ermöglichen. Neben dem Membranpotential ( $E_m$ ) wurden das relative Zellvolumen ( $Vol_{rel.}$ ) durch die Bestimmung der intrazellulären Konzentration des Volumenmarkers  $TMA^+$  ( $[TMA^+]_i$ ) sowie die intrazellulären Ionenkonzentrationen von  $Cl^-$  ( $[Cl^-]_i$ ),  $Na^+$  ( $[Na^+]_i$ ) oder  $K^+$  ( $[K^+]_i$ ) registriert. Darüber hinaus wurden mikrofluorimetrische Messungen mit dem  $Ca^{2+}$ -Indikator Fura-2 zur simultanen Bestimmung des Zellvolumens und der freien intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) durchgeführt.

2. Bei Superfusion des Ganglions mit Normalsalzlösung (NSL) wiesen Retzius-Neuronen ein  $E_m$  von  $-47,5 \pm 9,5$  mV ( $n=153$ ) auf, eine  $[Cl^-]_i$  von  $10,1 \pm 3,7$  mM ( $n=33$ ) und eine  $[Na^+]_i$  von  $9,1 \pm 3,0$  mM ( $n=14$ ). Die Messung von  $[K^+]_i$  erfolgte mit zwei verschiedenen Sensoren, wobei die Messungen mit Hilfe des klassischen Ionenaustauschers Corning 477317 einen Ruhewert von  $88,3 \pm 18,6$  mM ( $n=23$ ) ergaben und die mit dem neutralen Carrier Valinomycin einen Ruhewert von  $80,5 \pm 16,6$  mM ( $n=19$ ).  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mikrofluorimetrisch mit Hilfe von Fura-2 zu  $65 \pm 26$  nM ( $n=11$ ) bestimmt.

3. Bei Superfusion mit NSL wiesen P-Neuronen ein  $E_m$  von  $-53,2 \pm 8,6$  mV ( $n=49$ ) auf. Die Ruhewerte für  $[Cl^-]_i$ ,  $[Na^+]_i$  und  $[K^+]_i$  lagen bei  $12,6 \pm 2,6$  mM ( $n=20$ ),  $9,6 \pm 3,2$  mM ( $n=13$ ) und  $67,7 \pm 21,8$  mM ( $n=6$ ), wobei  $[K^+]_i$  nur mit dem neutralen Carrier Valinomycin gemessen wurde.

4. Die Beladung der Neuronen mit dem Volumenmarker  $TMA^+$  erfolgte durch Superfusion eines Ganglions mit 5 mM TMA-Cl in NSL. Die  $TMA^+$ -Aufnahmerate von Retzius- und P-Neuronen lag bei  $0,31 \pm 0,21$  mM/min ( $n=89$ ) bzw.  $0,51 \pm 0,31$  mM/min ( $n=7$ ).

5. Die Badapplikation von 5 mM 5-HT übte bei Retzius-Neuronen nur einen sehr geringen Effekt aus. In Abhängigkeit vom Cl<sup>-</sup>-Gleichgewichtspotential ( $E_{Cl}$ ) und Ruhemembranpotential ( $E_{m-Ruhe}$ ) antworteten diese Neuronen entweder mit einer Hyperpolarisation ( $E_{m-Ruhe} > E_{Cl}$ ) von  $-5,5 \pm 2,6$  mV (n=12) oder mit einer Depolarisation ( $E_{m-Ruhe} < E_{Cl}$ ) von  $3,6 \pm 2,8$  mV (n=7). Die simultan bestimmten  $[Cl^-]_i$ -,  $[K^+]_i$ - und  $[Na^+]_i$ -Änderungen von  $0,6 \pm 1,1$  mM (n=4),  $2,2 \pm 0,3$  mM (n=4) bzw.  $0,4 \pm 0,8$  mM (n=4) waren gering. Das unveränderte Zellvolumen der Neuronen während der 5-HT-Applikation ( $1,8 \pm 6,6$  %; n=3) ist durch die geringen Ionenbewegungen über die Plasmamembran erklärbar.

6. Die Applikation von 5 mM 5-HT bewirkte bei P-Neuronen eine deutliche Volumenzunahme von  $40,5 \pm 4,6$  % (n=5), die auf eine Nettoaufnahme von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen (108 mM) zurückzuführen ist. Die K<sup>+</sup>-Abgabe wurde durch eine sehr viel größere  $[Na^+]_i$ -Aufnahme kompensiert. Die 5-HT-Applikation induzierte eine Depolarisation von  $45,2 \pm 8,7$  mV (n=40), auf die nach Wegnahme des Agonisten bei mehr als 40 % der Zellen eine Hyperpolarisation von  $-9,7 \pm 8,0$  mV folgte.

7. Der glutamaterge Agonist Kainat (100 μM) übte bei P-Neuronen so gut wie keinen Effekt aus. Lediglich  $E_m$  depolarisierte um  $6,6 \pm 4,4$  mV (n=11). Das Zellvolumen und die intrazellulären Ionenkonzentrationen blieben unverändert. Im Gegensatz hierzu führte Kainat bei Retzius-Neuronen zu einer Depolarisation um  $17,0 \pm 5,7$  mV (n=40) und einer Volumenzunahme um  $20,1 \pm 9,9$  % (n=33). Diese Volumenzunahme wurde durch eine Nettoaufnahme von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen (23 mM) verursacht. Die K<sup>+</sup>-Abgabe wurde durch eine größere Na<sup>+</sup>-Aufnahme kompensiert.

8. Die Entfernung des extrazellulären K<sup>+</sup> bewirkte bei Retzius-Neuronen eine Hyperpolarisation ( $-12,0 \pm 6,3$  mV; n=25), beeinflusste jedoch das Zellvolumen nicht. In K<sup>+</sup>-freier Lösung stieg  $[Na^+]_i$  um  $9,7 \pm 6,5$  mM (n=6),  $[K^+]_i$  bzw.  $[Cl^-]_i$  fielen um  $9,7 \pm 3,7$  mM (n=3) bzw.  $3,1 \pm 2,0$  mM (n=4) ab. Die  $[Na^+]_i$ - und  $[K^+]_i$ -Änderungen sind durch die Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe in K<sup>+</sup>-freier Lösung erklärbar.

9. Die moderate Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration  $[K^+]_a$  auf 10 mM verursachte eine Depolarisation, beeinflusste das Zellvolumen aber nicht. Eine weitere Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 20 mM löste sowohl eine Depolarisation als auch eine Volu-

menzunahme aus. Die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 30 mM bewirkte eine Membrandepolarisation um  $22,6 \pm 7,5$  mV (n=46) und eine Volumenzunahme um  $29,6 \pm 7,8$  % (n=34). Die Volumenzunahme wurde durch die Nettoaufnahme von  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen (53 mM) verursacht.  $[Na^+]_i$  blieb praktisch unverändert.

**10.** Da bei der Blockade der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle durch 2 mM  $Ni^{2+}$  die  $K^+$ -induzierte Volumenzunahme auf  $47,4 \pm 30,1$  % (n=5) der Vorkontrolle reduziert war, scheint der durch 30 mM  $K^+$  induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (um  $172 \pm 89$  nM, n=8) indirekt an der Volumenzunahme beteiligt zu sein. In Gegenwart von DNQX und d-Tubocurarin war die Volumenzunahme auch deutlich reduziert ( $54,0 \pm 11,6$  % der Vorkontrolle; n=4). Dies deutet darauf hin, dass die  $Ca^{2+}$ -Wirkung teilweise über eine Rezeptor-Aktivierung vermittelt wird.

**11.** Die  $K^+$ -induzierte Volumenzunahme war in  $Cl^-$ -freier Lösung unterdrückt, wohingegen die Depolarisation erhalten blieb. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die  $K^+$ -Aufnahme nur in Gegenwart von  $Cl^-$  erfolgen kann.

**12.** Aus diesen Experimenten kann gefolgert werden dass die Neurotransmitter-induzierten Volumenzunahmen bei Blutegel-Neuronen auf einer langfristigen Erhöhung der  $Na^+$ -Leitfähigkeit durch die Rezeptor-Aktivierung beruhen. Die durch den  $Na^+$ -Einstrom verursachte Depolarisation bewirkt eine  $Cl^-$ -Aufnahme der Zellen, welche wiederum der Depolarisation entgegenwirkt und eine weitere  $Na^+$ -Aufnahme ermöglicht. Da 5-HT bei Retzius-Neuronen lediglich zu einer Erhöhung der  $Cl^-$ -Leitfähigkeit führt bleibt eine Volumenzunahme aus. Die  $K^+$ -induzierte Volumenzunahme beruht dagegen auf der bei hohen  $[K^+]_a$  einwärtsgerichteten elektromotorischen Triebkraft für  $K^+$  ( $EMK_K$ ). Aufgrund der hohen  $K^+$ -Leitfähigkeit der Membran strömt  $K^+$  in die Zelle und verursacht eine Depolarisation, welche wiederum einen  $Cl^-$ -Einstrom begünstigt. Auch hier erfolgt nur eine Volumenzunahme, wenn  $Cl^-$  als Gegenion zusätzlich aufgenommen wird und der Depolarisation entgegenwirkt.

## 6. Literaturverzeichnis

Acosta-Urquidi, J., Sahley, C.L. & Kleinhaus, A.L. (1989): Serotonin differentially modulates two K<sup>+</sup> currents in the Retzius-cell of the leech. *J. exp. Biol.*, **145**: 403-417

Almers, W., Mc Cleskey, E.W. & Palade, P.T. (1986): The mechanism of ion selectivity in calcium channels of skeletal muscle membrane. In: *Membrane Control of Cellular Activity*, ed. Lüttgau, H.C., Georg Fischer Verlag, Stuttgart

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

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

Amédée, T., Robert, A. & Coles, J.A. (1997): Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia*, **21**: 46-55

Ayrapetyan, S.N. & Suleymanian, M.A. (1979): On the pump-induced cell volume changes. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **64**: 571-575

Azmitia, E.C. (2001): Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.*, **56**: 413-424

Baekgaard, A. & Bindslev, N. (1998): Novel protein kinase C, nPKC, inhibition of murine bumetanide-sensitive Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter BSC1 in *Xenopus* oocyte. *Pflügers Arch.*, **436**: 189-198

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

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

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

Baylor, D.A. & Nicholls J.G. (1969): Changes in extracellular potassium concentrations produced by neuronal activity in the central nervous system of the leech. *J. Physiol. (Lond.)*, **203**: 555-569

Behnam-Motlagh, P., Engstrom, K.G. Henriksson, R. & Grankvist, K. (1999): Serotonergic modulation of cell volume response to estramustine: an image-analysis study on perfused individual glioma cells. *Eur. J. Cancer*, **35**: 145-153

Berridge, M.J. & Schlue, W.-R. (1978): Ion-selective electrode studies on the effects of 5-hydroxytryptamine on the intracellular level of potassium in an insect salivary gland. *J. exp. Biol.*, **72**: 203-216

Bettler, B. & Mulle, C. (1995): Review: Neurotransmitter receptors II, AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, **34**: 123-139

Bischoff, U., Vogel, W. & Safronov, V. (1998): Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J. Physiol. (Lond.)*, **510**: 743-754

Bleakman, D. & Lodge, D. (1998): Neuropharmacology of AMPA and kainite receptors. *Neuropharmacology*, **37**: 1187-1204

Bostel, S., Malo, M., Rouzaire-Dubois, B. & Dubois, J.-M. (2002): Calcium and voltage-dependent alterations of cell volume in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Pflügers Arch.*, **444**: 186-192

Breton, S., Marsolais, M., Lapointe, J.Y. & Laprade, R. (1996): Cell volume increases of physiological amplitude activate basolateral K and Cl conductances in the rabbit proximal convoluted tubule. *J. Am. Nephrol.*, **7**: 2072-2087

Brodfehrer, P.D. & Cohen, A.H. (1992): Glutamate-like immunoreactivity in the leech central nervous system. *Histochemistry*, **97**: 511-516

Brown, E., Kendall, D.A. & Nahorski, S.R. (1984): Inositol phospholipid hydrolysis in rat cerebral cortical slices: receptor characterization. *J. Neurochem.*, **42**: 1379-1387

Choi, D.W. (1992): Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*, **23**: 1261-1276

Coles, J.A. & Tsacopoulos, M. (1977): A method of making fine double-barrelled potassium-sensitive micro-electrodes for intracellular recording. *J. Physiol. (Lond.)*, **270**: 12P-14P

Colwell, C.S. & Levine, M.S. (1996): Glutamate receptor-induced toxicity in neostriatal cells. *Brain Res.*, **724**: 205-212

Coulon, P. (2001): Einfluss extrazellulärer Ionen auf das Volumen und die elektrophysiologischen Eigenschaften identifizierter Blutegel-Neuronen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Deitmer, J. & Schlue, W.-R. (1981): Measurements of the intracellular potassium activity of Retzius cells in the leech central nervous system. *J. exp. Biol.*, **91**: 87-101

Deitmer, J. & Schlue, W.-R. (1987): The regulation of intracellular pH by identified glial cells and neurones in the central nervous system of the leech. *J. Physiol. (Lond.)*, **388**: 261-283

Deitmer, J.W. & Schlue, W.-R. (1988): Intracellular acidosis of identified leech neurones produced by substitution of external sodium. *Brain Res.*, **462**: 233-241

Dierkes, P.W., Hochstrate, P. & Schlue W.-R. (1996): Distribution and functional properties of glutamate receptors in the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.*, **75**: 2312-2321

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

Dierkes, P.W., Neumann, S., Müller, A., Günzel, D. & Schlue, W.-R. (2002 a): Multi-barrelled ion-selective microelectrodes: Measurements of cell volume, membrane potential and intracellular ion concentrations in invertebrate nerve cells. In: *Electrochemical Microsystem Technologies*, eds. Schultze, J.W., Osaka, T. & Datta, M., Taylor & Francis

Dierkes, P.W., Coulon, P., Neumann, S. & Schlue, W.-R. (2002 b): Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations under voltage-clamp conditions in invertebrate nerve cells. *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**: 762-766

Dörner, R. (1991): Elektrophysiologische und autoradiographische Untersuchungen zur Wirkung von Glutamat bei Retzius-Neuronen und Neuropil-Gliazellen im Zentralnervensystem des Blutegels *Hirudo medicinalis L.*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dörner, R., Zens, M. & Schlue, W.-R. (1994): Effects of glutamatergic agonists and antagonists on membrane potential and intracellular Na<sup>+</sup> activity of the leech glial and nerve cells. *Brain Res.*, **665**: 47-53

Drapeau, P. & Sanchez-Armass, S. (1988) : Selection of postsynaptic serotonin receptors during reinnervation of an identified leech neuron in culture. *J. Neurosci.*, **8**: 4718-4727

Eisenman, G. (1962): Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.*, **2**: Supl., 259-323

Ferrer-Martinez, A., Casado, F.J., Felipe, A. & Pastoranglada, M. (1996): Regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter in the renal epithelial cell line NBL 1 under osmotic stress. *Biochem. J.*, **319**: 337-342

Frey, G. & Schlue, W.-R. (1993): pH recovery from intracellular alkalinization in Retzius neurones of the leech central nervous system. *J. Physiol. (Lond.)*, **462**: 627-643

Garner, C., Feniuk, W. & Brown, P.D. (1993): Serotonin activates Cl<sup>-</sup> channels in the apical membrane of rat choroids plexus epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **239**: 31-37

Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440-3450

Günzel, D. & Schlue, W.-R. (1996): Sodium-magnesium antiport in Retzius neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *J. Physiol. (Lond.)*, **491**: 595-608

Günzel, D., Durry, S. & Schlue, W.-R. (1997): Intracellular alkalinization causes Mg<sup>2+</sup> release from intracellular binding sites in leech Retzius neurones. *Pflügers Arch.*, **435**: 65-73

Hansson, E. & Ronnback, L. (1992): Receptor-mediated volume regulation in astrocytes in primary culture. *Neuropharmacology*, **31**: 85-87

Häussinger, D., Stoll, B., Vom Dahl, S., Theodoropoulos, P.A., Markogiannakis, E., Gravanis, A., Lang, F. & Stournaras, C. (1994): Effect of the hepatocyte swelling on microtubule stability and tubulin mRNA levels. *Biochem. Cell. Biol.*, **72**: 12-19

Headly, M.P. & Grillner, S. (1990): Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *TiPS.*, **11**: 205-211

Heinzinger, H., Van den Boom, F., Tinel, H. & Wehner, F. (2001): In rat hepatocytes, the hypertonic activation of Na<sup>+</sup> conductance and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> symport- but not Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>- antiport- is mediated by protein kinase C. *J. Physiol. (Lond.)*, **536**: 703-715

Hintz, K., Günzel, D. & Schlue, W.-R. (1999): Na<sup>+</sup>-dependent regulation of free Mg<sup>2+</sup> concentration in neuropile glial cells and P neurones of the leech *Hirudo medicinalis*. *Pflügers Arch.*, **437**: 354-362

Hochstrate, P. & Schlue, W.-R. (1994): Ca<sup>2+</sup> influx into leech glial cells and neurones caused by pharmacologically distinct glutamate receptors. *Glia*, **12**: 268-280

Hochstrate, P. & Schlue, W.-R. (1995): Ca<sup>2+</sup> influx into leech neuropile glial cells mediated by nicotinic acetylcholine receptors. *Glia*, **15**: 43-53

Hochstrate, P., Piel, C. & Schlue, W.-R. (1995): Effect of extracellular K<sup>+</sup> on the intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration in leech glial cells and Retzius neurones. *Brain Res.*, **696**: 231-241

Humphrey, P.P.A., Hartig, P. & Hoyer, D. (1993): A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *TiPS*, **14**: 233-236

Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A. & Yamada, H. (1999): The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch.*, **437**: 783-795

Kilb, W. (1994): Modulation der pH-Regulation durch Neurotransmitter bei identifizierten Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kilb, W. & Schlue, W.-R. (1999): Mechanism of the kainate-induced intracellular acidification in leech Retzius neurons. *Brain Res.*, **824**: 168-182

Kilb, W. & Schlue, W.-R. (2001): Feedback control of intracellular pH by means of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> injection. *Pflügers Arch.*, **443**: 54-60

Klees, G. (2002): Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Volumenänderungen identifizierter Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Koepsell, H., Gorboulev, V. & Arndt, P. (1999): Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J. Membrane Biol.*, **167**: 103-117

Kristan Jr., W.B., French, A.K. & Szczupak, L. (1993): Developmental regulation of segment-specific cholinergic receptors on Retzius neurons in the medicinal leech. *J. Neurosci.*, **13**: 1577-1587

- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. & Häussinger, D. (1998) a: Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, **78**: 247-306
- Lang, F., Busch, G.L. & Völkl, H. (1998) b: The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.*, **8**: 1-45
- Lee, K., Dixon, A.K. & Pinnock, R.D. (1999): Serotonin depolarizes hippocampal interneurons in the rat stratum oriens by interaction with 5HT<sub>2</sub> receptors. *Neurosci. Lett.*, **270**: 56-58
- Lent, C.M. & Dickinson, M.H. (1984): Serotonin integrates the feeding behavior of the medicinal leech. *J. Comp. Physiol. A*, **154**: 457-471
- Lessmann, V. & Dietzel, I.D. (1991): Development of serotonin-induced ion currents in identified embryonic Retzius cells from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). *J. Neuroscience*, **11**: 800-809
- Lessmann, V. & Dietzel, I.D. (1995): Enhancement of postsynaptic serotonin-activated Cl<sup>-</sup> currents by depolarisation-induced Ca<sup>2+</sup> entry into leech neurons. *Neuroscience*, **67**: 525-529
- Lucht, M. (1997): Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren und Second-Messenger-Kaskaden bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Nervensystems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Lux, H.D., Heinemann, U. & Dietzel, I. (1986): Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv. Neurol.*, **44**: 619-639
- Macagno, E. R. (1980): Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J. comp. Neurol.*, **190**: 283-302

- Mann, K.H. (1962): Leeches (Hirudinea)- Their Structure, Physiology, Ecology and Embryology. *Pergamon Press, New York, Oxford, London, Paris*
- McCarron, J.G., Bradley, K.N. & Muir, T.C. (2002):  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$ -channels in smooth muscle. *Novartis Found. Symp.*, **246**: 52-64
- McCarty, N.A. & O'Neil, R. (1992): Calcium signalling in cell volume regulation. *Physiol. Rev.*, **72**: 1037-1061
- Minta, A. & Tsien, R.Y. (1989): Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J. Biol. Chem.*, **264**: 19449-19457
- Mori, H. & Mishina, M. (1995): Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, **34**: 1219-1237
- Muallem, S., Zhang, B.-X., Lossberg, P.A. & Star, R.A. (1992): Simultaneous recordings of cell volume changes and intracellular pH or  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in single osteosarcoma cells UMR-106-01. *J. Biol. Chem.*, **267**: 17658-17664
- Müller, A. (2000): Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung der Wirkung glutamaterger Stimulation auf  $\text{Mg}^{2+}$ -Einstrom und  $\text{Mg}^{2+}$ -Regulation in Retzius-Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Müller, M. & Somjen, G.G. (2000):  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, **83**: 735-745
- Muller, K.J., Nicholls, J.G. & Stent, G.S. (1981): Neurobiology of the Leech. *Cold Spring Harbor Laboratory*
- Munsch, T. (1991): Elektrophysiologische Untersuchungen zur Wirkung von 5-Hydroxytryptamin an Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

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

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

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

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

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

Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J.-I., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M. & Tsuji, A. (1999): Na<sup>+</sup>-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): Ist pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**: 778-784

Ohno, K., Okada, M., Tsutsumi, R., Kohara, A. & Yamaguchi, T. (1997): Kainate excitotoxicity is mediated by AMPA- but not kainate-preferring receptors in embryonic rat-hippocampal cultures. *Neurochem. Int.*, **31**: 715-722

Olivieri, O., Vitoux, D., Galacteros, F., Bachir, D., Blouquit, Y., Beuzard, Y., & Brugnara, C. (1992): Hemoglobin variants and activity of the K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-cotransport system in human erythrocytes. *Blood*, **79**: 793-797

Olney, J.W. (1986): Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **203**: 631-645

O'Neill, W. C. (1999): Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am. J. Physiol.*, **267**: C995-C1011

O'Reilly, N., Xia, Z., Fiander, H., Tauskela, J. & Small, D.L. (2002): Disparity between ionic mediators of volume regulation and apoptosis in N1E 115 mouse neuroblastoma cells. *Brain Res.*, **943**: 245-256

Papke, R.L., Bencherif, M. & Lippiello, P. (1996): An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci. Lett.*, **213**: 201-204

Pasantes-Morales, H., Franco, R., Torres-Marques, M.E., Hernández-Fonseca, K. & Ortega, A. (2000): Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol. Biochem.*, **10**: 361-370

Pershadsingh, H.A. & McDonald, J.M. (1980): A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent adenosine triphosphase in rat adipocyte plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **255**: 4087-4093

Pierce, S.K. & Politis, A.D. (1990): Ca<sup>2+</sup>-activated cell volume recovery mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.*, **52**: 27-42

Reuss, L. (1985): Changes in cell volume measured with an electrophysiologic technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6014-6018

Sanchez-Armass, S., Merz, D.C. & Drapeau, P. (1991): Distinct receptors, second messengers and conductances underlying the dual responses to serotonin in an identified leech neurone. *J. exp. Biol.*, **155**: 531-547

Sattler, R. & Tymianski, M. (2000): Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.*, **78**: 3-13

Scheller, D., Tegtmeier, F. & Schlue, W.-R. (1998): Dose-dependent effects of tetramethylammonium on circling Spreading Depressions in chicken retina. *J. Neurosci. Res.*, **51**: 85-89

Schloss, P. & Williams, D.C. (1998): The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *J. Psychopharmacol.*, **12**: 115-121

Schlue, W.-R. & Deitmer, J.W. (1984): Potassium distribution and membrane potential of sensory neurons in the leech nervous system. *J. Neurophysiol.*, **51**: 689-704

Schlue, W.-R., Wuttke, W. & Deitmer, J.W. (1985): Ion activity measurements in extracellular spaces, nerve and glial cells in the central nervous system of the leech. In: *Ion Measurements in Physiology and Medicine* eds. Kessler, M., Harrison, D.K. & Höper, J., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Schlue, W.-R. (1991): Effects of ouabain on intracellular ion activities of sensory neurons of the leech central nervous system. *J. Neurophysiol.*, **65**: 736-746

Schlue, W.-R., Kilb, W. & Günzel, D. (1997): Ultramicroelectrodes for membrane research. *Electrochim. Acta*, **42**: 3197-3205

Shi, H., Wang, H. & Wang, Z. (1999): Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. *Mol. Pharmacol.*, **55**: 497-507

Stryer, L. (1996): *Biochemie*, 4.Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Syková, E. (1997): The extracellular space in the CNS: Its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function. *Neuroscientist*, **3**: 28-41

Szczupak, L., Jordan, S. & Kristan Jr., W.B. (1993): Segment-specific modulation of the electrophysiological activity of leech Retzius neurons by acetylcholine. *J. exp. Biol.*, **183**: 115-135

Theodoropoulos, P.A., Stournaras, C., Stoll, B., Markogiannakis, E., Lang, F., Gravanis, A. & Häussinger, D. (1992): Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-/total actin ratio and increases actin mRNA levels. *FEBS Lett.*, **311**: 241-245

Toland, H.M., McCloskey, K.D., Thornbury, K.D., McHale, N.G. & Hollywood, M.A. (2000): Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup>-current in sheep lymphatic smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**: C1327-1335

Tsien, R.Y. (1989): Fluorescent probes of cell signalling. *Ann. Rev. Neurosci.*, **12**: 227-253

Walker, R.J. & Smith, P.A. (1973): The ionic mechanism for 5-hydroxytryptamine inhibition on Retzius cells of the leech *Hirudo medicinalis*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **45**: 979-993

Walz, W. (1992): Mechanism of rapid K<sup>+</sup>-induced swelling of mouse astrocytes. *Neurosci. Lett.*, **135**: 243-246

Wärntges, S., Gröne, H.-J., Capasso, G. & Lang, F. (2001): Cell volume regulatory mechanisms in progression of renal disease. *J. Nephrol.*, **14**: 319-326

Wüsten, J. (2000): Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen von Volumenänderungen bei identifizierten Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Yim, S.V., Kim, K.H., Kim, C.J. & Chung, J.H. (2000): Serotonin induces apoptosis in PGT- $\beta$  pineal gland tumor cells. *Japanese J. Pharmacol.*, **84**: 71-740

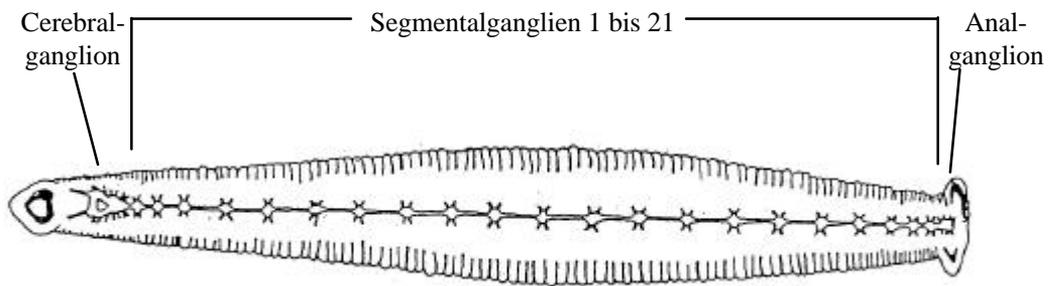
Zorumski, C.F. & Thio, L.L. (1992): Properties of vertebrate glutamate receptors: calcium mobilization and desensitisation. *Prog. Neurobiol.*, **39**: 295-336

## **7. Abbildungen**

**A**



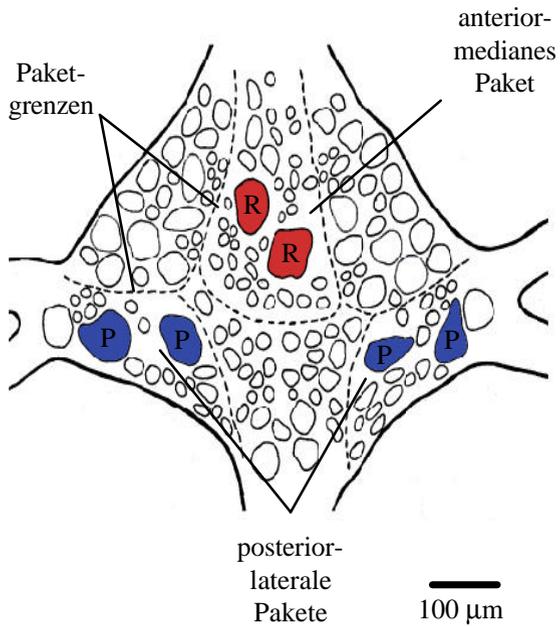
**B**



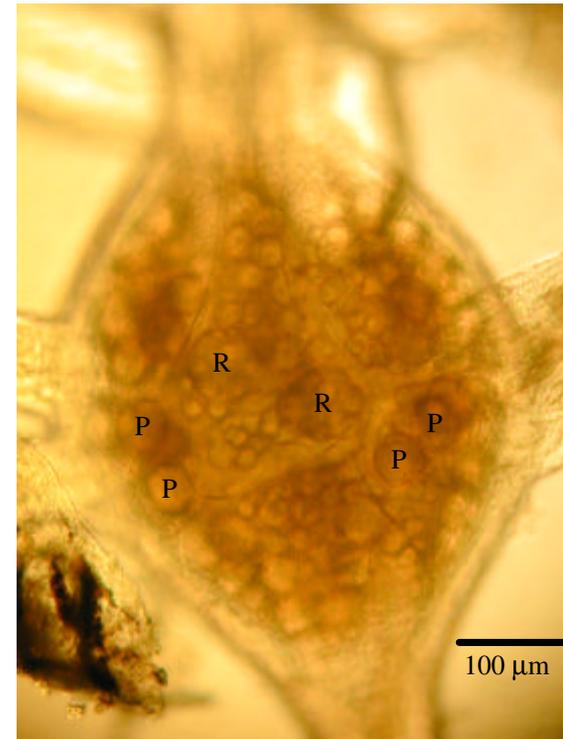
**Abb. 1:** Fotografische Aufnahme (A) und schematische Darstellung (B) des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*.

Die fotografische Aufnahme zeigt einen Blutegel im Größenvergleich mit einer 2 Euro-Münze. In der schematischen Darstellung ist die Lage des Zentralnervensystems im Blutegelkörper dargestellt. Das Cerebralganglion ist über eine Kette aus 21 Segmentalganglien mit dem Analganglion verbunden. Die einzelnen Ganglien sind über paarige Konnektive und den Faivre-Nerv mit den Nachbarganglien in Kontakt.

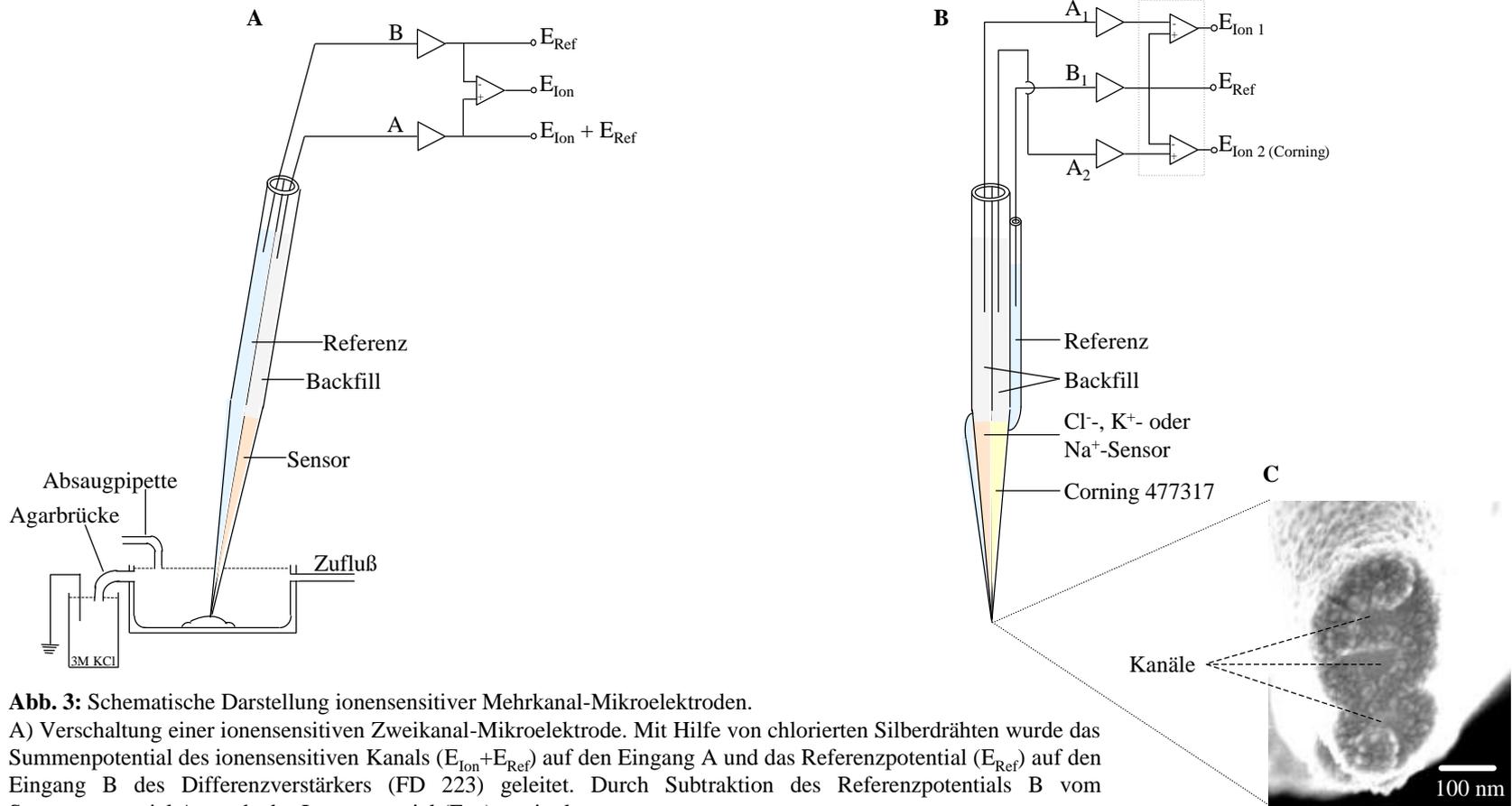
A



B



**Abb. 2:** Schematische Darstellung (A) und mikroskopische Aufnahme (B) der Ventralansicht eines Segmentalganglions des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*. Die in dieser Arbeit untersuchten multifunktionalen Retzius (R)- und mechanosensorischen pressure-Neuronen (P) sind durch die entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet.

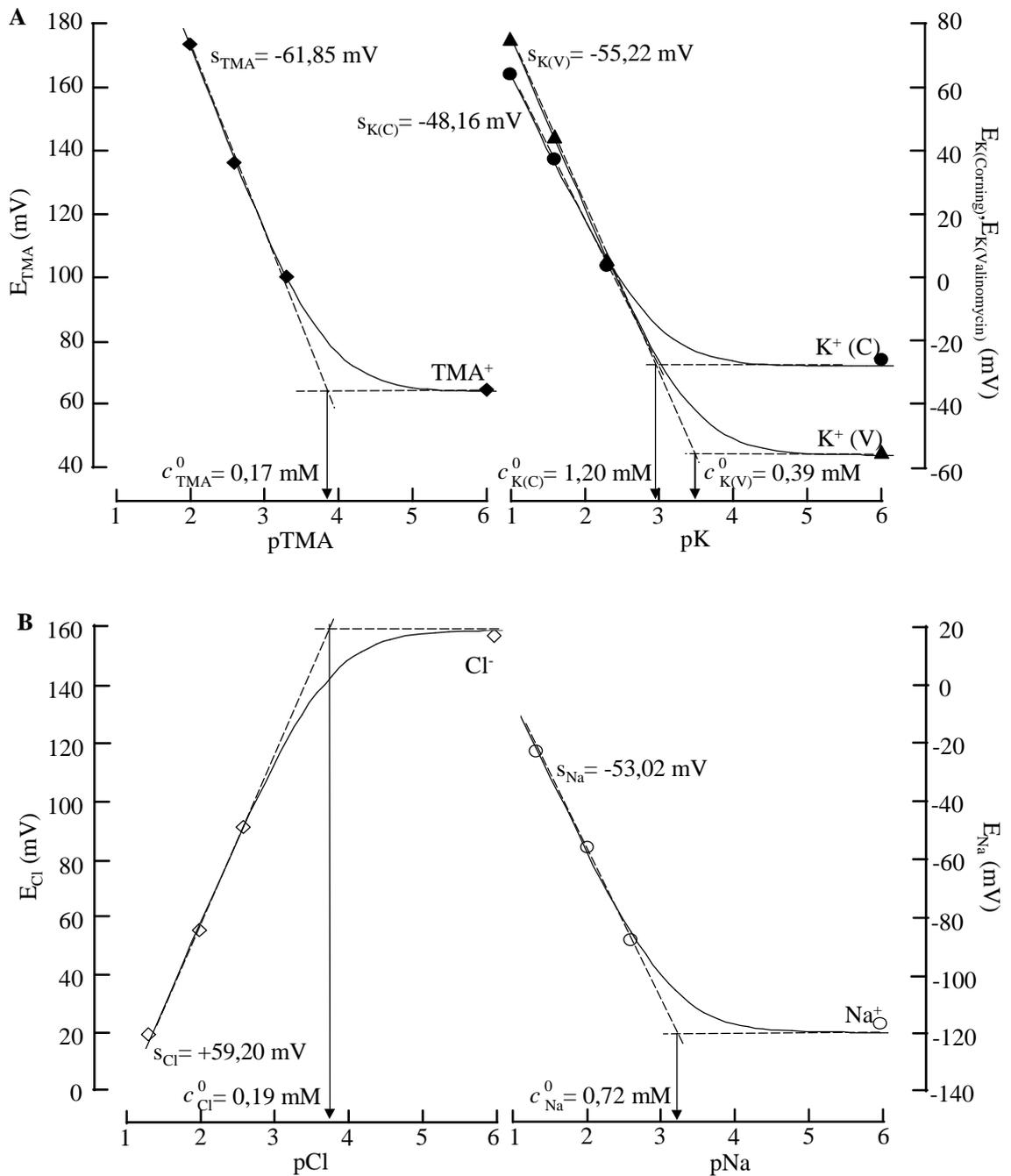


**Abb. 3:** Schematische Darstellung ionensensitiver Mehrkanal-Mikroelektroden.

A) Verschaltung einer ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektrode. Mit Hilfe von chlorierten Silberdrähten wurde das Summenpotential des ionensensitiven Kanals ( $E_{Ion} + E_{Ref}$ ) auf den Eingang A und das Referenzpotential ( $E_{Ref}$ ) auf den Eingang B des Differenzverstärkers (FD 223) geleitet. Durch Subtraktion des Referenzpotentials B vom Summenpotential A wurde das Ionenpotential ( $E_{Ion}$ ) ermittelt.

B) Verschaltung einer ionensensitiven Dreikanal-Mikroelektrode. Auf Grund der unterschiedlichen Eingangswiderstände des 2. Differenzverstärkers (Duo 773) konnte der Eingang  $B_2$  dieses Verstärkers nicht zur Bestimmung des Referenzpotentials und zur Berechnung des Ionenpotentials herangezogen werden. Die Subtraktion des Referenzpotentials ( $B_1$ ) von den Summenpotentialen ( $A_1$  und  $A_2$ ) erfolgte mit Hilfe des Aufzeichnungscomputers.

C) Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Elektrodenspitze zeigt drei voneinander getrennte Kanäle.

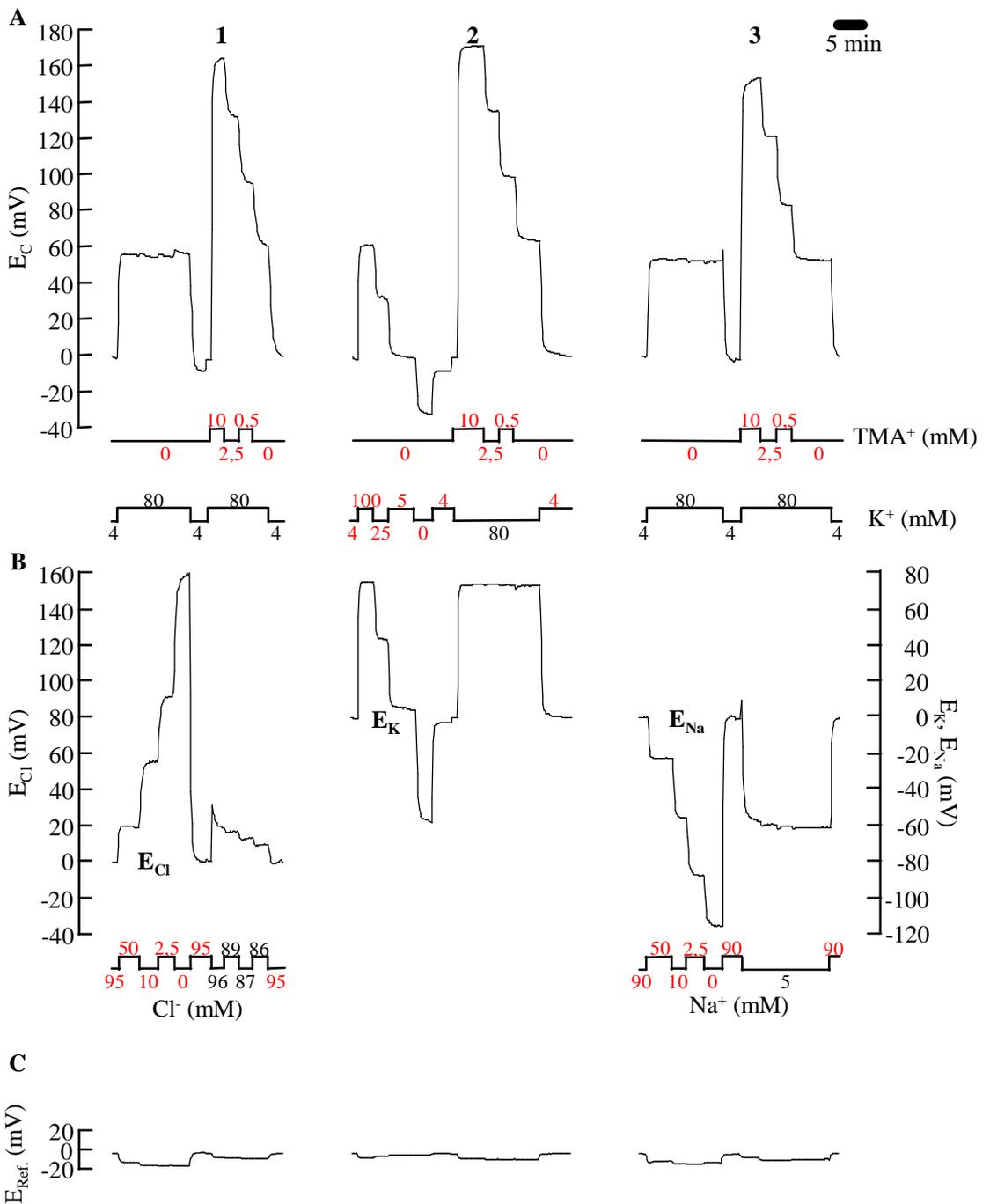


**Abb. 4:** Eichkurven verschiedener ionensensitiver Mikroelektroden.

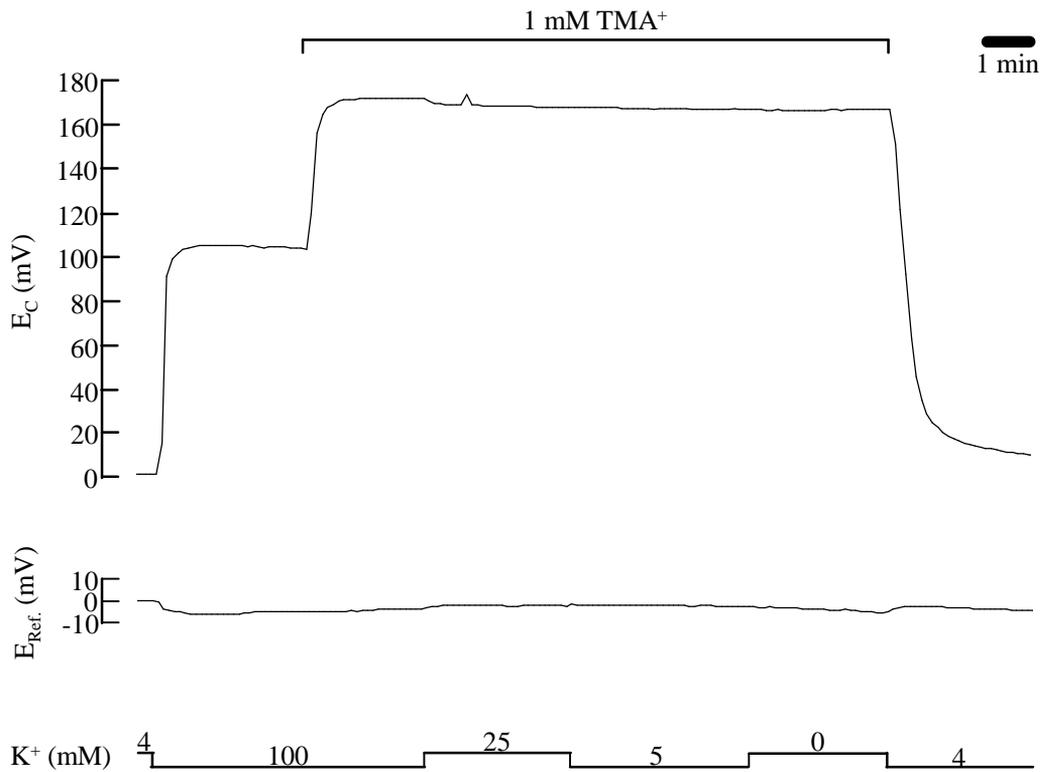
Die in den Eichlösungen ermittelten Ionenpotentiale ( $E_{ion}$  in mV) wurden gegen den negativen dekadischen Logarithmus der entsprechenden Ionenkonzentration ( $pIon$ ) aufgetragen. Die durchgezogenen Kurven wurden mit Hilfe der Nicolsky-Eisenman-Gleichung berechnet. Der Schnittpunkt der Asymptoten liefert das graphisch bestimmte Detektionslimit der jeweiligen Elektrode. Die rechnerisch bestimmten Werte für Steigung ( $s_{ion}$ ) bzw. Detektionslimit ( $c_{i, ion}^0$ ) sind ebenfalls in den Abbildungen angegeben.

A) K<sup>+</sup>-sensitive Elektroden, basierend auf dem Ionenaustauscher Corning 477317, konnten sowohl mit TMA<sup>+</sup> (◆) als auch mit K<sup>+</sup> (●, K(C)) geeicht werden. K<sup>+</sup>-sensitive Elektroden mit dem neutralen Carrier Valinomycin wurden nur mit K<sup>+</sup> (▲, K(V)) geeicht.

B) zeigt die Eichkurven einer Cl<sup>-</sup> (◇) sowie einer Na<sup>+</sup>-sensitiven (○) Elektrode.

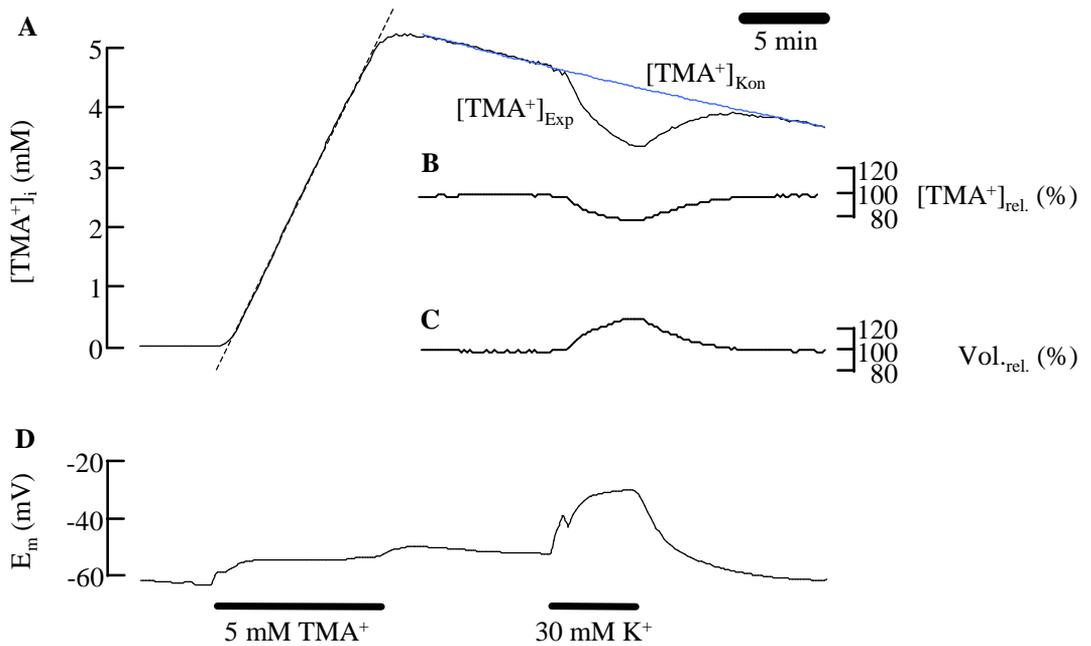


**Abb. 5:** Registrierbeispiele von Eichungen verschiedener ionensensitiver Dreikanalelektroden. Ein ionensensitiver Kanal jeder Elektrode war zur Bestimmung des Zellvolumens mit Corning 477317 gefüllt ( $E_C$ , A). Mit dem zweiten ionensensitiven Kanal wurde simultan entweder  $Cl^-$  ( $E_{Cl}$ , 1),  $K^+$  ( $E_K$ , 2) oder  $Na^+$  ( $E_{Na}$ , 3) gemessen (B). Mit dem dritten Kanal der Elektroden wurde das Referenzpotential bestimmt ( $E_{Ref.}$ , C). Die für die jeweilige Eichung relevanten Ionenkonzentrationen in den Eichlösungen sind rot angegeben.



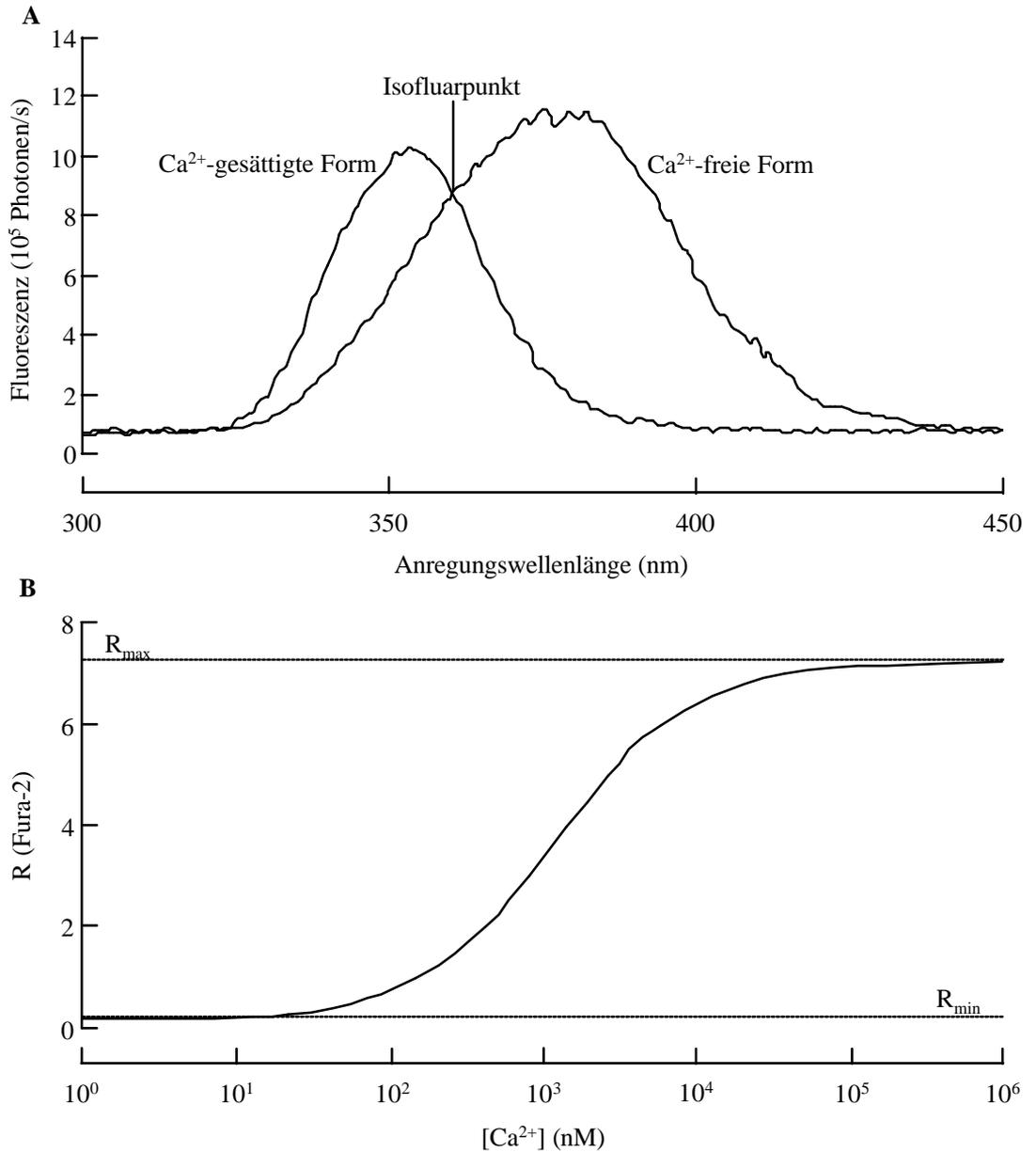
**Abb. 6:** Unterdrückung der K<sup>+</sup>-Sensitivität des klassischen Ionenaustauschers Corning 477317 in Gegenwart von TMA<sup>+</sup>.

Das Ionensignal des Corning 477317 ( $E_C$ ) reagierte in Gegenwart von 1 mM TMA<sup>+</sup> nicht auf Änderungen der K<sup>+</sup>-Konzentration in der Eichlösung. Unter diesen Bedingungen war die K<sup>+</sup>-Sensitivität des Sensors vollständig unterdrückt. Die vorangegangene K<sup>+</sup>-Eichung der Elektrode ergab eine Steigung von  $-50,2$  mV sowie ein Detektionslimit von  $0,93$  mM.



**Abb. 7:** Messung des relativen Zellvolumens mit Hilfe ionensensitiver Mikroelektroden am Beispiel eines Retzius-Neurons.

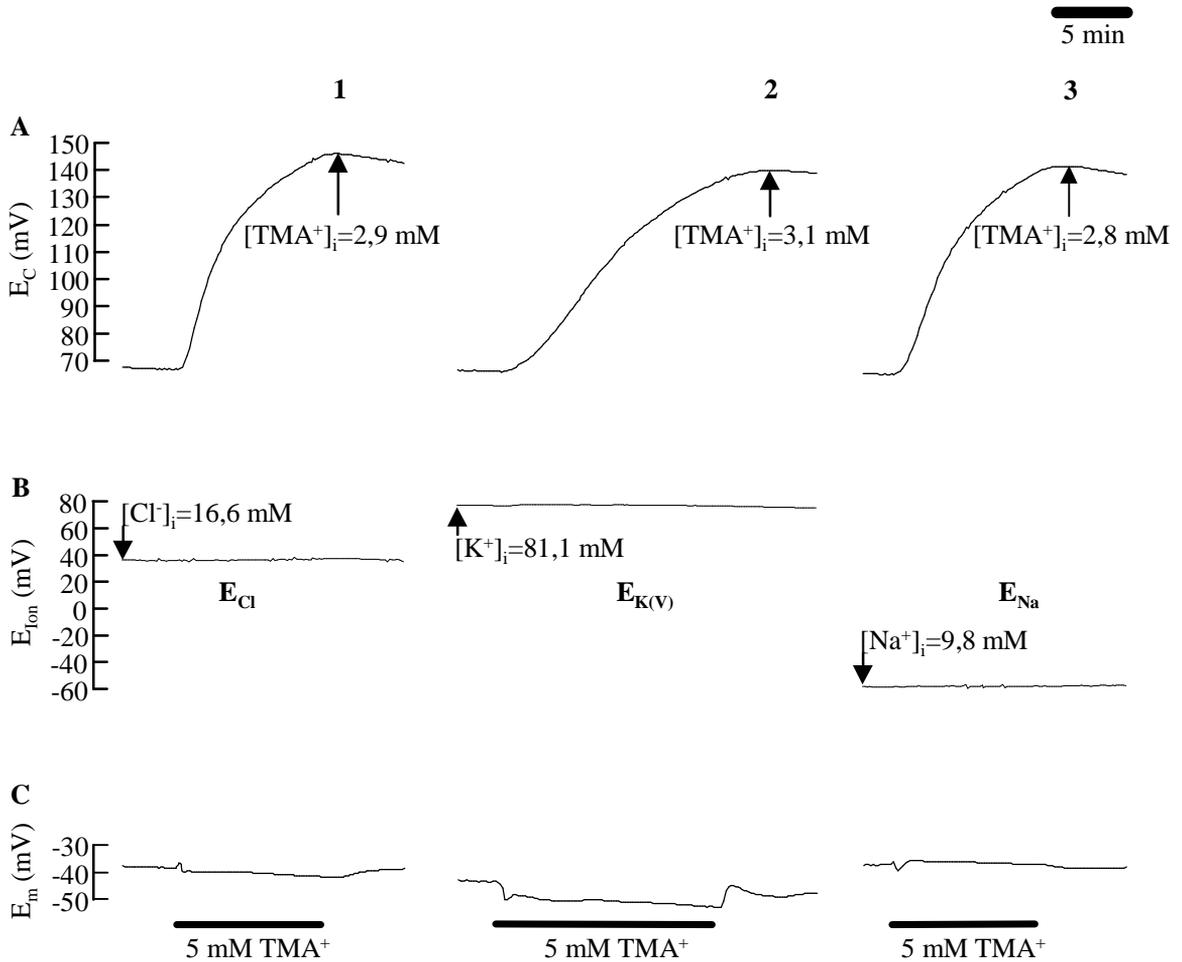
Die Beladung des Neurons mit dem Volumenmarker  $\text{TMA}^+$  erfolgte durch Applikation von 5 mM  $\text{TMA-Cl}$  in NSL. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den linearen Bereich in dem die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahmerate bestimmt wurde. Der  $\text{TMA}^+$ -Verlust der Zelle nach der Beladung erfolgte deutlich langsamer als die  $\text{TMA}^+$ -Aufnahme und konnte mittels einer Exponential-Funktion beschrieben werden (blaue Linie, A). Diese kalkulierte  $[\text{TMA}^+]_i$  wurde als Kontroll-Konzentration ( $[\text{TMA}^+]_{\text{Kon}}$ ) zur Berechnung des relativen Zellvolumens ( $\text{Vol}_{\text{rel.}}$ ) herangezogen. Änderungen in der gemessenen  $[\text{TMA}^+]_i$  ( $[\text{TMA}^+]_{\text{Exp}}$ ), hier ausgelöst durch Erhöhung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration auf 30 mM, spiegelten die Veränderungen des Zellvolumens wider. Das Verhältnis  $[\text{TMA}^+]_{\text{Exp}} / [\text{TMA}^+]_{\text{Kon}}$  liefert die relative  $[\text{TMA}^+]_i$  ( $[\text{TMA}^+]_{\text{rel.}}$ , B) und damit den Kehrwert des relativen Zellvolumens ( $\text{Vol}_{\text{rel.}}$ , C). Teilabbildung D zeigt das simultan gemessene Membranpotential ( $E_m$ ).



**Abb. 8:** Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2.

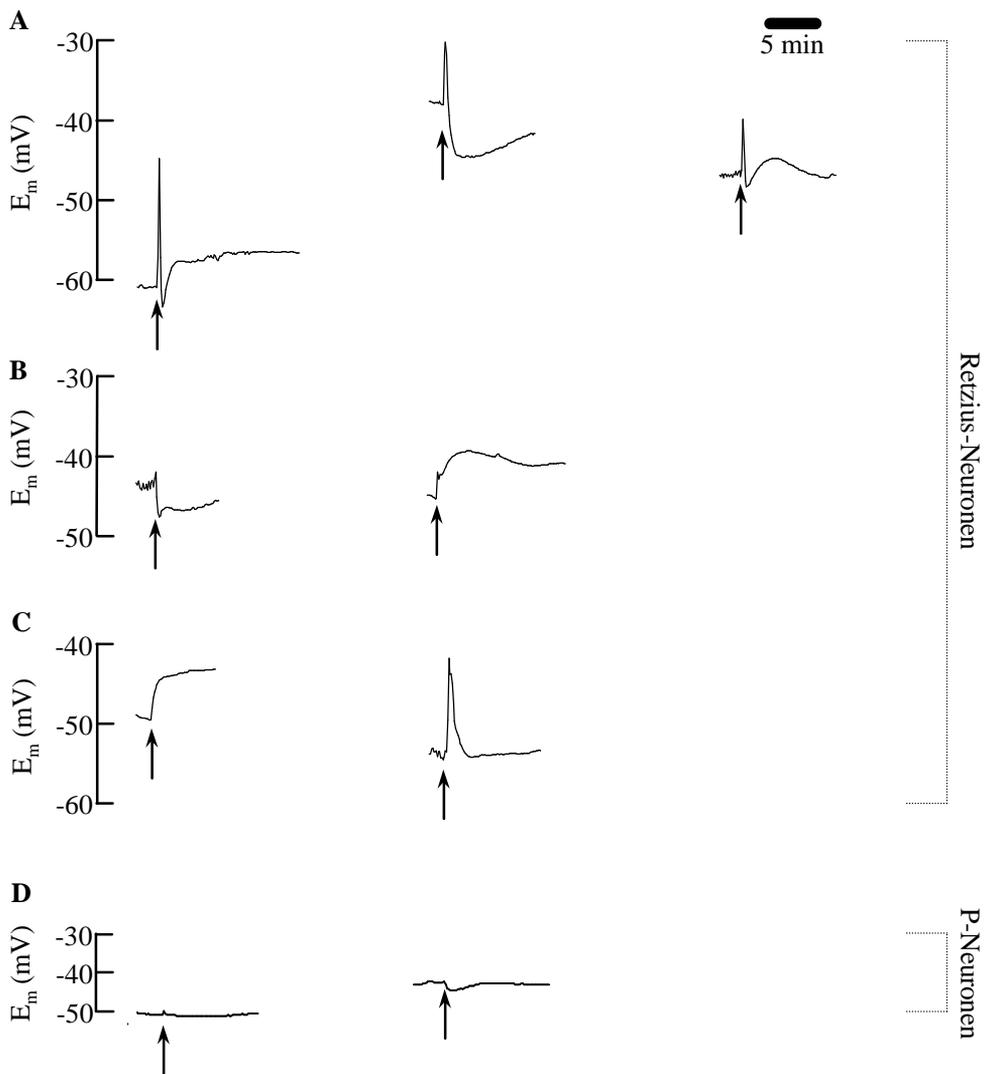
A) Mikrofluorimetrisch gemessene Anregungsspektren der  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten und der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form von Fura-2. Der Schnittpunkt beider Spektren (360 nm) stellt den Isofluorpunkt dar, bei dem die Fura-2-Fluoreszenz von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an den Farbstoff unabhängig ist. Die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte mit den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm.

B) Die Eichkurve nach der Ratio-Methode stellt das Verhältnis der durch 340 bzw. 380 nm induzierten Fluoreszenz ( $R(340 \text{ nm}/380 \text{ nm}) = R(\text{Fura-2})$ ) in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dar (Grynkiewicz et al., 1985).



**Abb. 9:** Wirkung der TMA<sup>+</sup>-Beladung bei drei verschiedenen Retzius-Neuronen (1-3) auf die Ionenpotentiale von Corning 477317 ( $E_C$ , A); Cl<sup>-</sup>-Ionophor ( $E_{Cl}$ , B1), K<sup>+</sup>-Ionophor (Valinomycin,  $E_{K(V)}$ ; B2) oder Na<sup>+</sup>-Ionophor ( $E_{Na}$ , B1) sowie auf das Membranpotential ( $E_m$ , C).

Die Badapplikation von 5 mM TMA<sup>+</sup> führte bei allen Zellen zu einer TMA<sup>+</sup>-Aufnahme, die sich in einem deutlichen Anstieg von  $E_C$  widerspiegelte.  $E_{Cl}$ ,  $E_{K(V)}$  oder  $E_{Na}$  wurden durch den [TMA<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg nicht beeinflusst. Da  $E_{K(V)}$  während der Dauer der Applikation konstant blieb, also keine Veränderung von [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> auftrat, ist auszuschließen, dass der Anstieg von  $E_C$  durch eine K<sup>+</sup>-Aufnahme der Zelle verursacht wurde. Die Wirkung von TMA<sup>+</sup> auf das  $E_m$  war unterschiedlich. Bei vielen Zellen wurde kurz nach Beginn der TMA<sup>+</sup>-Applikation eine transiente Depolarisation beobachtet, die in eine anhaltende Depolarisation oder Hyperpolarisation überging (siehe Abb. 10).



**Abb. 10:** Wirkung von  $\text{TMA}^+$  auf  $E_m$  bei verschiedenen Retzius- (A-C) und P-Neuronen (D).

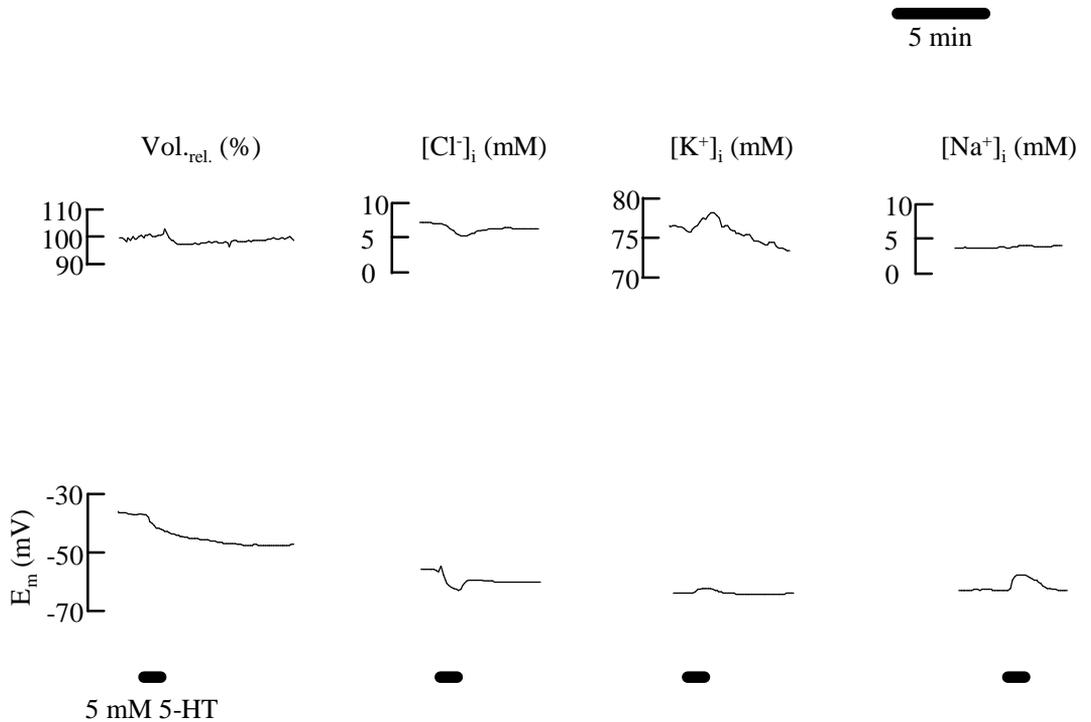
Die Pfeile kennzeichnen den Wechsel von NSL in die 5 mM  $\text{TMA}^+$ -haltige Lösung.

A) Registrierbeispiele von typischen biphasischen Membranantworten. Auf eine schnelle transiente Depolarisation folgte eine langanhaltende De- oder Hyperpolarisation.

B) Registrierbeispiele von biphasischen Antworten bei denen die transiente Depolarisation sehr schwach ausgeprägt war.

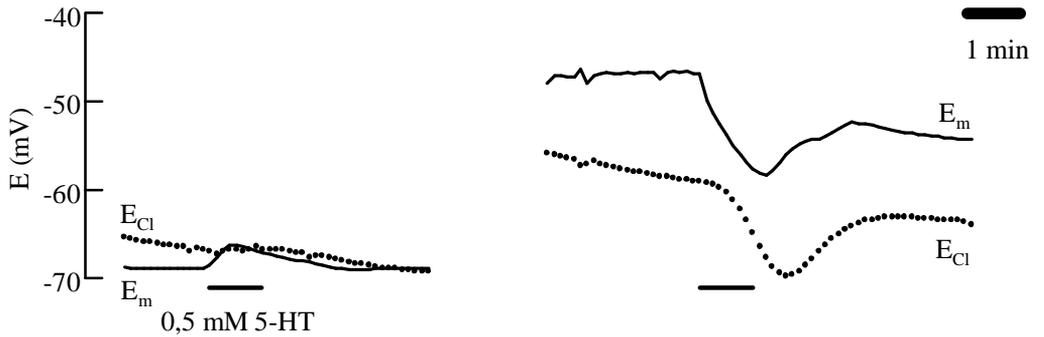
C) Registrierbeispiele von Membranantworten, bei denen entweder die transiente Depolarisation oder die anschließende langanhaltende De- bzw. Hyperpolarisation fehlte.

D) Bei P-Neuronen fiel im Vergleich zu Retzius-Neuronen die Wirkung von  $\text{TMA}^+$  auf das  $E_m$  nur schwach aus.

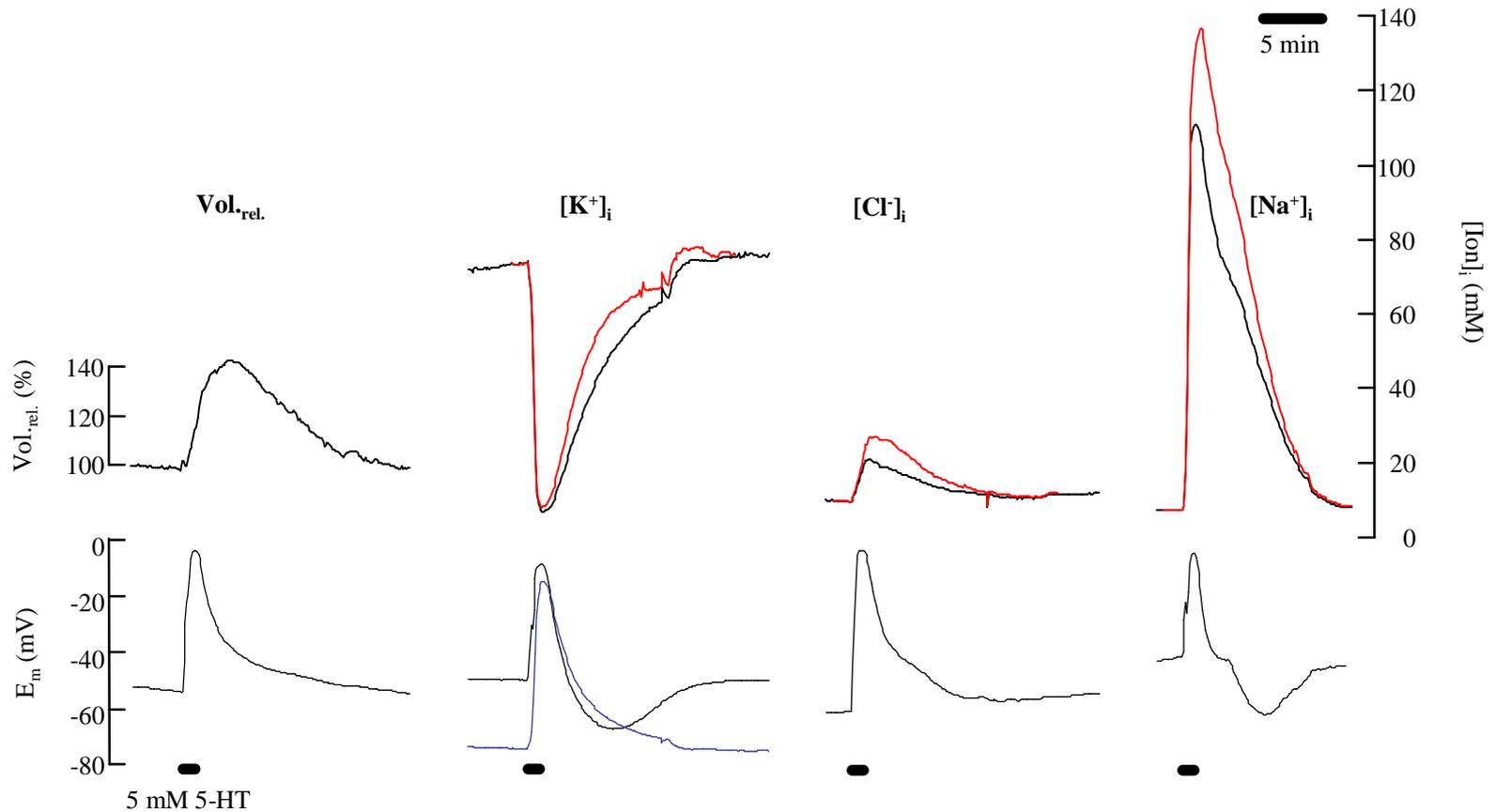


**Abb. 11:** Registrierbeispiele der Wirkung von 5-HT auf das Zellvolumen, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und E<sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen.

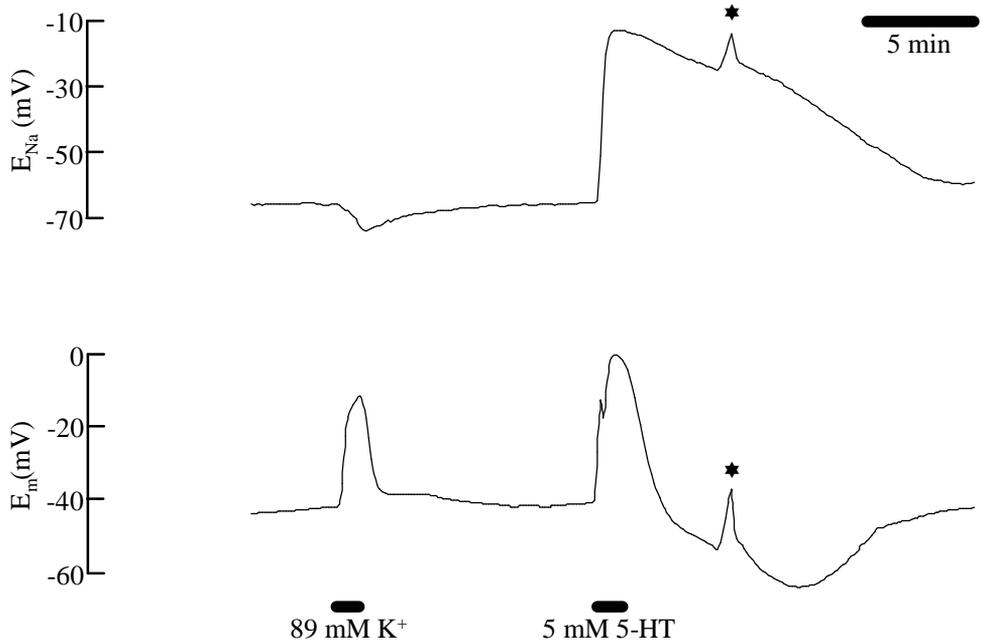
Messung an vier verschiedenen Zellen, bei denen simultan zu E<sub>m</sub> das Volumen, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> oder [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> mit Hilfe von Zweikanal-Mikroelektroden registriert wurde. Die einminütige Applikation von 5 mM 5-HT hatte keinen Einfluss auf das Zellvolumen und auf [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, führte jedoch zu einem leichten [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Abfall und zu einem [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg. Die Wirkung auf E<sub>m</sub> war sehr unterschiedlich. Bei den meisten Zellen führte 5-HT zu einer kurzfristigen Verstellung von E<sub>m</sub>, wobei Zellen mit geringem E<sub>m-Ruhe</sub> mit einer Hyperpolarisation und Zellen mit hohem E<sub>m-Ruhe</sub> mit einer Depolarisation reagierten. Nach dem Auswaschen war die Wirkung des Agonisten in der Regel rasch reversibel. Bei ca. 25 % der untersuchten Retzius-Neuronen war jedoch eine anhaltende Hyperpolarisation zu beobachten.



**Abb. 12:** Registrierbeispiele der Wirkung von 0,5 mM 5-HT bei Retzius-Neuronen auf  $E_m$ . Die  $E_m$ -Verschiebung bei Applikation von 5-HT hing von dem jeweiligen  $Cl^-$ -Gleichgewichtspotential ( $E_{Cl}$ ) der Retzius-Neuronen ab. In der linken Registrierung war  $E_m$  negativer als  $E_{Cl}$ , in der rechten Registrierung dagegen positiver. In beiden Fällen verschob sich  $E_m$  bei 5-HT-Gabe in Richtung  $E_{Cl}$ . Die Membran polarisierte in Richtung von  $E_{Cl}$ .

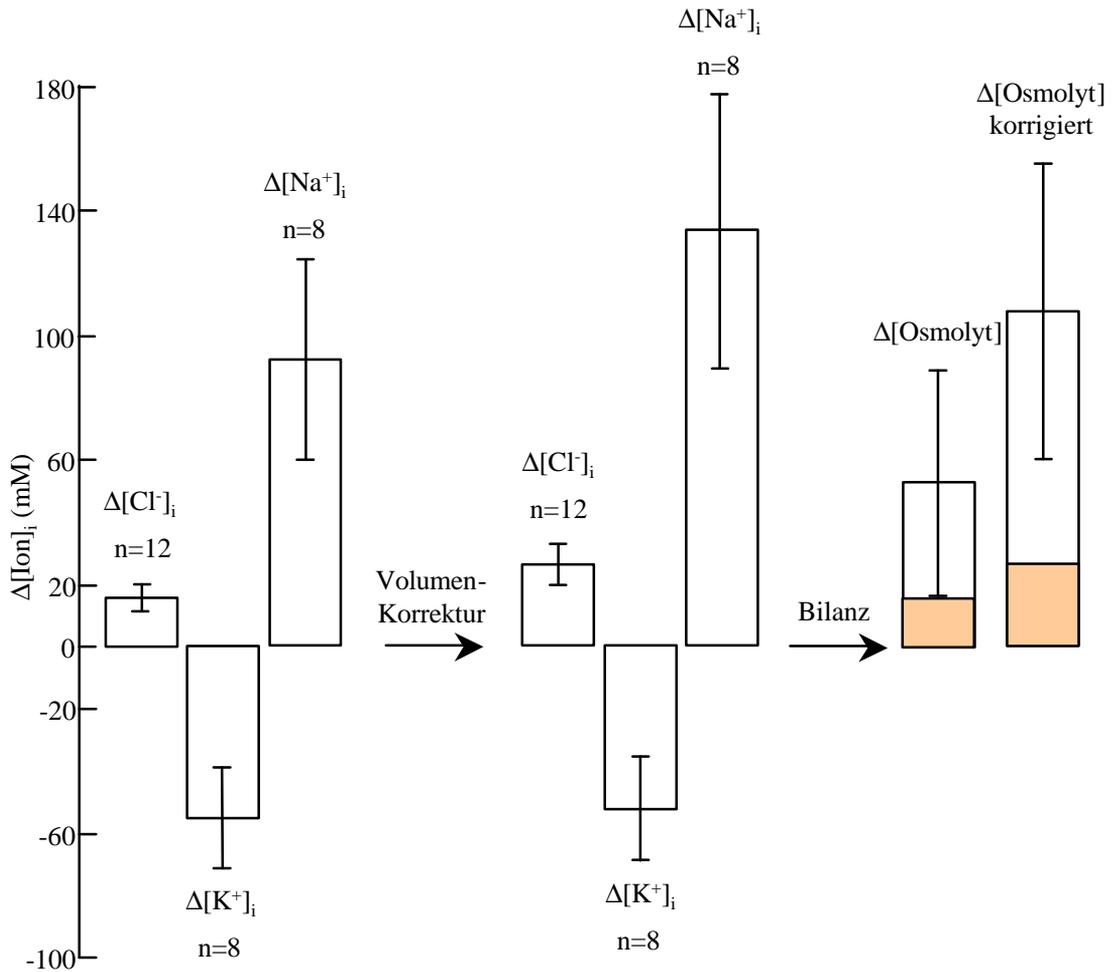


**Abb. 13:** Registrierbeispiele der Wirkung von 5-HT auf das Zellvolumen,  $[K^+]_i$ ,  $[Cl^-]_i$ ,  $[Na^+]_i$  und  $E_m$  bei P-Neuronen. Messung an vier verschiedenen Zellen bei denen simultan zu  $E_m$  das Volumen  $[K^+]_i$ ,  $[Cl^-]_i$  oder  $[Na^+]_i$  mit Hilfe von Zweikanal-Mikroelektroden registriert wurde. Die einminütige Applikation von 5 mM 5-HT verursachte eine Volumenzunahme, welche von einem starken  $[K^+]_i$ -Abfall, einem starken  $[Na^+]_i$ -Anstieg sowie einem moderaten  $[Cl^-]_i$ -Anstieg begleitet wurde. Da das Zellvolumen nicht simultan mitbestimmt werden konnte, wurde für die Volumen-Korrektur der intrazellulären Ionenkonzentrationen (rote Linien) eine aus 5 Volumenmessungen gemittelte Spur verwendet. Es wird deutlich, dass der  $[Cl^-]_i$ - und  $[Na^+]_i$ -Anstieg während der Zellschwellung unterschätzt wurden und der  $[K^+]_i$ -Abfall überschätzt wurde. Weiter führte 5-HT zu einer Depolarisation, die bei einigen Zellen biphasisch verlief. Während der Repolarisation und der anschließenden Hyperpolarisation lag  $E_m$  in Nähe des  $K^+$ -Gleichgewichtspotentials (blaue Linie).



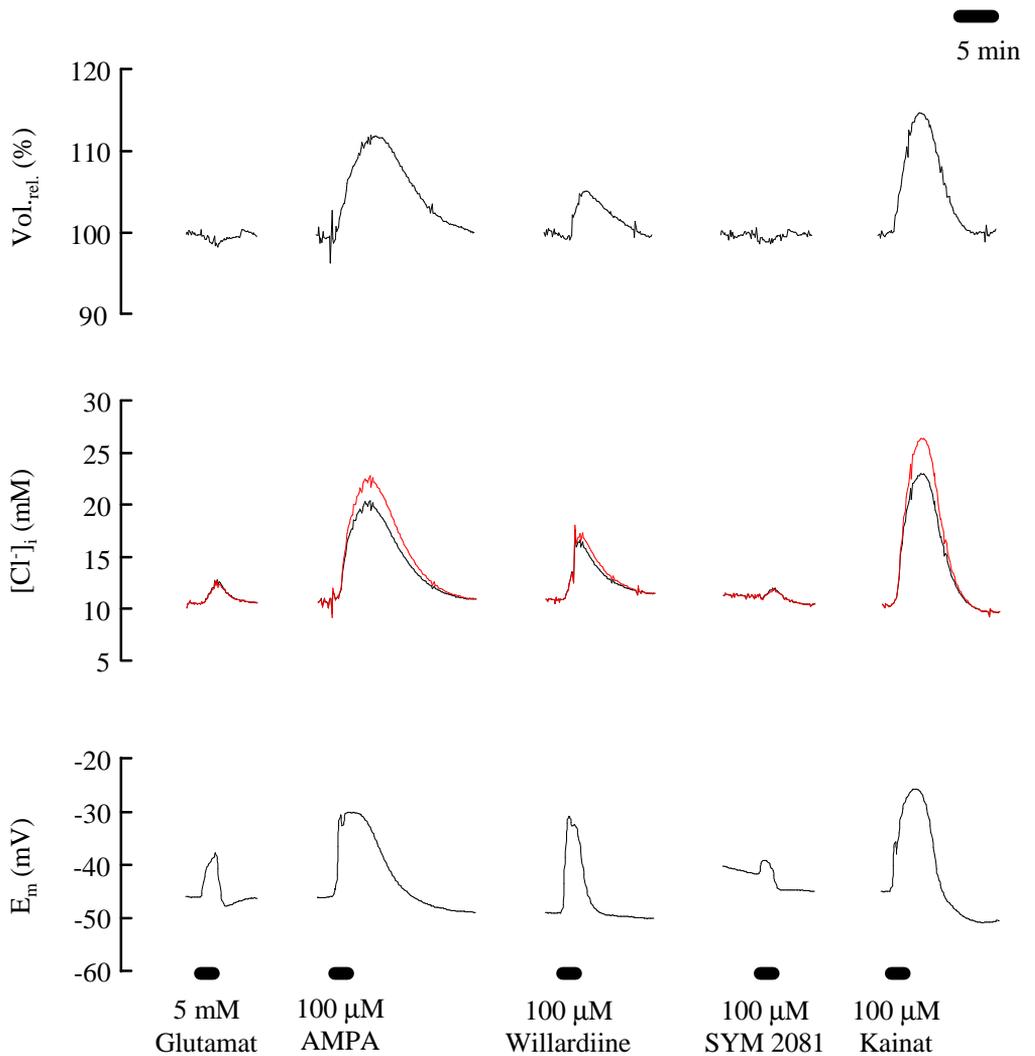
**Abb. 14:** Registrierbeispiele der Wirkung von 5-HT und einer Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf  $E_{Na}$  und  $E_m$  bei P-Neuronen.

Die Badapplikation von 5 mM 5-HT und die  $[K^+]_a$ -Erhöhung von 4 auf 89 mM führten zu einer Depolarisation vergleichbarer Amplitude. Die 5-HT-induzierte Depolarisation erfolgte zweiphasig. Weiterhin wurde  $E_{Na}$  durch die 5-HT-Applikation stark in positive Richtung verschoben, wohingegen die  $[K^+]_a$ -Erhöhung zu einer Verschiebung in negative Richtung führte. Die mit \* markierten Potentialverschiebungen sind Artefakte.



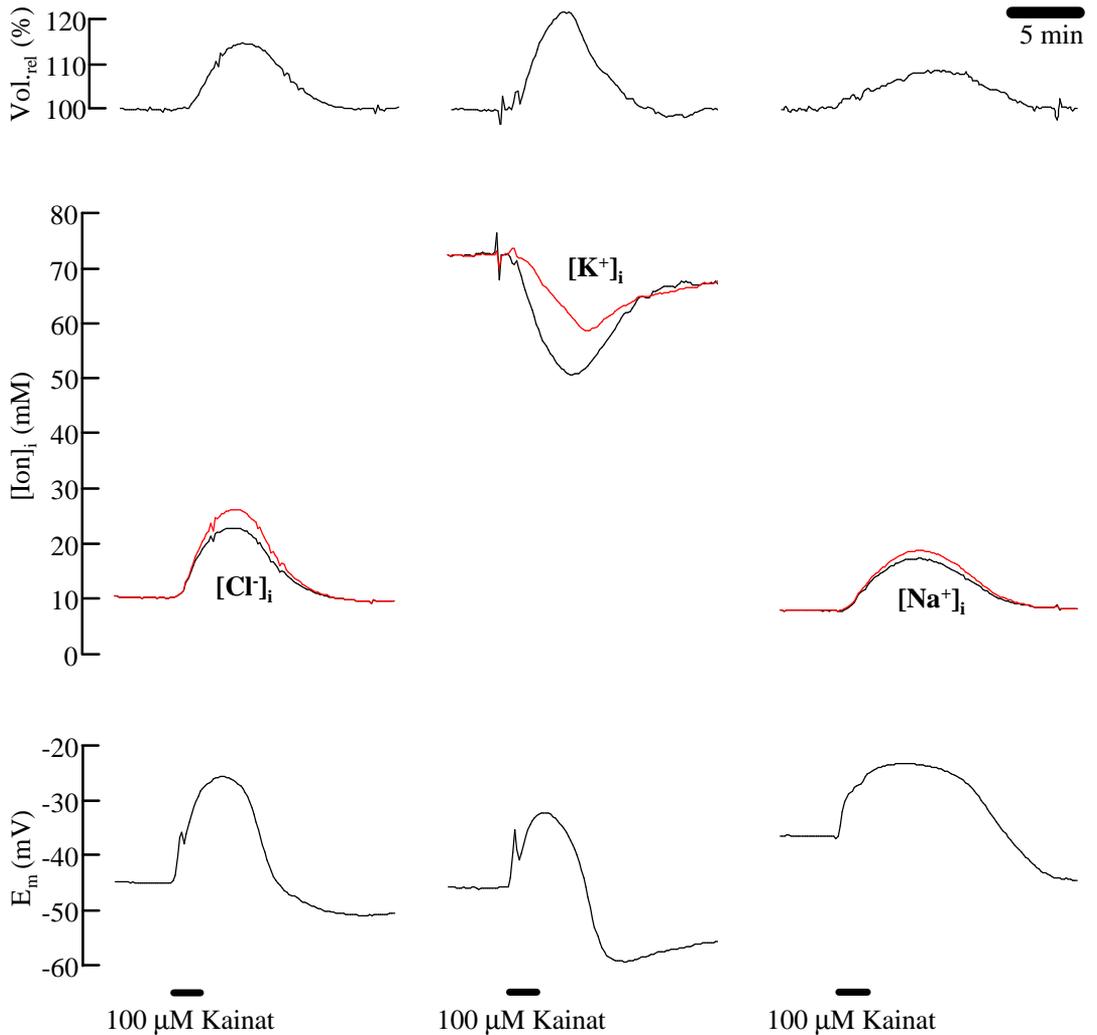
**Abb. 15:** 5-HT-induzierte Änderungen von  $[\text{Ion}]_i$  bei P-Neuronen.

Die unkorrigierten Werte ergaben eine NaCl-Aufnahme, die etwa doppelt so groß war, wie der  $\text{K}^+$ -Verlust der Neuronen. Da das Volumen nicht simultan bestimmt werden konnte, erfolgte die Korrektur der  $\Delta[\text{Ion}]_i$ -Werte um die Volumenänderung nur näherungsweise mit Hilfe einer aus 5 Volumenmessungen gemittelten Spur, deren maximale Änderung 39 % betrug. Die Zeitverläufe zwischen verschiedenen Neuronen variierten jedoch, daher weicht dieser Wert leicht von dem im Ergebnisteil beschriebenen maximalen  $\Delta\text{Vol}$ -Wert ab. Durch die Korrektur wird in der Bilanz deutlich, dass die Osmolyt-Nettoaufnahme in den Messungen um ca. 50 % unterschätzt wurde. Das Verhältnis der aufgenommenen Anionen (■) zu den aufgenommenen Kationen (□) änderte sich durch die Volumenkorrektur nur geringfügig.



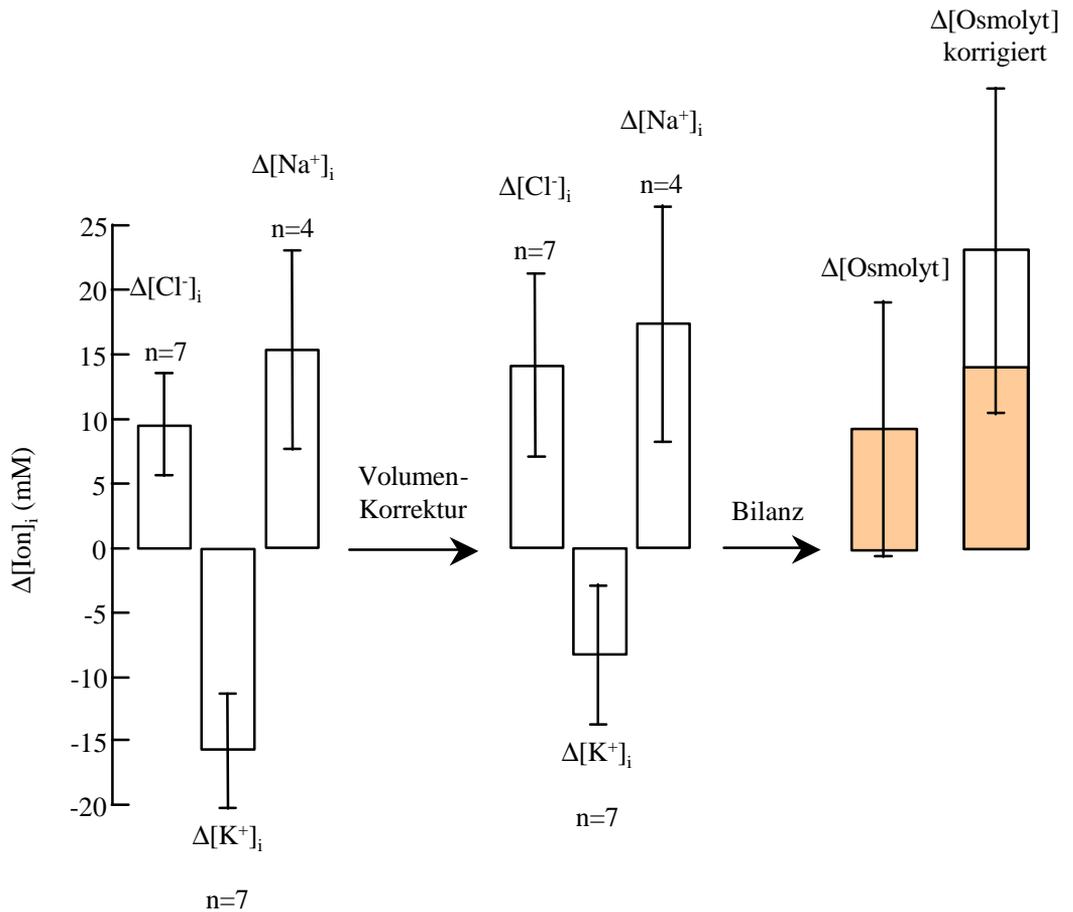
**Abb. 16:** Registrierbeispiele der Wirkung glutamaterger Agonisten auf das Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  von Retzius-Neuronen.

Der physiologische Agonist Glutamat übte im Vergleich zu AMPA und Willardiine (Agonisten für AMPA-Rezeptoren) eine geringe Wirkung auf  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  aus. Das Zellvolumen blieb durch Glutamat unbeeinflusst, während AMPA und Willardiine eine Volumenzunahme verursachten. SYM 2081 (Agonist für Kainat-Rezeptoren) übte auf die gemessenen Parameter nur eine geringe Wirkung aus. Die größte Wirkung auf das Zellvolumen sowie auf  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  hatte Kainat, ein Agonist für Rezeptoren des AMPA- und des Kainat-Typs. Die rote Linie gibt die um die Volumenänderung korrigierte  $[Cl^-]_i$  wieder.



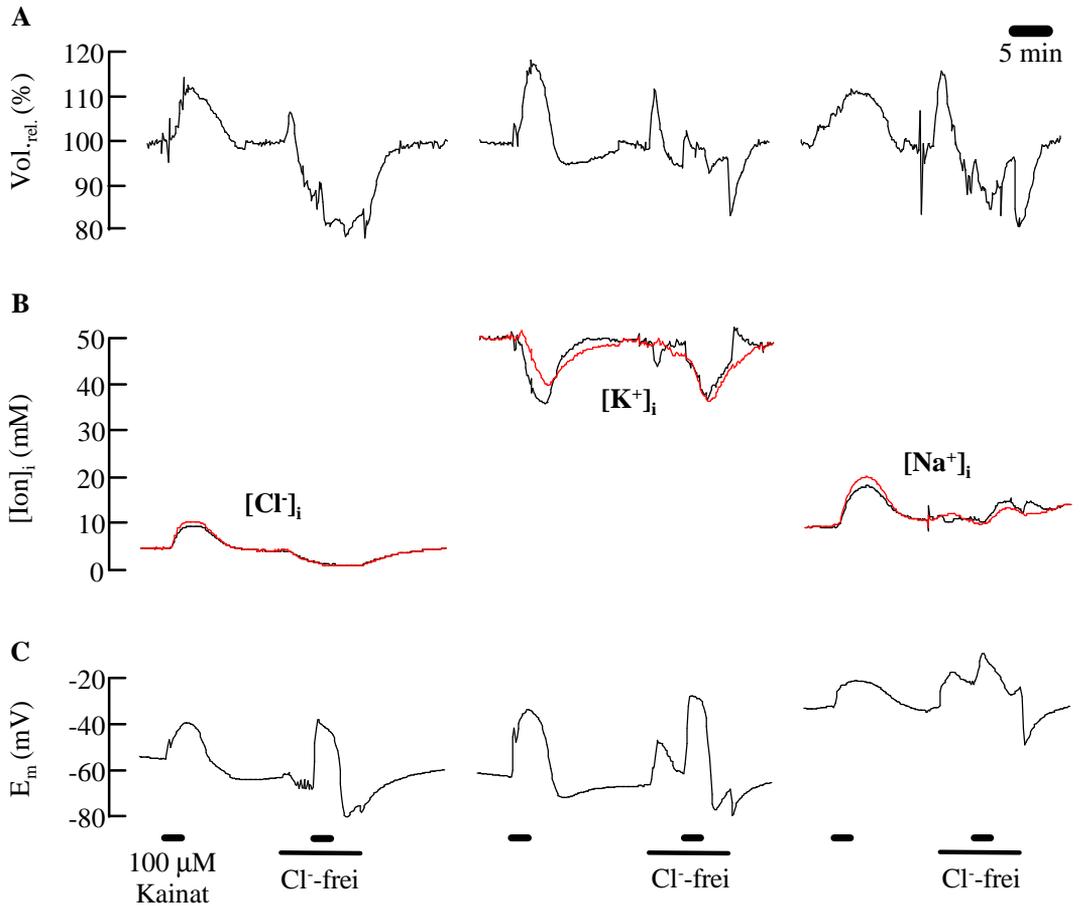
**Abb. 17:** Wirkung von Kainat auf das Zellvolumen,  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$ ,  $[\text{Na}^+]_i$  und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen.

Registrierbeispiele von drei verschiedenen Zellen, bei denen mit Hilfe von Dreikanal-Mikroelektroden, simultan zu Volumen und  $E_m$ , entweder  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$ , oder  $[\text{Na}^+]_i$  mitbestimmt wurde. Die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Kainat löste eine Zellschwellung und eine deutliche Membrandepolarisation aus. Weiterhin konnte ein  $[\text{Cl}^-]_i$ - und ein  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg sowie eine  $[\text{K}^+]_i$ -Abnahme beobachtet werden. Die roten Linien geben die Änderungen von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , und  $\text{Na}^+$  nach der Volumen-Korrektur, also unter Annahme eines konstanten Zellvolumens wider.



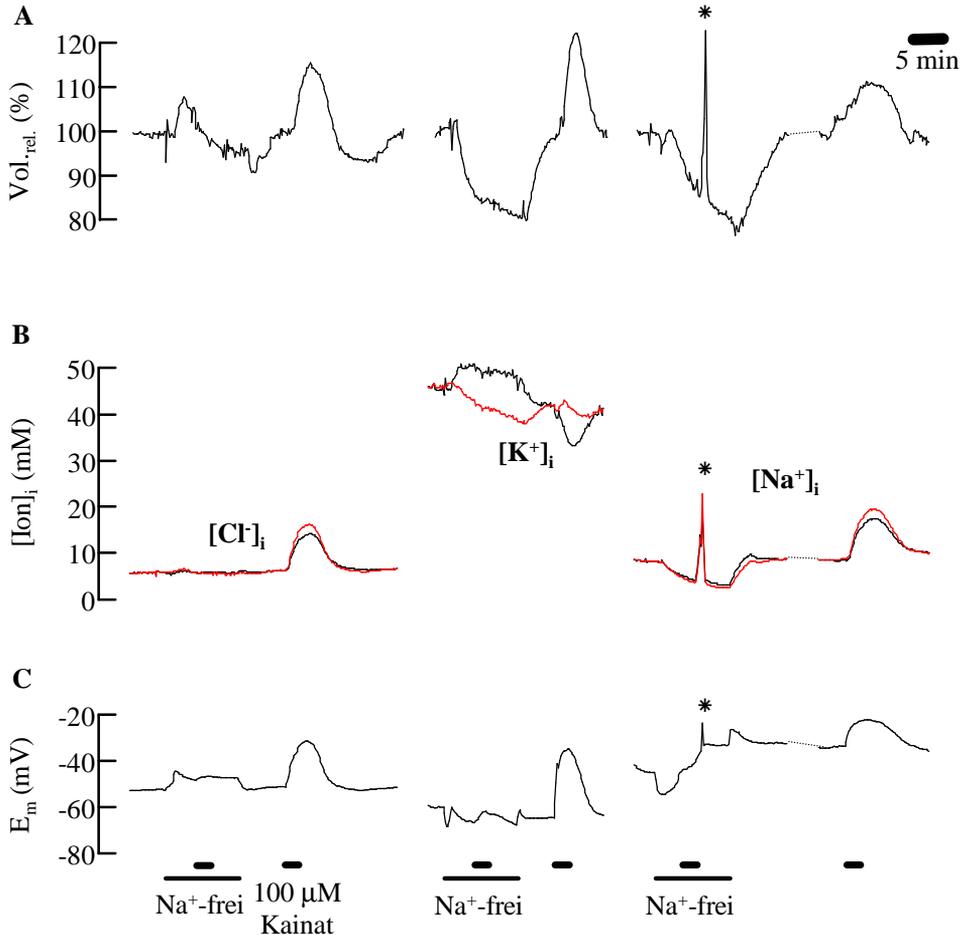
**Abb. 18:** Kainat-induzierte Änderungen der  $[\text{Ion}]_i$  bei Retzius-Neuronen.

Bei der Auswertung wurden nur die Messungen berücksichtigt bei denen das relative Zellvolumen simultan mitbestimmt wurde. Die unkorrigierten  $\Delta[\text{Ion}]_i$ -Werte ergaben einen  $[\text{K}^+]_i$ -Abfall, der in etwa dem  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg entsprach. Die Netto-Aufnahme von Osmolyten entspricht somit dem  $[\text{Cl}^-]_i$ -Anstieg. Die Volumen-Korrektur der  $\Delta[\text{Ion}]_i$ -Werte ergab einen deutlich kleineren  $[\text{K}^+]_i$ -Abfall, wohingegen sowohl der  $[\text{Cl}^-]_i$ -als auch der  $[\text{Na}^+]_i$ -Anstieg vergrößert waren. Die Summe der Mittelwerte von  $\Delta[\text{Ion}]_i$  ergibt die Netto-Aufnahme von Osmolyten, die im Vergleich zu den unkorrigierten Werten mehr als doppelt so hoch ist. Weiterhin erfolgt die Aufnahme von Osmolyten nach der Volumen-Korrektur annähernd durch gleiche Mengen an Kationen ( $\square$ ) und Anionen ( $\blacksquare$ ), wodurch eine elektroneutrale Aufnahme angezeigt wird.



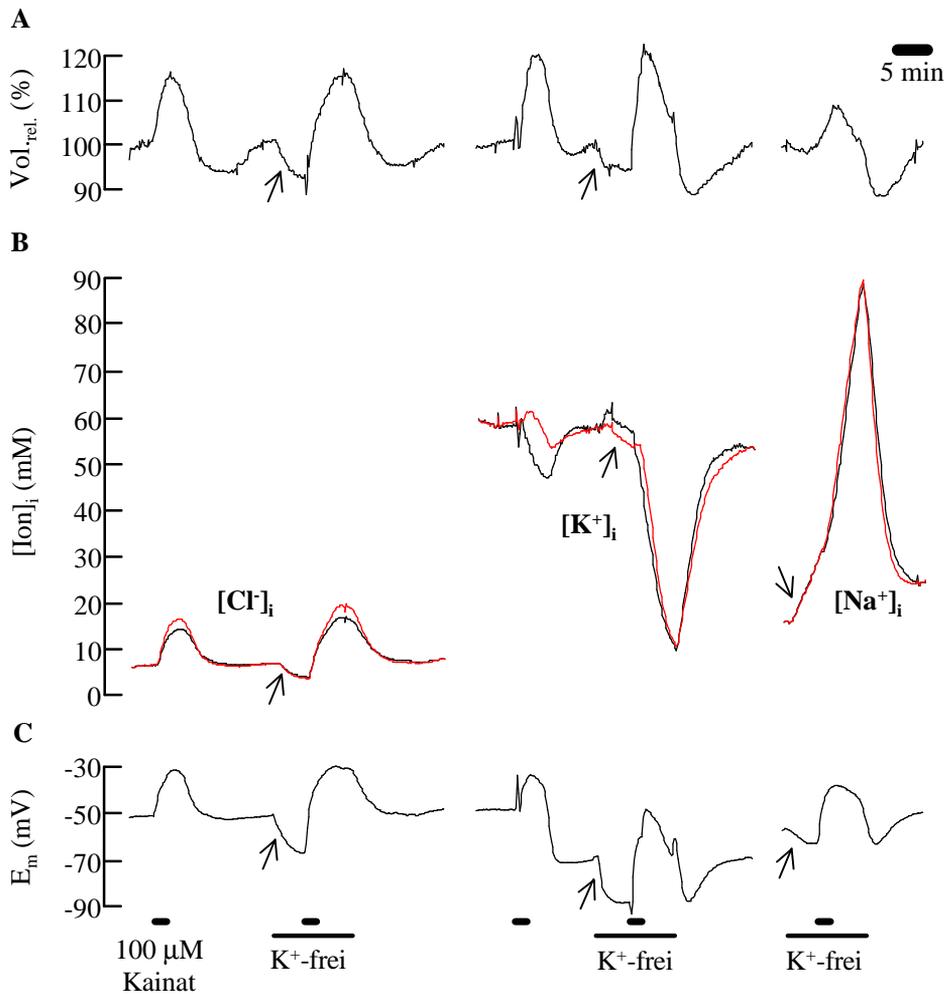
**Abb. 19:** Wirkung von Kainat in NSL und Cl-freier Lösung auf das Zellvolumen (A),  $[Cl^-]_i$ ,  $[K^+]_i$  und  $[Na^+]_i$  (B) sowie auf  $E_m$  (C) bei Retzius-Neuronen.

Die Messungen wurden mit Hilfe von Dreikanal-Mikroelektroden an drei verschiedenen Neuronen durchgeführt. Im Gegensatz zur Kontrolle in NSL löste Kainat in Cl-freier Lösung keine Zellschwellung aus. Bei einigen Zellen führte der Entzug des extrazellulären  $Cl^-$  zu einer Volumenabnahme. Der Kainat-induzierte  $[Na^+]_i$ -Anstieg war in Cl-freier Lösung verringert. Die um die Volumenänderung korrigierten Konzentrationsänderungen (rote Linien) wichen erwartungsgemäß nur unter Kontrollbedingungen von den gemessenen Werten ab. Die Kainat-induzierte Depolarisation blieb in Cl-freier Lösung erhalten.



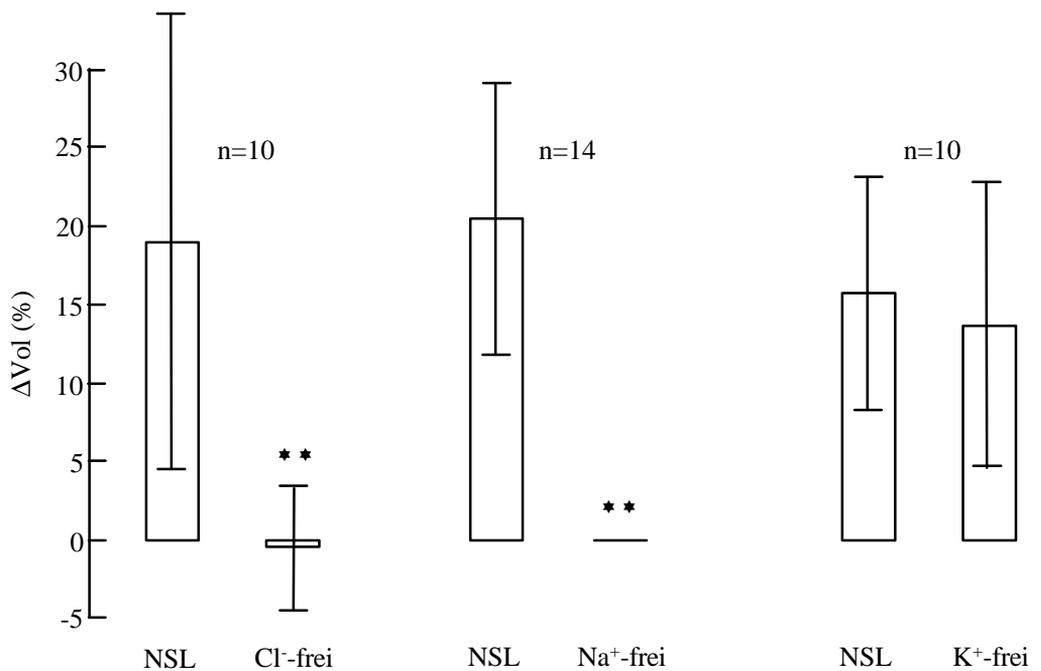
**Abb. 20:** Wirkung von Kainat in NSL und Na<sup>+</sup>-freier Lösung auf Zellvolumen (A), [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> (B) sowie auf E<sub>m</sub> (C) bei Retzius-Neuronen.

Die Messungen wurden mit Hilfe von Dreikanal-Mikroelektroden an drei verschiedenen Neuronen durchgeführt. Die Na<sup>+</sup>-freie Lösung verursachte eine Zellschrumpfung. Die Kainat-induzierte Zellschwellung war unter diesen Bedingungen unterdrückt. Während [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> in Na<sup>+</sup>-freier Lösung, auch während der Kainat-Applikation unverändert blieb, stieg [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> um ca. 5 mM an. Die roten Linien zeigen die um die Volumenänderung korrigierten Konzentrationsänderungen. Weder für [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> noch für [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> unterschieden sich beide Spuren unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen. Für [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> ergibt die Volumen-Korrektur einen leichten Abfall. Die Kainat-induzierte Depolarisation blieb in Na<sup>+</sup>-freier Lösung aus. Die unterbrochene Linie steht für eine TMA<sup>+</sup>-Beladung zwischen den Experimenten (12 min 5 mM TMA<sup>+</sup>, 3 min NSL). Die mit \* gekennzeichneten Potentialverschiebungen sind Artefakte.



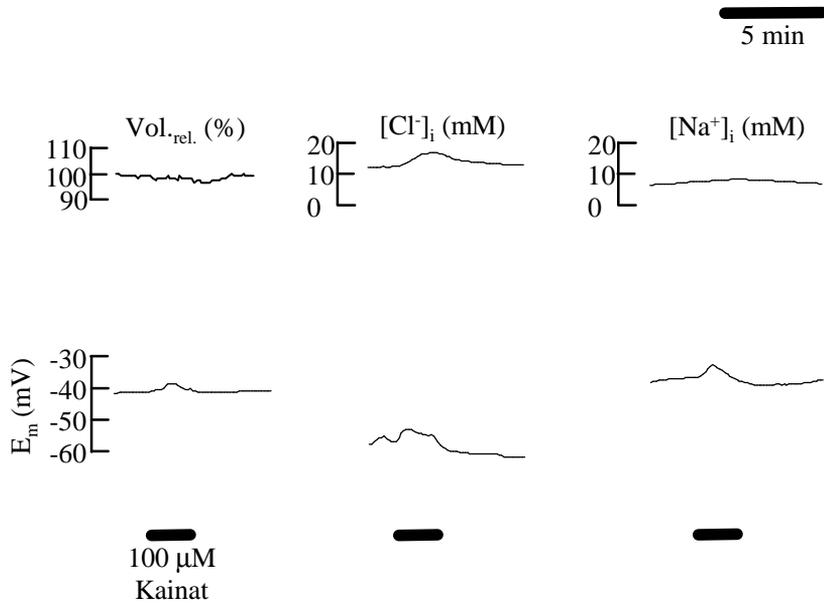
**Abb. 21:** Wirkung von Kainat in NSL und K<sup>+</sup>-freier Lösung auf das Zellvolumen (A), [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> (B) sowie E<sub>m</sub> (C) bei Retzius-Neuronen.

Die Messungen wurden mit Hilfe von Dreikanal-Mikroelektroden an drei verschiedenen Zellen durchgeführt. Die durch Kainat verursachte Zellschwellung und der [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg blieben in K<sup>+</sup>-freier Lösung erhalten, ebenso die Depolarisation. Der Kainat-induzierte [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abfall war ebenso wie der [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg in K<sup>+</sup>-freier Lösung drastisch verstärkt. Der Entzug des extrazellulären K<sup>+</sup> selbst führte meist zur Schrumpfung, zur [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>- und [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Abnahme, zum [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg sowie zur Hyperpolarisation. Diese Effekte sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die roten Linien zeigen die um die Volumenänderung korrigierten Konzentrationsänderungen.



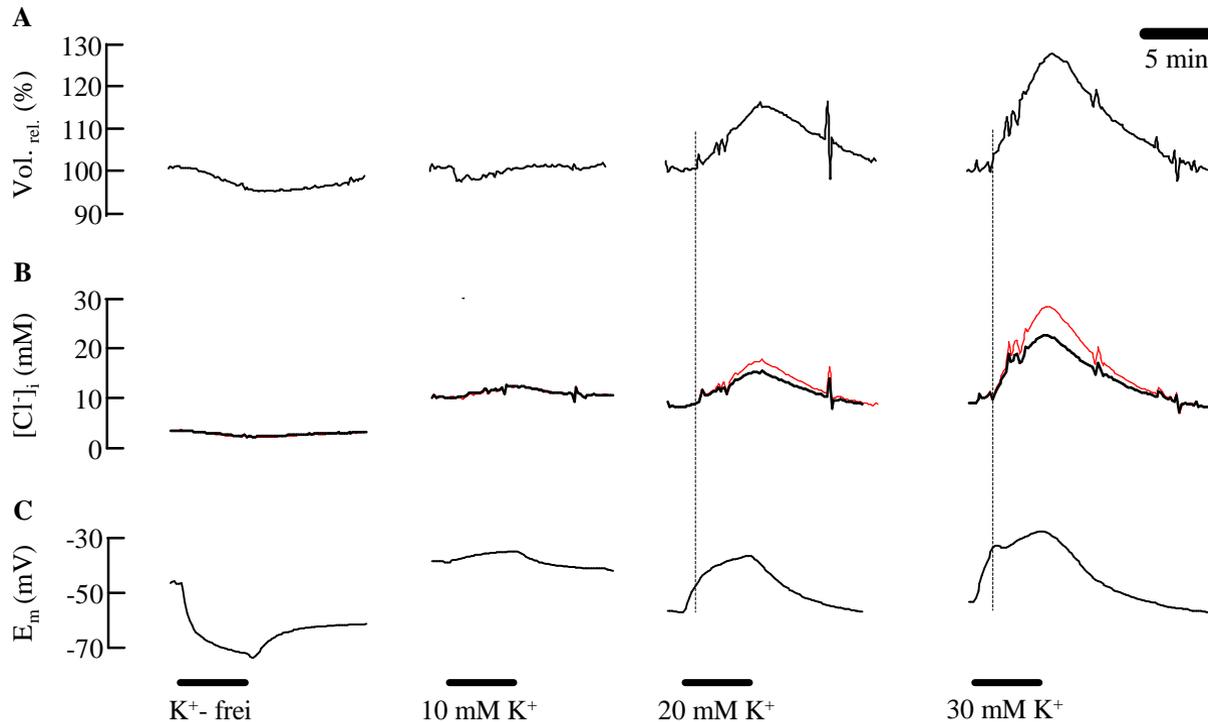
**Abb. 22:** Einfluss des extrazellulären Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> auf die Kainat-induzierte Volumenzunahme bei Retzius-Neuronen.

In Cl<sup>-</sup>- und Na<sup>+</sup>-freier Lösung wurde durch die Applikation von Kainat (100 μM) keine Volumenänderung ausgelöst (\*\* : p < 0,01). In K<sup>+</sup>-freier Lösung war die Kainat-induzierte Volumenzunahme dagegen nicht signifikant verändert.

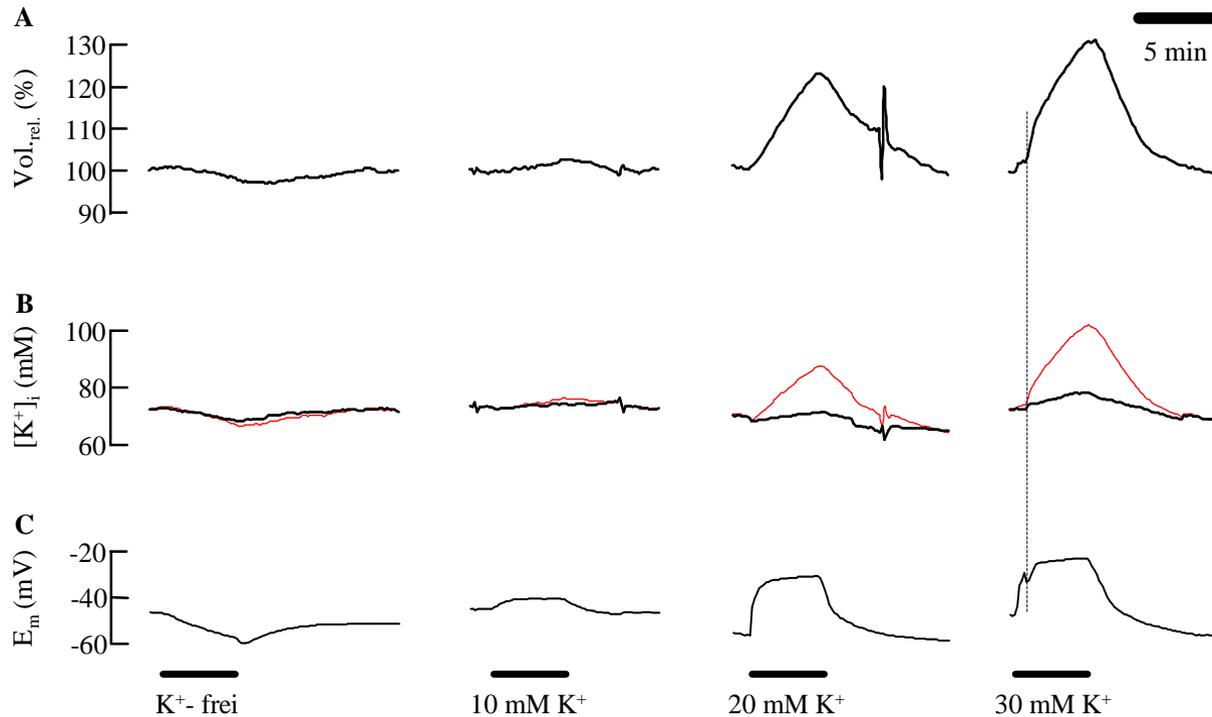


**Abb. 23:** Wirkung von Kainat auf das Zellvolumen,  $[\text{Cl}^-]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  sowie auf  $E_m$  bei P-Neuronen.

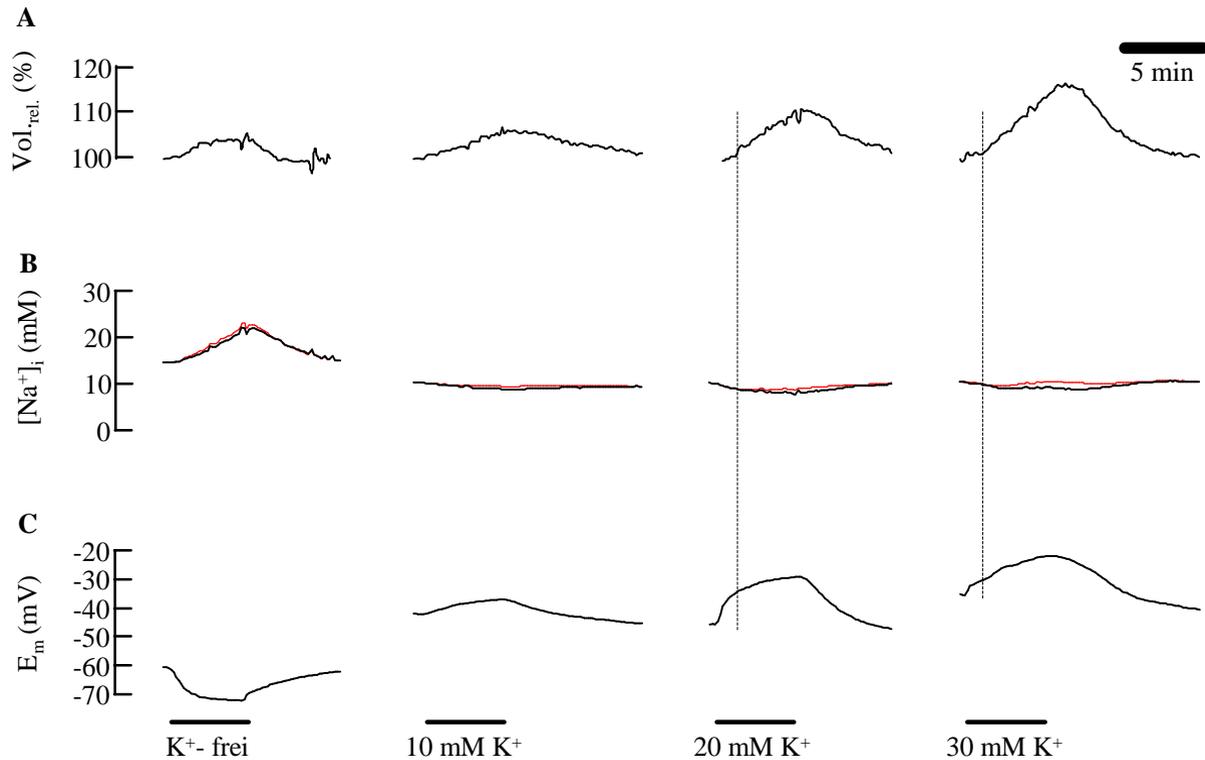
Registrierbeispiele von Zweikanal-Mikroelektroden an drei verschiedenen Zellen. Die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Kainat verursachte eine geringe Depolarisation, jedoch keine Volumenänderung. Die Änderungen von  $[\text{Cl}^-]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  waren sehr viel kleiner als die Kainat-induzierten Änderungen bei Retzius-Neuronen (vgl. Abb. 17).



**Abb 24:** Einfluss veränderter  $[K^+]_a$  auf das Zellvolumen,  $[Cl^-]_i$  und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen. Registrierbeispiele ionensensitiver Dreikanal-Mikroelektroden bei verschiedenen Zellen. In  $K^+$ -freier Lösung trat eine minimale Volumenabnahme auf, ebenso wie ein geringer  $[Cl^-]_i$ -Abfall und eine deutliche Hyperpolarisation. Die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 10 mM induzierte im Mittel eine geringe Zunahme des Zellvolumens sowie einen geringen  $[Cl^-]_i$ -Anstieg und eine leichte Depolarisation. Die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 20 bzw. 30 mM bewirkte eine deutliche Volumenzunahme sowie einen verstärkten  $[Cl^-]_i$ -Anstieg und eine erhöhte Depolarisation. Die roten Linien zeigen  $[Cl^-]_i$  nach der Volumen-Korrektur, d.h. bei Annahme eines konstanten Zellvolumens. Wie die gestrichelten Linien verdeutlichen, erfolgen die Änderungen von Zellvolumen und  $[Cl^-]_i$  gleichzeitig, waren jedoch gegenüber den  $E_m$ -Änderungen verzögert. Für die Wirkung von  $[K^+]_a$  auf Zellvolumen und  $E_m$  vgl. auch Abb. 25 und 26.

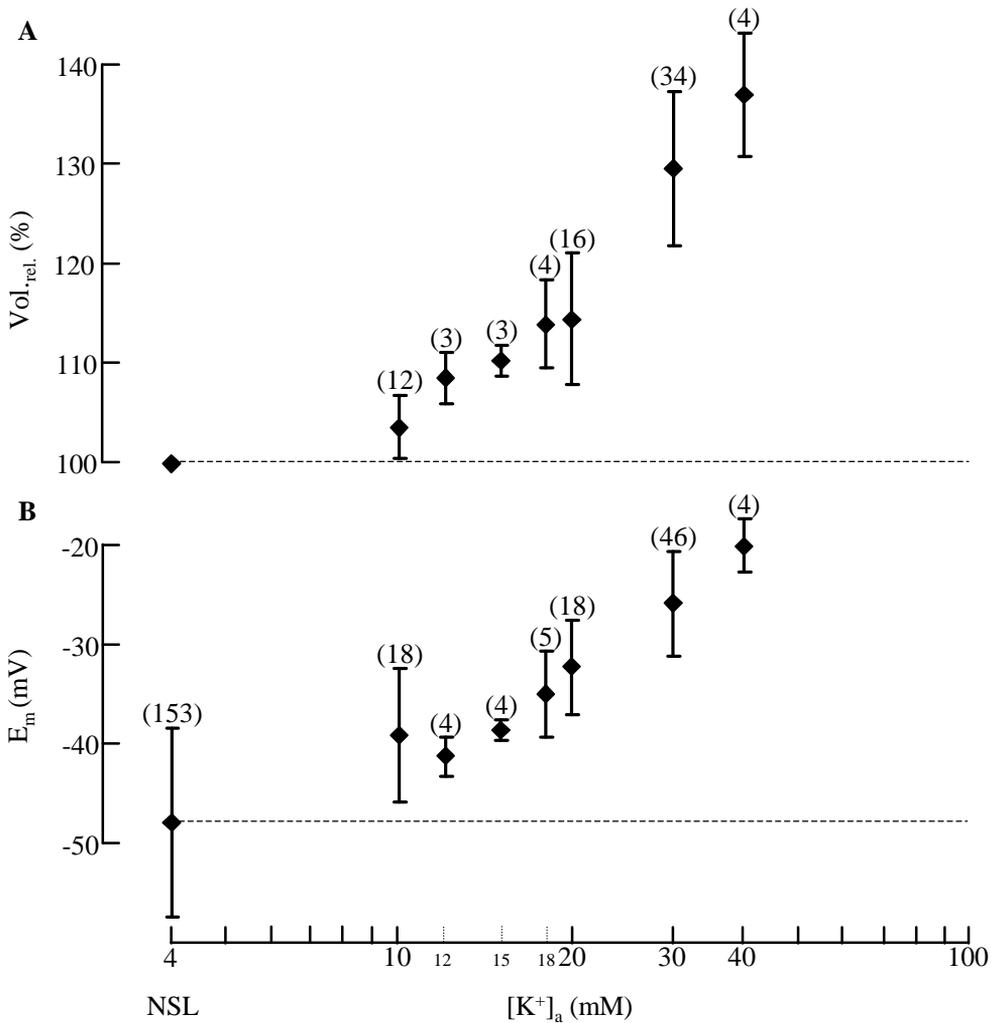


**Abb. 25:** Einfluss veränderter  $[K^+]_a$  auf das Zellvolumen,  $[K^+]_i$  und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen. Die Veränderung von  $[K^+]_a$  beeinflusste  $[K^+]_i$  nur geringfügig. Wie die um die Volumenzunahme korrigierten Spuren jedoch zeigen (rote Linien), löste die Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 20 und 30 mM eine  $K^+$ -Aufnahme aus. Zur Wirkung von  $[K^+]_a$  auf das Zellvolumen und  $E_m$  siehe Abb. 24. Die Änderungen von Zellvolumen und  $[K^+]_i$  erfolgten gleichzeitig, waren verglichen mit den  $E_m$ -Änderungen deutlich langsamer und etwas verzögert.



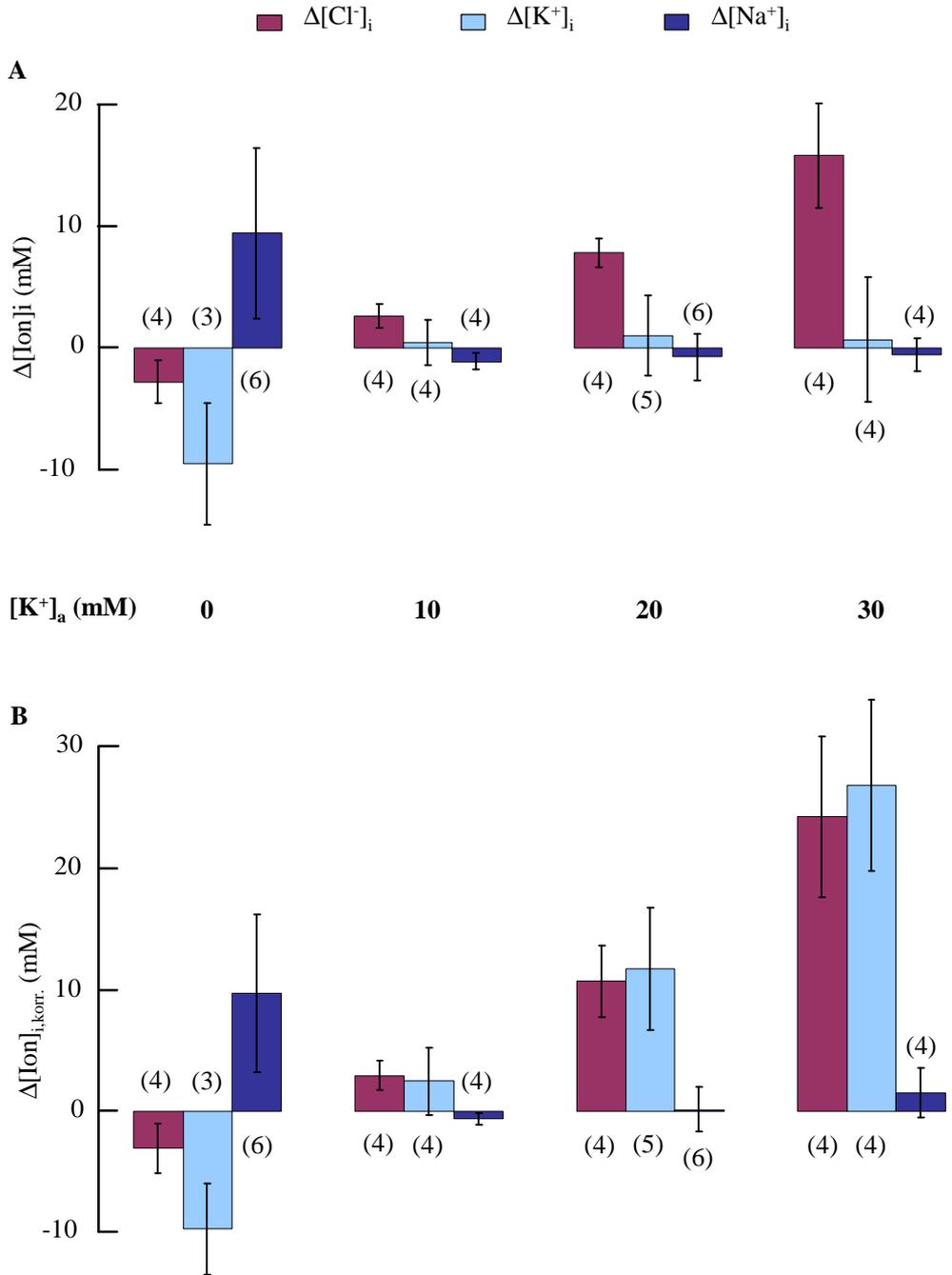
**Abb. 26:** Einfluss veränderter  $[K^+]_a$  auf Zellvolumen,  $[Na^+]_i$  und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen.

Der Entzug des extrazellulären  $K^+$  induzierte einen  $[Na^+]_i$ -Anstieg, während die Erhöhung von  $[K^+]_a$  zu einer minimalen  $[Na^+]_i$ -Abnahme führte. Wie die um die Volumenzunahme korrigierten Spuren zeigen (rote Linien), war diese Abnahme überwiegend durch die  $K^+$ -induzierte Zellschwellung bedingt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen, dass die  $K^+$ -induzierte Volumenzunahme gegenüber der Depolarisation verzögert einsetzte.



**Abb. 27:** Abhängigkeit von Zellvolumen (A) und E<sub>m</sub> (B) von der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration bei Retzius Neuronen.

Die Erhöhung von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> bewirkte eine Depolarisation sowie eine Volumenzunahme. Mit zunehmender Erhöhung von [K<sup>+</sup>]<sub>a</sub> wurden sowohl die Zellschwellung als auch die Membrandepolarisation verstärkt.



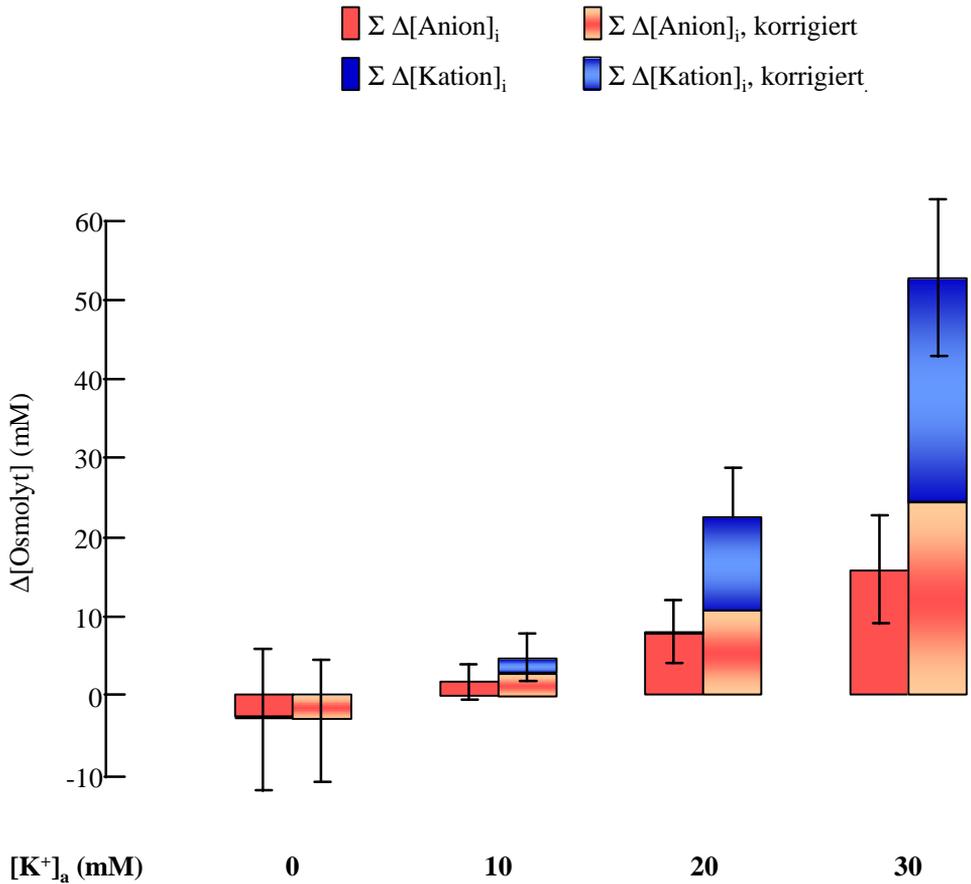
**Abb. 28:** Einfluss veränderter  $[\text{K}^+]_a$  auf die intrazellulären Konzentrationen von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  bei Retzius-Neuronen.

Für diese Darstellung wurden nur die Messungen berücksichtigt, bei denen simultan mit  $[\text{Cl}^-]_i$ ,  $[\text{K}^+]_i$  oder  $[\text{Na}^+]_i$  auch die Volumenänderung mitbestimmt wurde.

A)  $\text{K}^+$ -induzierte Änderungen von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  ohne Volumen-Korrektur

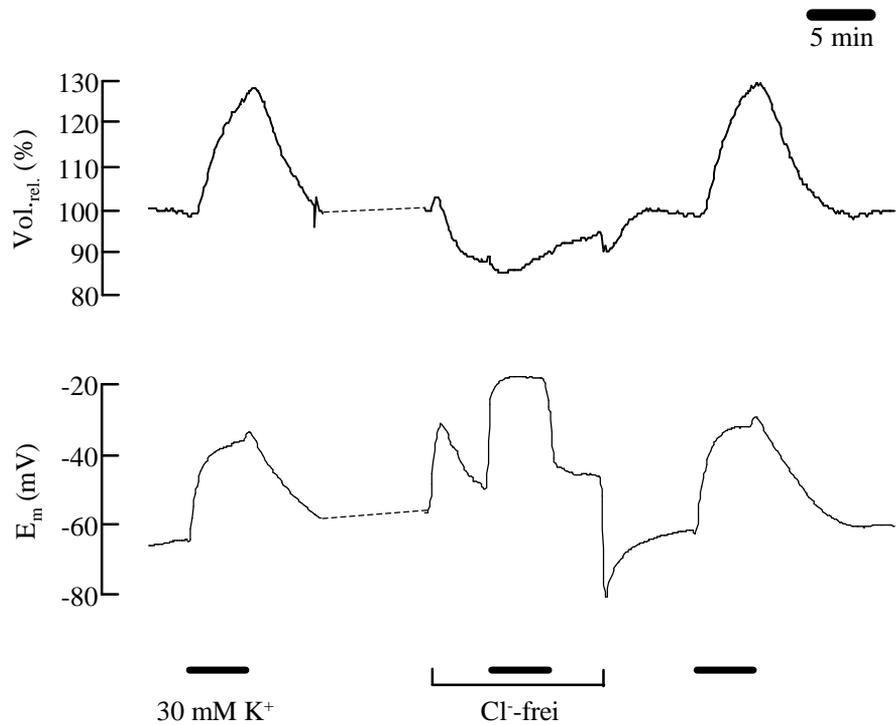
B)  $\text{K}^+$ -induzierte Änderungen von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  nach der Volumen-Korrektur.

Die hier dargestellten Daten sind auch in Tabelle 14 zusammengefasst.

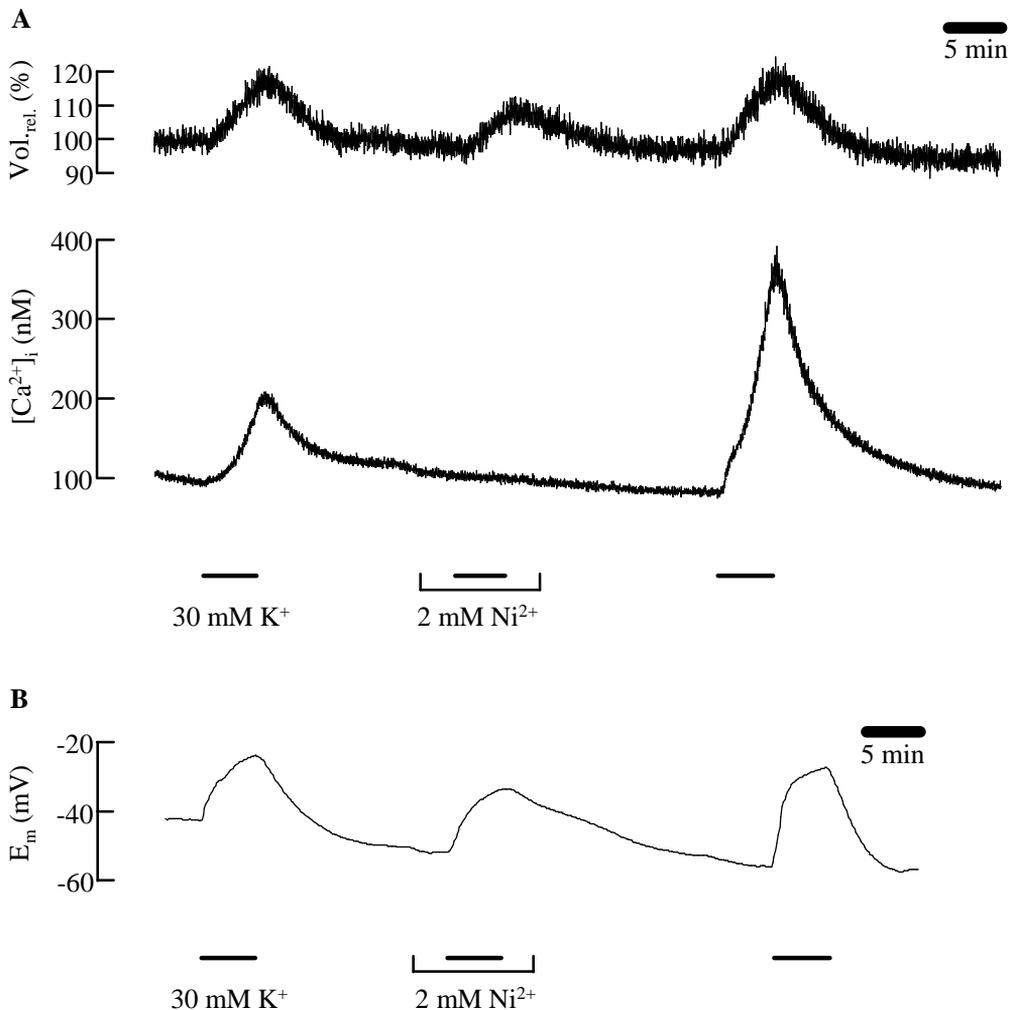


**Abb. 29:** Bilanz der  $K^+$ -induzierten Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen bei Retzius-Neuronen.

Bei Erhöhung von  $[K^+]_a$  stieg die Osmolarität des Cytosols geringfügig an, um ca. 15 mM bei  $[K^+]_a = 30$  mM, wie die Bilanzierung der gemessenen Konzentrationsänderungen ohne Volumen-Korrektur zeigt. Nach dieser Bilanz entstände der Zuwachs der cytosolischen Osmolarität ausschließlich durch die Aufnahme von Anionen. Die Summierung der um die Volumenänderung korrigierten Konzentrationsänderungen zeigt jedoch, dass tatsächlich Anionen und Kationen gleichermaßen aufgenommen werden. In  $K^+$ -freier Lösung nahm die cytosolische Osmolarität leicht ab. Die Volumen-Korrektur ergibt eine gleichgroße Osmolyt-Abgabe, die sich ausschließlich aus Anionen zusammensetzt.



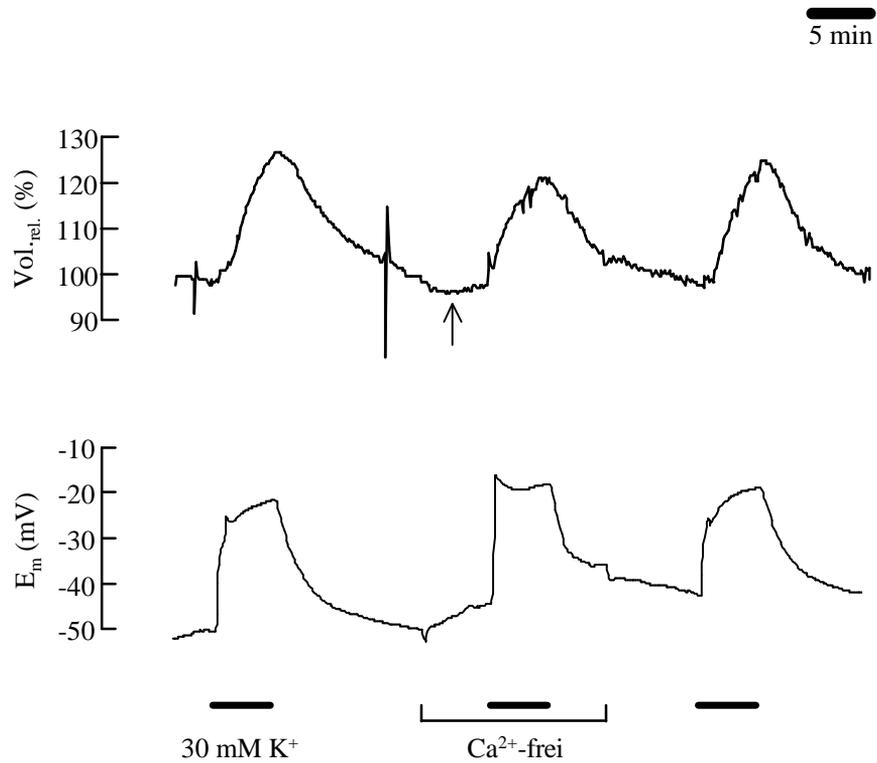
**Abb. 30:** Registrierbeispiel der Wirkung Cl-freier Lösung auf die K<sup>+</sup>-induzierten Änderungen von Volumen und E<sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen. Registrierbeispiel einer ionensensitiven-Zweikanal-Mikroelektrode. In Cl-freier Lösung war die K<sup>+</sup>-induzierte Volumenzunahme unterdrückt. Die K<sup>+</sup>-induzierte Membrandepolarisation erfolgte schneller und erreichte positivere E<sub>m</sub> als in NSL. Der Wechsel in Cl-freie Lösung löste eine transiente Depolarisation und der Rückwechsel in NSL eine transiente Hyperpolarisation aus. Dieses Neuron wurde nach der Vorkontrolle erneut mit TMA<sup>+</sup> beladen (8 min TMA<sup>+</sup>, dann 6 min NSL, unterbrochene Linie).



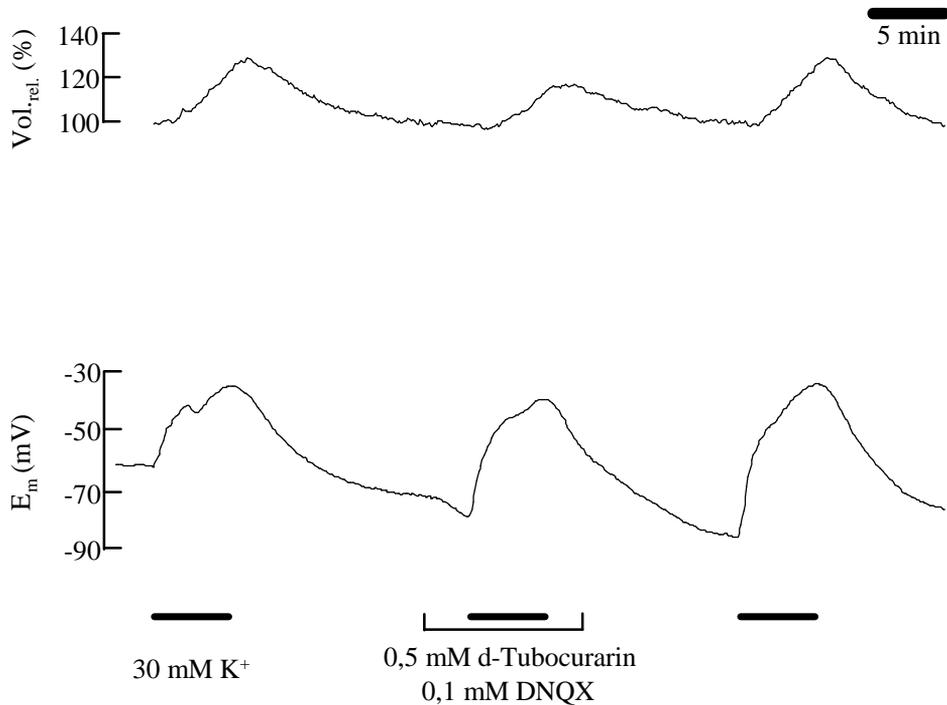
**Abb 31:** Einfluss des Ca<sup>2+</sup>-Kanalblockers Ni<sup>2+</sup> auf die K<sup>+</sup>-induzierten Änderungen von Zellvolumen und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A) sowie von E<sub>m</sub> (B) bei Retzius-Neuronen.

A) Die K<sup>+</sup>-induzierte Volumenzunahme war während der Blockade spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch 2 mM Ni<sup>2+</sup> deutlich reduziert, demgegenüber war der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg vollständig unterdrückt. Zellvolumen und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurden in diesem Experiment mit Hilfe von Fura-2 simultan gemessen.

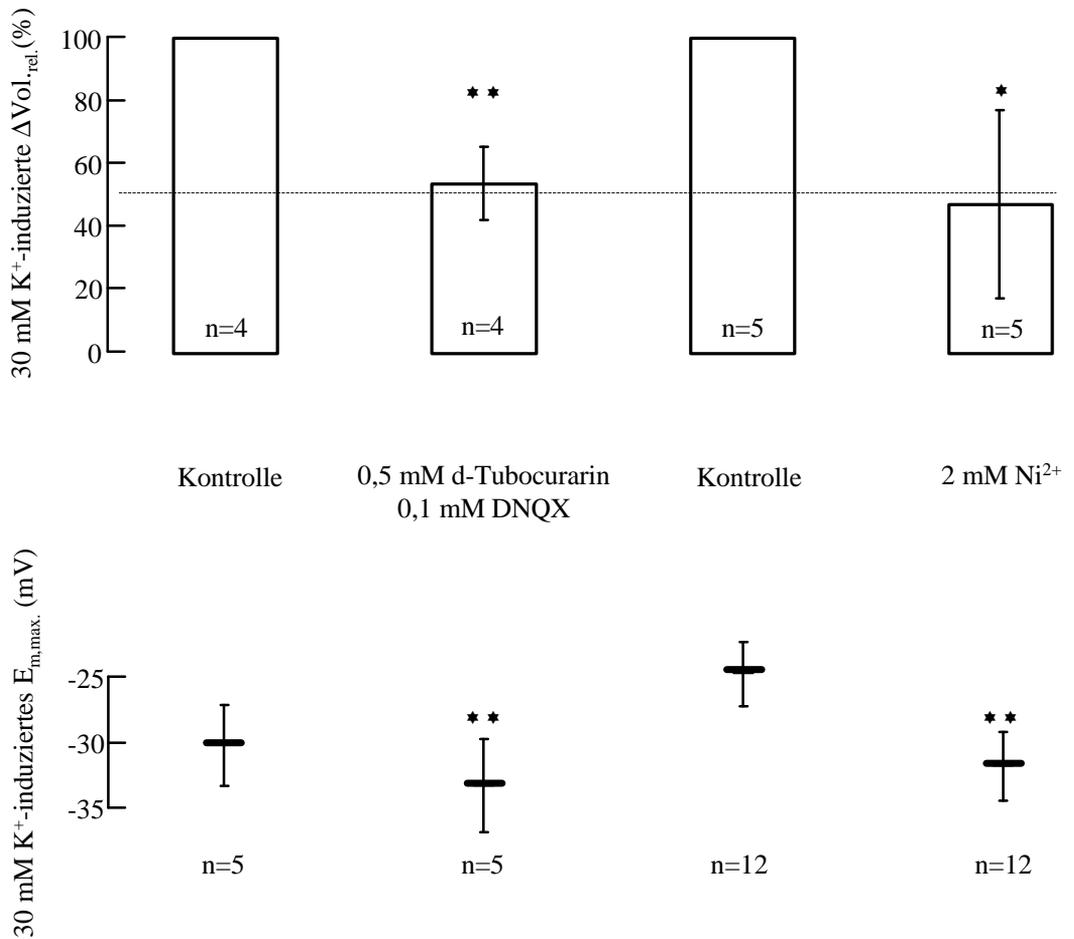
B) In Anwesenheit von 2 mM Ni<sup>2+</sup> war die K<sup>+</sup>-induzierte Depolarisation reduziert. Der Einfluss von Ni<sup>2+</sup> auf die K<sup>+</sup>-induzierten Änderungen des Zellvolumens sowie auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und E<sub>m</sub> war reversibel.



**Abb. 32:** Registrierbeispiel der Wirkung  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung auf die  $\text{K}^+$ -induzierten Änderungen von Volumen und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen. Registrierbeispiel einer ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektrode. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung war die  $\text{K}^+$ -induzierte Volumenzunahme reduziert. Der Pfeil markiert eine geringe Volumenabnahme, die durch den Entzug des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgerufen wurde. Die  $\text{K}^+$ -induzierte Depolarisation erfolgte in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung schneller und erreichte ein positiveres  $E_m$ . Dieses Neuron zeigte nach Entfernen des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  keine Membranoszillationen (vgl. Abb. 33).

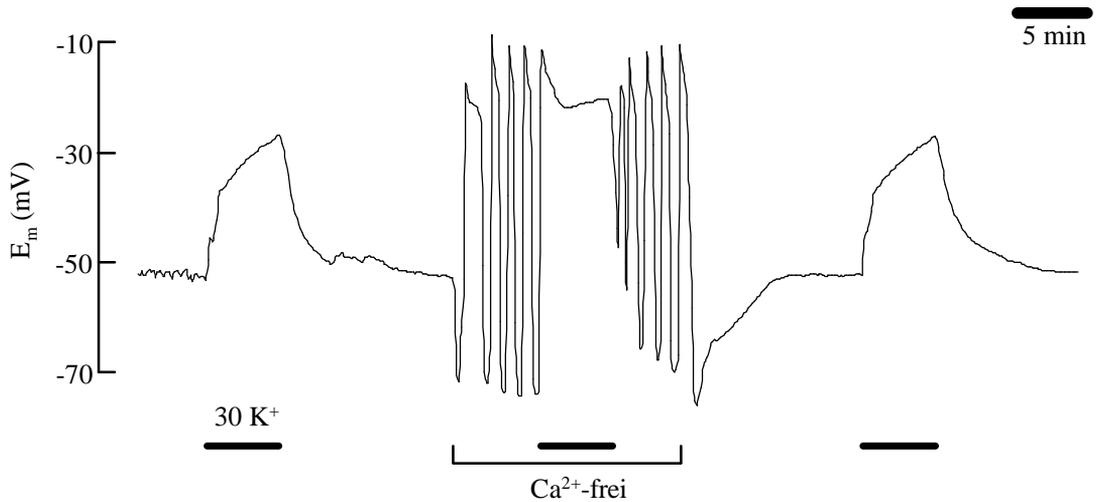


**Abb. 34:** Wirkung von d-Tubocurarin und DNQX auf die K<sup>+</sup>-induzierten Änderungen von Zellvolumen und E<sub>m</sub> bei Retzius-Neuronen. Registrierbeispiel einer ionensensitiven Zweikanal-Mikroelektrode. In Gegenwart von Antagonisten des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors und Glutamat-Rezeptors vom nonNMDA-Typ war die K<sup>+</sup>-induzierte Volumenzunahme reversibel verkleinert. Die Depolarisation war unter diesen Bedingungen ebenfalls reversibel reduziert.



**Abb. 35:** Einfluss von d-Tubocurarin und DNQX sowie von  $Ni^{2+}$  auf die  $K^+$ -induzierten Änderungen von Zellvolumen und  $E_m$  bei Retzius-Neuronen.

In Gegenwart der Rezeptor-Antagonisten DNQX und d-Tubocurarin war die  $K^+$ -induzierte Volumenzunahme teilweise unterdrückt und die  $K^+$ -induzierte Depolarisation erreichte ein weniger positives  $E_m$ . Beide Effekte waren hochsignifikant. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung von Neurotransmitter-Rezeptoren an der  $K^+$ -induzierten Volumenzunahme und Depolarisation hin. Die Blockade des  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch  $Ni^{2+}$  führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der  $K^+$ -induzierten Volumenzunahme sowie zu einem weniger positiven  $E_m$  während der  $K^+$ -induzierten Depolarisation. Dieses Ergebnis lässt eine Beteiligung von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen an den  $K^+$ -induzierten Änderungen von Zellvolumen und  $E_m$  vermuten (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ).



**Abb. 33:** Registrierbeispiel der  $E_m$ -Oszillationen in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung bei Retzius-Neuronen. Einige Neuronen reagierten auf die Entfernung des extrazellulären  $Ca^{2+}$  mit starken  $E_m$ -Oszillationen, die bei Erhöhung von  $[K^+]_a$  auf 30 mM unterdrückt waren. Die  $K^+$ -induzierte Depolarisation erfolgte in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung schneller und war größer als in den Kontrollmessungen mit NSL (vgl. Abb. 32).

## **Erklärung**

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

Düsseldorf, den 09. Januar 2003

Nicola Susanne Trosiner

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W.-R. Schlue, möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und vor allem für seine Unterstützung sowie seine wertvollen Anregungen zu dieser Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. W. Dierkes, der mich mit vielen hilfreichen Ratschlägen unterstützt hat, und mir in allen Phasen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn H. J. Wüsten möchte ich für seine tatkräftige Unterstützung bei den mikrofluorimetrischen Messungen danken. Frau S. Durry und Frau C. Roderigo danke ich für die Präparation der Ganglien und für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Herrn Dr. E. von Berg für die Erstellung des Programms zur Datenerfassung, das die Auswertung der Daten erheblich erleichterte.

Frau Dr. D. Günzel und Herrn Dr. P. Hochstrate möchte ich für ihre stetige Diskussionsbereitschaft und für ihre kritischen Anmerkungen zu dieser Arbeit danken. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung, die mir während meiner Anwesenheit im Institut zuteil wurde.

Diese Arbeit wurde unterstützt aus Mitteln des Ministeriums für Schule und Weiterbildung, Wissenschaft und Forschung, des Landes Nordrhein-Westfalen im Rahmen des Projekts „Elektrochemische Mikro- und Nanosysteme“.