

**Beeinflussung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bei
Blutegel-Neuronen durch extrazelluläre Osmolarität,
pH-Wert und Ca^{2+} -Konzentration**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Verena Wende

aus Wuppertal

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. W.-R. Schlue

Koreferent: Prof. Dr. K. Lunau

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Versuchstiere und Präparation	10
2.1.1 Der medizinische Blutegel <i>Hirudo medicinalis</i>	10
2.1.2 Aufbau des Zentralnervensystems des Blutegels	10
2.1.3 Präparation	12
2.2 Identifizierung der Neuronen	13
2.3 Messung der (freien) cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2	15
2.3.1 Eichung der Fura-2-Fluoreszenz	17
2.3.2 Messung des Zellvolumens mit Fura-2	18
2.4 Farbstoffinjektion	19
2.5 Mikrofluorimeter und Mikroskop	20
2.6 Konfokale Laserscan-Mikroskopie	23
2.7 Elektrophysiologische Untersuchungen	24
2.8 Ernährung der Versuchstiere	25
2.9 Versuchslösungen, Fluoreszenzfarbstoffe und Pharmaka	25
2.9.1 Herstellung der Versuchslösungen	25
2.9.2 Fluoreszenzfarbstoffe	26
2.9.3 Pharmaka	27
2.10 Auswertung der Daten	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Nahrungsaufnahme des medizinischen Blutegels	28
3.2 Einfluss der Farbstoffinjektion auf elektrophysiologische Parameter	29
3.3 Messprotokolle	31
3.4 K^{+} -induzierte Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter isotonen Bedingungen	31
3.4.1 Einfluss von Fura-2 auf die cytosolische Ca^{2+} -Pufferkapazität	31

3.4.2	K ⁺ -induzierte Änderungen von [Ca ²⁺] _i	33
3.4.3	K ⁺ -induzierte Volumenänderungen	34
3.4.4	K ⁺ -induzierte E _m -Änderungen	35
3.5	Pharmakologische Eigenschaften der spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle	36
3.5.1	Wirkung der L-Typ Antagonisten Diltiazem und Verapamil	36
3.5.2	Wirkung des L-Typ Agonisten Bay K 8644	38
3.5.3	Lokalisierung der spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle	39
3.6	Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf die K ⁺ -induzierten Änderungen von [Ca ²⁺] _i , E _m und Zellvolumen	39
3.6.1	[Ca ²⁺] _i und E _m bei Retzius, P, N, AP	40
3.6.2	Zellvolumen von Retzius-Neuronen	41
3.7	Einfluss von pH _a und [Ca ²⁺] _a auf die spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle	44
3.7.1	Einfluss des pH _a auf die K ⁺ -induzierten Änderungen von [Ca ²⁺] _i und E _m bei Retzius- und P-Neuronen	44
3.7.2	Einfluss von [Ca ²⁺] _a auf die K ⁺ -induzierten Änderungen von [Ca ²⁺] _i und E _m	45
3.8	Zusammenhang zwischen transientem Charakter und Amplitude des K ⁺ -induzierten [Ca ²⁺] _i -Anstiegs	47
3.9	Zusammenhang zwischen [Ca ²⁺] _i und E _m bei Retzius- und P-Neuronen bei Veränderung von Osmolarität, pH _a oder [Ca ²⁺] _a	47
4.	Diskussion	49
4.1	Eigenschaften spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanäle	49
4.1.1	Wirkung von L-Typ Antagonisten	51
4.1.2	Wirkung des L-Typ Agonisten Bay K 8644	52
4.2	Einfluss veränderter extrazellulärer Bedingungen auf die Aktivität der spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle	52
4.3	Abhängigkeit des K ⁺ -induzierten [Ca ²⁺] _i -Anstiegs von E _m	55
4.4	Abhängigkeit des E _m vom extrazellulären pH	57
4.5	Einfluss von [K ⁺] _a und Osmolarität auf das Zellvolumen	58
4.6	Schlussbetrachtung	59

5.	Zusammenfassung	61
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Abbildungen	83

1. Einleitung

Das Cytoplasma tierischer Zellen wird durch eine Plasmamembran von seiner Umgebung abgegrenzt. Die Plasmamembran, eine Lipid-Doppelschicht mit integralen und peripheren Proteinen sowie kovalent an Proteine und Lipide gebundenen Kohlenhydraten, besitzt eine dynamische Struktur (Singer & Nicolson 1972). Die Plasmamembran ist semipermeabel, d.h. sie bildet eine Permeationsschranke für viele gelöste Stoffe (anorganische Ionen, Aminosäuren, Nukleinsäuren), besitzt jedoch eine hohe Permeabilität für Wasser. Der Transport von Wasser über die Plasmamembran hängt weitgehend vom osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum ab (Lang et al. 1998). Die Permeabilität der Plasmamembran für Wasser kann durch Einlagerung von speziellen Wasserkanälen, den Aquaporinen, erhöht werden (Murata et al. 2000).

Transportmechanismen in der Plasmamembran

Die ionale Zusammensetzung und die Osmolarität des Intrazellulärraums werden durch verschiedene Transportmechanismen aufrechterhalten, die sich in aktiven, sekundär aktiven und passiven Transport einteilen lassen. Aktive Transportsysteme sorgen unter ATP-Verbrauch für eine ungleiche Verteilung verschiedener anorganischer Ionen. Eines der wichtigsten dieser Systeme ist die Na^+/K^+ -Pumpe, die unter ATP-Verbrauch 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und 2 K^+ -Ionen in die Zelle transportiert und dadurch die elektrochemischen Gradienten für Na^+ und K^+ aufrecht erhält. Die Na^+/K^+ -Pumpe spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (Ruhe- E_m) sowie bei der Kontrolle des Zellvolumens unter isotonen Bedingungen (Lang et al. 1998). Als weitere wichtige aktive Transportsysteme sind die Ca^{2+} -Pumpen zu nennen. Ca^{2+} -Pumpen in der Plasmamembran (PMCA-Pumpen) transportieren unter Verbrauch eines ATP-Moleküls ein Ca^{2+} -Ion in den Extrazellulärraum und halten so die Konzentration an Ca^{2+} im Intrazellulärraum ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) extrem niedrig (Clark & Carafoli 1983). Zum anderen kommen Ca^{2+} -Pumpen in den Membranen des sarko- bzw. endoplasmatischen

Retikulums vor (SERCA-Pumpen). Sie transportieren unter Verbrauch von einem ATP-Molekül zwei Ca^{2+} -Ionen in das Speicherlumen (Schatzmann 1989).

Sekundär aktive Transportsysteme in der Plasmamembran nutzen meist den Na^+ -Gradienten, der durch die Na^+/K^+ -Pumpe aufgebaut wurde. Hierbei findet eine Aufnahme oder Abgabe von Substanzen gegen den Konzentrationsgradienten bzw. den elektrochemischen Gradienten statt. Als Beispiel wären die Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) zu nennen, welche bei der pH-Regulation von Zellen eine Rolle spielen. Durch den Export von H^+ -Ionen im Austausch gegen Na^+ -Ionen im Verhältnis 1:1 kommt es zu einer Alkalinisierung der Zelle. Die Na^+/H^+ -Austauscher können durch verschiedene Liganden aktiviert werden und haben engen Kontakt zu anderen zellulären Proteinen, insbesondere dem Cytoskelett. Somit stellen die Na^+/H^+ -Austauscher ein Bindeglied zwischen dem Zellvolumen und vielen zellulären Prozessen dar (Ritter *et al.* 2001). Weitere sekundär aktive Transportsysteme sind die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die den Na^+ -Gradienten nutzen, um Ca^{2+} -Ionen im Austausch gegen Na^+ -Ionen in den Extrazellulärraum zu transportieren (Shimizu *et al.* 1997, Steffensen & Stys 1996). In den meisten Zellen exportieren $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Ca^{2+} -Ionen gegen Na^+ -Ionen im Verhältnis 1:3 (Blaustein & Lederer 1999). Eine Ausnahme zeigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bei den Photorezeptoren, wo sie Ca^{2+} -Ionen und K^+ -Ionen gegen Na^+ -Ionen im Verhältnis 1:1:4 exportieren (Webel *et al.* 2002).

Passive Transportsysteme nutzen den Konzentrationsgradienten bzw. den elektrochemischen Gradienten über der Membran, um anorganischen Ionen den Übergang über die Plasmamembran zu ermöglichen. Der passive Transport wird durch Kanäle oder Transporter ermöglicht. Eine wichtige Gruppe stellen hierbei Ionenkanäle dar, zu denen die spannungsgesteuerten (voltage-gated ion channel: VIC), ligandengesteuerten und mechanisch gesteuerten Kanäle gehören (Hucho & Tsetlin 1996). Bei Vertebraten gehören zur VIC-Familie Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Kanäle, die über einen Spannungssensor im Kanalprotein auf Spannungsänderungen über der Plasmamembran mit der Öffnung einer Kanalpore reagieren und dadurch den Fluss der betreffenden Ionen durch die Plasmamembran ermöglichen (Anderson & Greenberg 2001, Saier 2000). Zu den ligandengesteuerten Kanälen gehören Rezeptoren für Neurotransmitter wie Acetylcholin (ACh),

Glycin, GABA oder Glutamat die bei der Signaltransduktion in Nervensystemen von großer Bedeutung sind (Ashcroft 2000). Neurotransmitterrezeptoren werden vom Extrazellulärraum her aktiviert, aber es gibt auch zahlreiche ligandengesteuerte Kanäle, die vom Intrazellulärraum her aktiviert werden (Hucho & Tsetlin 1996). Zu den mechanisch gesteuerten Kanälen gehören zum Beispiel K^+ - und Cl^- -Kanäle. Sie werden durch die bei einer Zellschwellung auftretende Membrandehnung aktiviert, wahrscheinlich unter Mitwirkung des Cytoskeletts ($I_{K,Vol.}$, Hoffmann 2000; VRAC, $I_{Cl,Vol.}$, Nilius et al. 1998).

Änderungen der extrazellulären Osmolarität unter physiologischen Bedingungen

Bei Vertebraten sind unter physiologischen Bedingungen nur wenige Gewebe einem größeren osmotischen Gradienten ausgesetzt. Hierzu zählen Gewebe, die direkt mit der Verdauung von Nahrung oder der Exkretion von Flüssigkeit in Verbindung stehen. So kann im Nierenmark der osmotische Gradient über der Membran der Epithelzellen bis auf das Vierfache ansteigen (Lang et al. 1998). Auch bei der Absorption von Nährstoffen im Darm kann sich über der Plasmamembran der Darmepithelzellen ein erheblicher osmotischer Gradient bilden. Eine Veränderung der extrazellulären Osmolarität, wie zum Beispiel ein Konzentrationsanstieg anorganischer Ionen im Blutplasma, kann jedoch durch pathophysiologische Prozesse hervorgerufen werden. Als Beispiel sei die Hypernatriämie genannt, die durch Trinken von Meerwasser oder Störungen im Vasopressin-Haushalt entsteht (De Petris et al. 2001, Di Bartola 2001).

Im Unterschied zu Vertebraten kommt es bei vielen Invertebraten auch unter physiologischen Bedingungen häufig zu Änderungen in der Zusammensetzung des extrazellulären Milieus. Zum Beispiel sind die Landkrabben *Gecarcoidea natalis* jahreszeitlichen Schwankungen bezüglich ihrer Wasseraufnahme und dem damit verbundenen Elektrolythaushalt unterworfen. Während der Trockenzeit nimmt die Körperflüssigkeit der Tiere stark ab, wobei die Osmolarität der Hämolymphe zunimmt (Morris 2001, Morris & Ahern 2003).

Auch beim medizinischen Blutegel kommt es unter physiologischen Bedingungen zu Änderungen der Hämolymphe-Osmolarität, speziell bei der Nahrungsaufnahme. Blutegel nehmen sehr große Mengen Fremdblut auf, für deren Verdauung Monate benötigt werden. Dabei kann bei einer einzigen Mahlzeit das Körpergewicht innerhalb von ca. 30 Minuten auf das Zehnfache des Ausgangswerts zunehmen (*Lent & Dickinson 1987*). Noch während des Fressvorgangs wird das Fremdblut im Darm eingedickt, wobei Wasser über die Nephridien ausgeschieden wird (*Boroffka 1968, Pütter 1907*). Die Osmolarität von Säugetierblut beträgt ca. 300 mosmol/kg H₂O und ist damit deutlich höher als die Osmolarität der Blutegel-Hämolymphe vor der Nahrungsaufnahme (200 mosmol/kg H₂O, *Hildebrandt & Zerbst-Boroffka 1992*). Entsprechend nimmt nach der Blutmahlzeit die Osmolarität der Blutegel-Hämolymphe zu (*Zerbst-Boroffka 1973*), unter anderem durch Erhöhung der NaCl-Konzentration (*Wenning et al. 1980*). Der Anstieg der Cl⁻-Konzentration im Magen ist 24 Stunden nach Nahrungsaufnahme bereits um die Hälfte reduziert, deutlich schneller als der Anstieg der Osmolarität, wobei gleichzeitig die Cl⁻-Konzentration in der Hämolymphe zunimmt (*Zerbst-Boroffka 1973*).

Änderungen extrazellulären pH-Werts und extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration unter physiologischen Bedingungen

Neuronale Erregung führt im Zentralnervensystem von Vertebraten zu Änderungen des extrazellulären pH-Werts, wobei es je nach Gewebe zur Alkalinisierung oder zur Ansäuerung kommen kann (*Urbanics et al. 1978, Jarolimek et al. 1989*). Die Änderung des extrazellulären pH-Werts hat Einfluss auf die neuronale Aktivität, da viele Ionenkanäle pH-sensitiv sind (*Cheslar 1990, Cheslar & Kaila 1992*). Als Beispiel sei die Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit von NMDA-Kanälen bei erniedrigtem extrazellulären pH-Wert genannt (*Traynelis & Cull-Candy 1990*). Beim medizinischen Blutegel kann es zu einer Veränderung des extrazellulären pH kommen, aufgrund jahreszeitlicher Schwankungen in der Konzentration an O₂ sowie der Konzentrationen an CO₂ und HCO₃⁻ im Habitat. Da der pH-Wert in der Hämolymphe maßgeblich durch die O₂-Konzentration beeinflusst wird, liegt der pH-Wert der Hämolymphe unter sauerstoffge-

sättigten Bedingungen bei einem Wert von 7,8 und unter sauerstoffarmen Bedingungen bei 6,9 (Hildebrandt & Zerbst-Boroffka 1992).

Beim medizinischen Blutegel kommt es bei der Nahrungsaufnahme nicht nur zu einer Erhöhung der NaCl-Konzentration, sondern auch zur Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration in der Hämolymphe. Die Ca^{2+} -Konzentration in der Hämolymphe beträgt 0,5 mM (Hildebrandt & Zerbst-Boroffka 1992), im Säugetierblut 1,75 mM (Kolb 1974). Im Hippocampus von Ratten führt die Stimulation von Glutamat-Rezeptoren zu einer Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_a$; Stabel et al. 1990, Bootman & Berridge 1995). Die Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ beeinflusst spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle sowie metabotrope Ca^{2+} -Rezeptoren. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle werden durch Änderung des elektrochemischen Gleichgewichts über der Plasmamembran sowie durch Verstellung des Membranoberflächenpotentials beeinflusst (Hille 1992). Metabotrope Ca^{2+} -Rezeptoren bei Vertebraten besitzen eine große extrazelluläre Domäne zur Bindung von Ca^{2+} sowie eine intrazelluläre Domäne, welche über G-Proteine intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren kann (Brown et al. 1993, Nemeth 1995, Ruat et al. 1995). Beim medizinischen Blutegel sind metabotrope Ca^{2+} -Rezeptoren bislang nicht beschrieben.

Änderungen des extrazellulären Milieus: Beeinflussung von Effektorzellen und Verhaltensreaktionen

Veränderungen der chemischen Zusammensetzung im Extrazellulärraum werden von sogenannten Effektorzellen (sensing effectors; Wenning 1999) registriert, die geeignete homöostatisch wirkende Vorgänge auslösen („direkte Kontrolle“). Dabei nehmen Nervenzellen, die Änderungen der extrazellulären Osmolarität sowie die Na^+ - oder Cl^- -Konzentration detektieren, eine besondere Rolle ein (Hiyama et al. 2002, Wenning 1999). Bei Vertebraten wurden als Osmorezeptoren die magnozellulären Nervenzellen im Hypothalamus identifiziert. Bei diesen Zellen wird durch Zunahme der extrazellulären Osmolarität eine Zellschrumpfung ausgelöst, die durch Öffnung mechanosensitiver Kationenkanäle einen Na^+ -Einstrom in die Zellen und damit eine Membrandepola-

risation induziert, die wiederum die Ausschüttung von Vasopressin hervorruft, so dass ein weiterer Wasserverlust des Organismus verhindert wird (Hussy *et al.* 2000). In Nervenzellen des Zentralnervensystems sowie in Endothelzellen der Niere befinden sich Vanilloid-Rezeptoren (TRPV), die zur Superfamilie der TRP-Kanäle gehören (TRP = transient receptor potential; Liedtke *et al.* 2000, Liedtke & Friedman 2003). TRPV's sind Ca^{2+} -permeable mechanosensitive Kationenkanäle, die bei Zellschwellung geöffnet werden und zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen (Nilius *et al.* 2003). Weitere Osmoregulatoren befinden sich in Nervenzellen des circumventrikulären Organs, in denen Na^+ -sensitive Na^+ -Kanäle durch einen Anstieg der extrazellulären Na^+ -Konzentration aktiviert werden (Na_x -Kanäle; Hiyama *et al.* 2002). Diese Kanäle sind zwar strukturell eng verwandt mit spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, zeigen jedoch in den Schlüsselabschnitten des Proteins, die für die Spannungsabhängigkeit sowie die Inaktivierung verantwortlich sind, wichtige funktionelle Unterschiede.

Beim medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* wurde bei speziellen, peripheren Nervenzellen (nephridial nerve cells: NNC) ein Cl^- -Kanal beschrieben, der bei Erhöhung der extrazellulären Cl^- -Konzentration gehemmt wird (Wenning *et al.* 2001). Es kommt zu einer verringerten Freisetzung von FMRF-Amid und somit zu einer vermehrten Exkretion von NaCl über die Nephridien.

Veränderungen der Osmolarität und/oder der ionalen Zusammensetzung des Extrazellärums können auch die Aktivität von speziellen Nervenzellen verändern, die ihrerseits Einfluss auf das Verhalten des Tieres nehmen („indirekte Kontrolle“). In diesem Zusammenhang stehen insbesondere die Eigenschaften einzelner Zellen und/oder neuronaler Netzwerke im Mittelpunkt, welche an der Kontrolle von Verhaltensweisen beteiligt sind, die auf Veränderungen im extrazellulären Milieu reagieren (Wemmie *et al.* 2003). Auch bei Invertebraten wurde gezeigt, dass Änderungen der Osmolarität und/oder der ionalen Zusammensetzung der Hämolymphe die Verhaltensweise der Tiere beeinflussen können (Lohrmann & Kamemoto 1987, Morris & Ahern 2003). Das Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels liegt im Ventralsinus, steht somit unmittelbar mit der Hämolymphe in Kontakt und wird direkt mit osmotischen und/oder

ionalen Veränderungen konfrontiert (Nicholls & van Essen 1974, Sawyer 1986, Zerbst-Boroffka 1973). Untersuchungen zeigten, dass kurze Zeit nach Wechsel von isotonen zu hypertonen Bedingungen ein verstärktes Schwimmverhalten der Tiere ausgelöst wurde (Nieczaj & Zerbst-Boroffka 1993). Die neuronale Basis wichtiger Verhaltensweisen des Blutegels wie Schwimmbewegungen, Nahrungsaufnahme oder verschiedene Reflexbewegungen wurden charakterisiert (Lent et al. 1991, Lent & Dickinson 1987, Wilson 1996). Beim medizinischen Blutegel werden diese Prozesse, die bei höheren Tieren eine Vielzahl von Zellen beanspruchen, von nur wenigen Zellen ausgeführt. Dadurch werden die Auswirkungen bei einem Eingriff in das Nervensystem überschaubar und kontrollierbar (Lent 1973).

Ca²⁺ als intrazellulärer Bote

Auf zellulärer Ebene besitzen Ca²⁺-Ionen als Signalüberträger eine große Bedeutung, da sie eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflussen. Die [Ca²⁺]_i wird durch verschiedene Regulationsmechanismen sehr niedrig gehalten (< 100 nM, Clapham 1995). Durch Ca²⁺-Einstrom oder Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern kann ein [Ca²⁺]_i-Anstieg ausgelöst werden, der als intrazelluläres Signal dient (second messenger) und im Zellinnern Ca²⁺-abhängige Proteine in ihrer Funktion beeinflusst. Als wichtiges Beispiel wäre die Rolle von Ca²⁺-Ionen bei der synaptischen Freisetzung von Neurotransmittern zu nennen (Bennett & Scheller 1994, Jessell & Kandel 1993).

Im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels kann bei Gliazellen ein [Ca²⁺]_i-Anstieg durch einen Ca²⁺-Einstrom durch Ca²⁺-permeable ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren oder durch spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle induziert werden sowie durch Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern nach Aktivierung metabotroper Neurotransmitter-Rezeptoren (Nett & Deitmer 1998). Bei Neuronen hingegen scheinen Ca²⁺-permeable ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren bzw. metabotrope Neurotransmitter-Rezeptoren, die eine Ca²⁺-Freisetzung auslösen, keine Rolle zu spielen, so dass bei diesen Zellen ein [Ca²⁺]_i-Anstieg überwiegend durch spannungsabhängige Ca²⁺-

Kanäle erfolgt (Hochstrate & Schlue 1994, 1995; Hochstrate et al. 1995, Dierkes 1998). Deshalb sollte sich die Untersuchung osmotischer und/oder ionaler Einflüsse auf die neuronale Ca^{2+} -Homöostase auf die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle konzentrieren, deren biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften gut charakterisiert sind (Bookman & Liu 1990, Dierkes et al. 2004).

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle im Blutezel-Zentralnervensystem

Die meisten, wenn nicht alle Blutezel-Neuronen exprimieren spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle mit ähnlichen Eigenschaften (Dierkes et al. 1997). Diese ubiquitären Ca^{2+} -Kanäle werden bei Membranpotentialen zwischen -40 und -30 mV aktiviert und bleiben bei anhaltender Depolarisation geöffnet. Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle werden durch verschiedene polyvalente Kationen (La^{3+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) und durch den zyklischen Alkohol Menthol blockiert. Jedoch unterscheiden sich die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in den Neuronen des medizinischen Blutezels von den bei Vertebraten in ihrer hohen Sr^{2+} Permeabilität, die etwa zweimal so groß ist wie die für Ba^{2+} oder Ca^{2+} (Bookman & Liu 1990, Wang et al. 1999), während bei den meisten Ca^{2+} -Kanälen von Vertebraten die Permeabilität für Ba^{2+} etwa zweimal so hoch ist wie die für Ca^{2+} oder Sr^{2+} (Mangoni et al. 1997, Wakamori et al. 1998).

Die funktionellen Eigenschaften der Ca^{2+} -Kanäle des medizinischen Blutezels sind primär bei Retzius-Neuronen untersucht worden. Die Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle folgt einem sigmoiden Zeitverlauf, die Inaktivierung ist Ca^{2+} -abhängig und langsam, während die Deaktivierung sehr schnell ist (Bookman & Liu 1990). Antagonisten für spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle bei Vertebraten, wie ω -Conotoxin GVIA und ω -Agatoxin IVA zeigen bei Blutezel-Neuronen keine blockierende Wirkung (Hochstrate et al. 1995). Pharmakologische Untersuchungen an Retzius-Neuronen zeigen einen blockierenden Effekt des Phenylalkylamins Gallopamil (Methoxyverapamil, D600; Beck et al. 2001). Zudem wurde eine hemmende Wirkung der Phenylalkylamine Verapamil, Gallopamil und Devapamil, des Benzothiazepins Diltiazem sowie des 1,4

Dihydropyridins Nifedipin bei Retzius, Leydig, AP, AE, P und N-Neuronen nachgewiesen (Dierkes *et al.* 2004). Ein blockierender Effekt von Phenylalkylaminen, Benzothiazepinen und einigen 1,4 Dihydropyridinen ist charakteristisch für L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle von Vertebraten. Es ist anzumerken, dass einige Blutegel-Neuronen Ca^{2+} -Kanäle exprimieren, die eher dem T-Typ von Vertebraten zuzuordnen sind (Angstadt & Calabrese 1991).

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der extrazellulären Flüssigkeit/Hämolymphe, die während der Nahrungsaufnahme oder unter veränderten Umweltbedingungen beim medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* auftreten, simuliert, um deren Einfluss auf die Funktion spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bei Blutegel-Neuronen mit Hilfe fluorimetrischer und elektrophysiologischer Methoden zu untersuchen, die ihrerseits Veränderungen im Verhalten auslösen können. Speziell wurde die NaCl-Konzentration, der pH-Wert und die Ca^{2+} -Konzentration der extrazellulären Versuchslösungen verändert. Die Untersuchungen wurden bei den multifunktionellen Retzius-Neuronen, den mechanosensorischen P (pressure)- und N (noxious)-Neuronen sowie den AP (anterior pagoda)-Neuronen durchgeführt, da diese Zelltypen unterschiedliche Verhaltensweisen der Blutegel steuern. Diese Neuronentypen besitzen wichtige funktionelle Bedeutung beim Fressvorgang (Retzius-Neuronen: Lent & Dickinson 1987, Zhang *et al.* 2000), bei der Auslösung oder Modulation von Schwimmbewegungen (Retzius-, P-, N-Neuronen: Brodfuerer & Thorogood 2001) sowie der Integration sensorischer Informationen (AP-Neuronen: Shan & Zhang 2001). Zusätzlich wurden die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle bei diesen vier Neuronentypen pharmakologisch weiter charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Präparation

2.1.1 Der medizinische Blutegel *Hirudo medicinalis*

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (18 - 22 °C) an identifizierten Neuronen isolierter Segmentalganglien des medizinischen Blutegels, *Hirudo medicinalis*, durchgeführt. Für die Versuche wurden ausschließlich adulte Tiere verwendet, die von der Firma Zaugg GmbH (Biebertal) geliefert wurden.

Der medizinische Blutegel gehört zur Gruppe der Articulata (Gliederfüßer) und innerhalb dieser Gruppe zum Stamm der Annelida (Ringelwürmer), Klasse: Clitellata (Gürtelwürmer), Unterklasse: Hirudinea (Egel), Ordnung: Gnathobdellida (Kiefernegel). Er besitzt an jedem Körperende einen Saugnapf, wobei der vordere von der Mundöffnung durchstoßen wird und insofern an der Nahrungsaufnahme beteiligt ist, während der hintere nur zum Festheften und zur Fortbewegung dient. Zahlreiche anatomische Studien im 19. (Livanov 1904, Retzius 1891) und 20. Jahrhundert (Coggeshall & Fawcett 1964, Kuffler & Potter 1964) schufen die Grundlage für die neurobiologische Untersuchung des Blutegel-Nervensystems.

2.1.2 Aufbau des Zentralnervensystems des Blutegels

Der medizinische Blutegel hat als Vertreter der Anneliden einen segmentierten Körperbau, der in 32 Segmente unterteilt ist. Der einem Segment zugeordnete Hautmuskelschlauch besteht im vorderen und hinteren Körperbereich aus ein bis vier und im mittleren Körperbereich aus jeweils fünf Segmentringen (Annuli, Mann 1962). Im zentralen Segmentring befinden sich Sensillen, die Rezeptoren für visuelle, mechanische und chemische Reize enthalten.

Das Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels liegt ventral und entspricht in seiner Segmentierung dem allgemeinen Körperbau (Abb. 1). Die ursprünglich in jedem Segment vorkommenden paarigen Ganglien sind unter vollständiger Reduktion der Kommissuren zu einem einzigen Segmentalganglion verschmolzen. Von den ursprünglich 32 Segmentalganglien sind die ersten vier anterioren Ganglien zum Unterschlundganglion und die letzten sieben posterioren Ganglien zum Analganglion verschmolzen. Das Unterschlundganglion bildet zusammen mit dem Oberschlundganglion das Cerebralganglion. Zwischen Cerebralganglion und Analganglion befinden sich 21 Segmentalganglien. Die Ganglien sind untereinander durch jeweils drei Konnektive zu einer Ganglienkette verbunden, die vom ventralen Blutsinus umschlossen wird. Die lateralen Konnektive enthalten Axone mit geringem Durchmesser und das mittlere Konnektiv (Faivre'scher Nerv) enthält u.a. ein Axon (Rohde Riesenaxon) mit einem Durchmesser von ca. 10 µm, das für die schnelle Reizweiterleitung im Egelkörper zuständig ist (Coggeshall & Fawcett 1964, Wilkinson & Coggeshall 1975). Jedes Ganglion ist über Seitennerven mit dem Hautmuskelschlauch und/oder inneren Organen verbunden (Muller et al. 1981).

Die Segmentalganglien sind von einer Bindegewebshülle umgeben. Unterhalb der Bindegewebshülle befinden sich in einer äußeren Schicht die Zellkörper der Neuronen, die in sechs Paketen angeordnet sind (Abb. 2B). Die Neuronenzellkörper jedes Pakets werden von den Ausläufern einer Paket-Gliazelle umhüllt. Die Zellkörperschicht umgibt das Neuropil, in dem die neuronalen Ausläufer zusammenkommen und untereinander synaptische Kontakte bilden. Die neuronalen Fortsätze werden im Neuropil von den Ausläufern zweier großer Neuropil-Gliazellen umgeben. Mit Ausnahme der Geschlechtsganglien in den Segmenten 5 und 6 enthalten Segmentalganglien ca. 200 Paare homologer Neuronen und einige wenige ungepaarte Neuronen (Macagno 1980).

Die Untersuchungen wurden an den Segmentalganglien 1 - 4 und 7 - 21 durchgeführt (Abb. 1B). Die Geschlechtsganglien 5 und 6 wurden nicht verwendet. Diese Ganglien enthalten ca. 750 Neuronen, die sich hinsichtlich der synaptischen Verschaltung und der

peripheren Projektion deutlich von den Neuronen der übrigen Segmentalganglien unterscheiden (Macagno 1980).

2.1.3 Präparation

Zur Präparation wurde ein Blutegel mit seiner Ventralseite nach unten in eine mit Wachs ausgegossenen Präparierschale gelegt und mit Nadeln zuerst am hinteren, dann am vorderen Saugnapf fixiert und dabei leicht gestreckt. Mit dem ersten Schnitt wurde der Hautmuskelschlauch in Höhe des Cerebralganglions quer durchtrennt und dabei das Cerebralganglion vom Rest der Ganglienkette abgetrennt. Danach wurde der Hautmuskelschlauch von anterior nach posterior entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten. Hierbei war große Sorgfalt geboten, damit der der dorsalen Körperwand anhaftende Darm unversehrt blieb, um einen Kontakt von Verdauungsenzymen mit dem Nervensystem auszuschließen. Anschließend wurde der Hautmuskelschlauch zu beiden Seiten aufgeklappt und mit Nadeln fixiert. Das Präparat wurde regelmäßig mit Normalsalzlösung (NSL, Tabelle 1) überspült, um es vor Austrocknung zu bewahren und um Gewebereste und Blut aus den Magenblindsäcken zu entfernen.

Die weiteren Präparationsschritte erfolgten unter optischer Kontrolle mit Hilfe eines Binokulars. Der Blutsinus wurde direkt über einem Segmentalganglion mit einer Pinzette angehoben und mit einer Augenschere aufgeschnitten. Das anteriore Konnektiv wurde ca. 4 - 5 mm von dem Segmentalganglion entfernt durchtrennt, aus dem Blutsinus gezogen und dabei das Ganglion ein wenig angehoben. Danach wurden die vier Seitenwurzeln und das posteriore Konnektiv durchtrennt. Die isolierten Segmentalganglien wurden in ein mit NSL gefülltes Blockschälchen überführt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Alter der Präparate zu Versuchsbeginn betrug maximal vier Stunden.

2.2 Identifizierung der Neuronen

Die Untersuchungen wurden an Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen durchgeführt (Abb. 2). Retzius-Neuronen sind als multifunktionale Neuronen an der Schleimsekretion und der Kontrolle des Fressverhaltens beteiligt (Carretta 1988, Zhang *et al.* 2000). P (pressure)- und N (noxious)-Neuronen sind mechanosensorische Neuronen, die durch mechanische Reizung des Hautmuskelschlauchs aktiviert werden. Dabei reagieren N-Neuronen erst auf stärkere Druckreize als P-Neuronen. N-Neuronen werden außer durch mechanische Reize auch durch chemische und thermische Reize aktiviert (Pastor *et al.* 1996). AP-Neuronen (anterior pagoda) erhalten über Interneuronen synaptischen Input von P- und N-Neuronen (Sunderland 1980) und spielen bei der Integration sensorischer Informationen im Blutegel-Nervensystem eine wichtige Rolle (Shan & Zhang 2001).

Die Größe und Lage der Neuronenzellkörper relativ zueinander und zu den Paketgrenzen liefern wichtige Indizien zur Identifizierung der Neuronen. Da die Position der Neuronen im Segmentalganglion in gewissen Grenzen variiert, dienen electrophysiologische Parameter, wie das Membranruhepotential und insbesondere Amplitude, Frequenz und Form spontan auftretender oder durch Strominjektion ausgelöster Aktionspotentiale als zusätzliche Identifizierungsmerkmale (Abb. 3, Tabelle 4; Dierkes *et al.* 1996). Die Kriterien zur Identifizierung der untersuchten Neuronen sind nachfolgend beschrieben.

Retzius-Neuronen

Retzius-Neuronen (Retzius 1891) sind die größten Neuronen ($\varnothing$ 50 - 80 μm) im Segmentalganglion (Abb. 2). Sie liegen als Paar im anterior-medianen Paket und sind deutlich von den umgebenden Neuronen zu unterscheiden. Sie waren anhand ihrer Größe und Lage sowie ihrer spontanen Aktionspotentiale eindeutig zu identifizieren (Abb. 3).

P-Neuronen

Es gibt zwei P1- und zwei P2-Neuronen pro Segmentalganglion. Nach der schematischen Darstellung von *Muller et al.* (1981) liegen die Zellkörper der Neuronen in den beiden posterior lateralen Paketen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen dies für die P2-Neuronen. Hingegen wurde für die P1-Neuronen festgestellt, dass sie nur in 23 % der Ganglien (n = 54) in den posterior lateralen Paketen zu finden waren und in 77 % im posterior medianen Paket (n = 181, Abb. 2B). Für die P-Neuronen war neben Lage und Größe des Zellkörpers die meist fehlende Spontanaktivität ein wichtiges Identifikationsmerkmal. In einigen Fällen traten beim Elektroden-einstich Verletzungsentladungen auf. Eine mögliche Verwechslung der P2-Neuronen mit den benachbarten, etwa gleich großen Leydig-Neuronen war auszuschließen, da letztere anhaltend spontan aktiv sind.

N-Neuronen

Die N-Neuronen werden in N1- und N2-Neuronen unterteilt. In jedem der beiden anterior lateralen Pakete eines Segmentalganglions befinden sich ein N1- und ein N2-Neuron (Abb. 2). N-Neuronen zeigten für ein bis zwei Minuten nach Einstich der Glas-mikroelektrode Aktionspotentiale sehr hoher Amplitude (über 90 mV) mit einer charakteristischen Form und einer deutlich ausgeprägten Nachhyperpolarisation (Abb. 3). Danach konnten Aktionspotentiale nur noch durch depolarisierende Strompulse ausgelöst werden.

AP-Neuronen

In den beiden anterior lateralen Paketen liegt je ein AP-Neuron. Die AP-Neuronen generierten spontan Aktionspotentiale mit hoher Frequenz (zwischen 2 und 5 pro Sekunde) und geringer Amplitude (maximal 10 mV). Ihre Lage und ihre symmetrischen, „pa-

goden-förmigen“ Aktionspotentiale gaben den AP-Neuronen ihren Namen und ließen eine eindeutige Identifizierung zu.

2.3 Messung der (freien) cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2

Die Messung der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2. Fluoreszierende Substanzen besitzen die Eigenschaft, kurzwelliges (energiereiches) Licht zu absorbieren und längerwelliges (energieärmeres) Licht zu emittieren. Durch die Bindung von Ca^{2+} an den Farbstoff (1:1-Stöchiometrie) verschiebt sich das Extinktionsspektrum von Fura-2 in den kurzwelligen Bereich, während das Emissionsspektrum praktisch konstant bleibt (Abb. 4; *Grynkiewicz et al.* 1985). Ca^{2+} -gesättigtes Fura-2 absorbiert maximal Licht der Wellenlänge 335 nm, Ca^{2+} -freies Fura-2 maximal Licht der Wellenlänge 362 nm. Das Gleichgewicht zwischen Ca^{2+} und Fura-2 kann mit optischen Methoden ermittelt werden. Durch Erfüllung weiterer Kriterien wie Fotostabilität, hohe Absorption und Quantenausbeute, hohe Selektivität, geeignete Gleichgewichtskonstante und geringe Toxizität ist Fura-2 zur Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gut geeignet (*Haugland* 2002).

Es ist prinzipiell möglich, Fura-2 mit nur einer Wellenlänge anzuregen und aus der Fluoreszenzemission Rückschlüsse auf die freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) zu ziehen. Die Fluoreszenzemission hängt jedoch nicht nur von $[\text{Ca}^{2+}]$ ab, sondern auch von der Farbstoffkonzentration sowie von apparativen Gegebenheiten, wie Intensität des Anregungslichts, Empfindlichkeit des Detektors, Transmission der Filter. Um hiermit verbundene Probleme zu umgehen, verwendet man die Ratio-Methode, bei der sich $[\text{Ca}^{2+}]$ unabhängig von absoluten apparativen Parametern und der Farbstoffkonzentration ermitteln lässt (*Grynkiewicz et al.* 1985). Hierbei wird der Farbstoff mit Licht zweier Wellenlängen λ_1 und λ_2 alternierend angeregt und $[\text{Ca}^{2+}]$ aus dem Verhältnis der entsprechenden Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 bestimmt, die durch folgende Beziehungen gegeben sind:

$$F_1 = S_{b1} \cdot c_b + S_{f1} \cdot c_f \quad (1)$$

$$F_2 = S_{b2} \cdot c_b + S_{f2} \cdot c_f \quad (2)$$

Die Faktoren S_{b1} , S_{b2} , S_{f1} und S_{f2} beinhalten apparative Parameter (Intensität des Anregungslichts, Effizienz des Detektors) und physikalische Farbstoffeigenschaften (Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute); c_b und c_f bezeichnen die Konzentrationen des Ca^{2+} -gesättigten bzw. Ca^{2+} -freien Farbstoffs.

Bei einer 1:1-Stöchiometrie sind die Konzentrationen c_b und c_f über die Dissoziationskonstante K_d folgendermaßen mit $[\text{Ca}^{2+}]$ verknüpft:

$$c_b = \frac{c_f \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_d} \quad (3)$$

Für das Verhältnis (Ratio) $R = F_1/F_2$ ergibt sich nach Einsetzen von Gl. (3) in Gl. (1) und (2) folgender Zusammenhang:

$$R = \frac{(S_{f1} + S_{b1} \cdot [\text{Ca}^{2+}]/K_d)}{(S_{f2} + S_{b2} \cdot [\text{Ca}^{2+}]/K_d)} \quad (4)$$

Die Auflösung von Gl. (4) nach $[\text{Ca}^{2+}]$ ergibt:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \left(\frac{R - (S_{f1}/S_{f2})}{(S_{b1}/S_{b2}) - R} \right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (5)$$

Das Verhältnis S_{f1}/S_{f2} ist der minimale Wert für R , der bei Abwesenheit von Ca^{2+} erreicht wird ($R_{\min}$). Analog ist S_{b1}/S_{b2} der maximale Wert für R ($R_{\max}$), der sich bei Ca^{2+} -Sättigung des Farbstoffs einstellt.

Damit ergibt sich:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \cdot \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (6)$$

2.3.1 Eichung der Fura-2-Fluoreszenz

Die Werte für $R_{\min}$, $R_{\max}$ und für den Quotienten S_{f2}/S_{b2} wurden durch eine *in vitro*-Eichung ermittelt. Bei der Übertragung der *in vitro*-Eichung auf *in vivo*-Verhältnisse muss beachtet werden, dass sich die Absorptions- und/oder Emissionseigenschaften des Farbstoffs im Cytoplasma verändern können. Untersuchungen der spektralen Eigenschaften von Fura-2 *in vivo* zeigten eine Abhängigkeit vom pH und wiesen auf Interaktionen mit Proteinen hin (Bancel *et al.* 1992). Bei Neuronen des Blutegels ließen sich die intrazellulär gemessenen Fura-2-Anregungsspektren durch eine gewichtete Überlagerung der *in vitro*-Spektren simulieren, was darauf hin deutet, dass die Farbstoffeigenschaften in den Zellen weitgehend erhalten bleiben (Dierkes 1998).

Die Eichlösung enthielt 100 μM Fura-2 (K^+ -Salz, Molecular Probes) in 100 mM KCl und 10 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), pH 7,4. Die Lösung mit der Ca^{2+} -gesättigten Form von Fura-2 enthielt zusätzlich 10 mM CaCl_2 , die Lösung mit der Ca^{2+} -freien Form 10 mM Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA). Die Eichlösungen wurden in kleine Messkammern mit einer Schichtdicke von 150 μm und einem Fassungsvermögen von ca. 5 μl pipettiert und in der Apparatur vermessen, die auch zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung verwendet wurde. Die mit den beiden verwendeten Apparaturen (siehe 2.5) gemessenen Anregungsspektren der Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -gesättigten Form von Fura-2 sind in Abb. 4 wiedergegeben. In der einen Apparatur wurde die Fluoreszenz mittels eines Sekundärelektronen-Vervielfachers gemessen (SEV-System), in der anderen erfolgte die Detektion mittels einer digitalen Kamera mit CCD-Chip (CCD-System).

Für die Ca^{2+} -Bestimmung mit dem SEV-System wurden nach der Ratio-Methode die Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ ausgewertet und folgende Parameter ermittelt: $R_{\min} = 0,3$, $R_{\max} = 7,3$ und $S_{f2}/S_{b2} = 9,13$. Für K_d wurde ein Wert von 135 nM verwendet (Grynkiewicz *et al.* 1985). Von der gemessenen Gesamtfluoreszenz wurde vor der Berechnung der Ratio die Autofluoreszenz des Präparats subtrahiert, die in einer farbstofffreien Stelle des Ganglions gemessen wurde.

2.3.2 Messung des Zellvolumens mit Fura-2

Änderungen des Zellvolumens wurden über die intrazelluläre Fura-2-Konzentration bestimmt (Muallem *et al.* 1992). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Farbstofffluoreszenz bei Anregung am Isofluarpunkt (360 nm). In diesem Fall ist die Fluoreszenzemission nur von der Farbstoff-Konzentration und nicht von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abhängig.

Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von Fura-2 als Volumenmarker ist, dass der Farbstoff nicht metabolisiert wird. Weiterhin müssen das Verbleiben im Cytosol und die Unabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Änderungen des cytosolischen Milieus gewährleistet sein (Crowe *et al.* 1995). Fura-2 erfüllt diese Bedingungen. Bei der mikrofluorimetrischen Bestimmung von Zellvolumenänderungen wird die Fluoreszenzemission von Fura-2 nur in einem kleinen Volumenelement der Zelle bestimmt (Crowe *et al.* 1995). Die Änderungen der Fluoreszenzemissionen verhalten sich dann umgekehrt proportional zu denen des Zellvolumens (Alvarez-Leefmans *et al.* 1995):

$$\frac{F_0 - F_{\text{HF}}}{F_{\text{Exp}} - F_{\text{HF}}} = \frac{V_{\text{Exp}}}{V_0} \quad (7)$$

F_0 bezeichnet die Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen, F_{Exp} die Fluoreszenz unter veränderten experimentellen Bedingungen. F_{HF} ist die Hintergrundfluoreszenz des Präparats, die von der jeweils gemessenen Gesamtfluoreszenz subtrahiert werden muss. V_0

bezeichnet das Wasservolumen des Cytosols unter Kontrollbedingungen und V_{Exp} das Volumen unter veränderten experimentellen Bedingungen. Bei einer Zellschrumpfung steigt die Farbstoffkonzentration und damit die Fluoreszenzemission und umgekehrt löst eine Zellschwellung einen Abfall der Farbstoffkonzentration und damit der Fluoreszenzemission aus. Zur simultanen Messung von Zellvolumen und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde Fura-2 mit den Wellenlängen 360, 340 und 380 nm alternierend angeregt.

2.4 Farbstoffinjektion

Zur Farbstoffinjektion in ein einzelnes Neuron wurde das Segmentalganglion in einem speziellen Halter fixiert. Der Halter bestand aus einem Deckglas (10 x 5 mm, Dicke 150 μm), auf das parallel zueinander zwei Minutiennadeln ($\varnothing$ 0,1 mm) im Abstand von 3 mm an ihren stumpfen Enden und darüber ein zweites Deckglas (5 x 5 mm) aufgeklebt waren. Der Halter wurde in eine mit Normalsalzlösung gefüllte Versuchswanne eingespannt. Das Segmentalganglion wurde unter optischer Kontrolle (Stereolupe; $V = 64\times$) mit Hilfe von Dumont-Pinzetten auf dem Halter befestigt, in dem die Konnektive mit der Ventralseite nach oben zwischen dem größeren Deckglas und den Minutiennadeln eingeklemmt wurden. Die Farbstoffe wurden mittels Glasmikrokapillaren iontophoretisch in die Zellen injiziert. Die Glasmikroelektroden wurden aus filamenthaltigen Rohlingen (GC 150F-15, $\varnothing$ 1,5 mm, Clark Electromedical Instruments) mit einem Vertikalelektrodenpuller (Narishige PE-2) ausgezogen und hatten bei Füllung mit den Fluoreszenzfarbstoffen einen Widerstand von 50 - 100 M Ω .

Die Glasmikroelektroden wurden mit wässrigen Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe gefüllt. Hierzu wurde das Elektrodenfilament von hinten mit einer Füllkapillare berührt, wodurch die Farbstofflösung durch die Kapillarkräfte zwischen Filament und Elektrodenwand in die Elektrodenspitze übertragen wurde. In die Kapillare wurde ein Silberdraht ($\varnothing$ 0,1 mm) eingeführt, um einen elektrischen Kontakt zwischen Farbstofflösung und dem Eingang des Iontophoreseverstärkers (L/M-1; List) herzustellen; danach wurde die Elektrode mit Laborwachs (Deiberit 502) verschlossen. Die Injektionselektrode

wurde unter visueller Kontrolle mit Hilfe eines Mikromanipulators in das jeweilige Neuron eingestochen und Membranpotential sowie Amplitude und Frequenz spontan auftretender Aktionspotentiale mit einem Oszilloskop (PM 3233; Philips) registriert. Die Farbstoffe wurden durch Anlegen eines hyperpolarisierenden Stroms von -10 nA in die Neuronen eingebracht. Eine Minute danach wurden das Membranpotential sowie Amplitude und Frequenz der Aktionspotentiale erneut ermittelt.

Mit Hilfe des CCD-Systems (siehe 2.5) sowie einem konfokale Laserscan-Mikroskop (siehe 2.6) konnten die untersuchten Neuronen in einem einzelnen Experiment simultan vermessen werden. Die Farbstoffinjektion in diesen Experimenten wurde in der Reihenfolge P, N, AP, Retzius vorgenommen, da Retzius- und AP-Neuronen den Farbstoff schneller verlieren als P- und N-Neuronen. Dieser schnelle Verlust kann nicht auf Ausbleichen zurückgeführt werden, da alle Zellen der gleichen Anregungsintensität ausgesetzt waren. Möglicherweise verfügen Retzius- und AP-Neuronen über spezielle Anionenaustauscher, wie sie bisher nur bei Gliazellen beschrieben wurden (*Munsch et al.* 1995). Die Injektionsdauer richtete sich nach der Größe des jeweiligen Neuronentyps. Als Maß für die injizierte Farbstoffmenge diente das Produkt aus Injektionsstrom und Injektionsdauer (Retzius-Neuronen: 0,7 - 1,0 μC , alle übrigen Neuronen: 0,3 - 0,4 μC ; siehe Tabelle 5). Nach der Injektion wurde das Präparat samt Halter in die Messkammer der jeweiligen Messapparatur überführt. Für Experimente mit dem SEV-System (siehe 2.5) wurde jeweils nur ein Neuron angefärbt.

2.5 Mikrofluorimeter und Mikroskop

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit zwei unterschiedlichen Systemen durchgeführt (Abb. 5). Beide Systeme bestanden aus einer bzw. zwei Lichtquellen mit Monochromatoren, einem Mikroskop und einem Personalcomputer zur Systemsteuerung sowie zur Datenaufnahme und Speicherung. Zur Fluoreszenzdetektion diente in dem einen System ein Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) und in dem anderen der CCD-Chip einer digitalen Kamera.

Der Vorteil des CCD-Systems lag darin, dass mehrere Neuronen simultan vermessen und so vergleichende Aussagen zu Amplitude und Zeitverlauf der Signale gemacht werden konnten. Die Ratio in physiologischer Lösung variierte zwischen den Messtagen, so dass eine tägliche Kalibrierung zur Umrechnung in $[Ca^{2+}]_i$ notwendig gewesen wäre. Um die Messdaten vergleichen zu können wurden die Ratio-Werte in physiologischer Lösung aufeinander normiert. Anhand von Kontrollexperimenten konnte festgestellt werden, dass die K^+ -induzierten Ratio-Anstiege zu verschiedenen Zeitpunkten gleich waren. Bei dem SEV-System war die basale Ratio über einen längeren Zeitraum (mehrere Monate) konstant.

Der SEV des SEV-Systems war Bestandteil eines Photometers mit optischen Hilfseinrichtungen zur Objektbetrachtung und Einstellung des Messareals. In einem SEV trifft ein Photon auf eine negativ geladene Kathode, schlägt ein Elektron heraus, das beschleunigt wird und aus einer Prallelektrode (Dynode) weitere Elektronen herausschlägt. Nach mehreren Dynodenschritten treffen die Elektronen auf die Anode und fließen über einen Arbeitswiderstand zur Masse ab. Die dadurch erzeugten Spannungspulse über dem Arbeitswiderstand wurden von einer Zähl Elektronik registriert und über ein Interface an einen Personalcomputer weitergegeben (Software PTI). Vor Messbeginn wurden die Monochromatoren auf die benötigten Wellenlängen eingestellt und die beiden Sektorenscheiben (Chopper) auf eine Drehfrequenz von 100 Hz gebracht.

Die digitale Kamera des CCD-Systems (Spot jr. sw, Diagnostic Instruments Inc., Broughs) war ein gekühltes Schwarzweiß-System mit einem Auflösungsvermögen von 768 x 512 Pixel und einer Pixel-Größe von 9 x 9 μm (CCD-Chip: Kodak, KAF-0400E). Ihre Empfindlichkeit wurde vom Hersteller in kameraspezifischen Einheiten angegeben. Das Grundsignal im Dunkeln betrug 15 Einheiten. Die Autofluoreszenz des Segmentalganglions lag bei 70 Einheiten, bei einer fluoreszierenden Zelle lagen die Werte zwischen 110 und 190 Einheiten. Die Bilder wurden im Abstand von zwei Sekunden aufgenommen, wobei die Fluoreszenzanregung alternierend mit 360 und 380 nm vorgenommen wurde. Die Kameraeinstellungen wurden mit Hilfe des Programms Meta-View

(Visitron) kontrolliert. Der Rechner diente außerdem zur Steuerung der Monochromatoren und des Choppers sowie zur Speicherung und Auswertung der Messdaten.

Das Anregungslicht wurde bei beiden Systemen von Xenon-Kurzbogenlampen erzeugt (Ushio UXL-75XE, 75 Watt). Das weiße Licht der Lampen wurde mit Hilfe eines bzw. von zwei Choppern alternierend auf die Eintrittsspalten von zwei bzw. vier schrittmotorgesteuerten Gittermonochromatoren projiziert, in denen es in seine spektralen Anteile zerlegt wurde. Das gewünschte Anregungslicht wurde an den Austrittsspalten der Monochromatoren von einem Quarzlichtleiter aufgefangen und über den Epifluoreszenzeingang des Mikroskops zum Präparat geleitet.

Es wurden inverse Mikroskope verwendet, bei denen sich das Objektiv unter dem Präparat befand. Im SEV-System wurde ein Nikon Diaphot-TMD verwendet (Nikon-Objektiv Fluor 40Ph 3DL, $V = 40\times$; Sperrfilter BA 510 nm/540 nm) und im CCD-System ein Zeiss IM (Fluor 40Ph 3DL, $V = 10\times$; BA 520 nm/580 nm). Das vom Präparat emittierte Fluoreszenzlicht wurde über das Objektiv eingefangen und vom Anregungslicht mit Hilfe eines Sperrfilters getrennt.

Die Versuchswanne beim SEV-System bestand aus einer 2,5 mm dicken Plexiglasscheibe mit einer Aussparung von 2 x 4 cm, die mit einem Deckglas (Dicke 0,15 mm) verschlossen war, das den Boden der Versuchswanne bildete. Die Versuchslösungen befanden sich ca. 50 cm oberhalb der Versuchswanne und wurden über ein Schlauchsystem (1 mm Durchmesser) in die Versuchswanne geleitet. Ein Fliesspapierstreifen sorgte für den gleichmäßigen Abfluss der Versuchslösungen und leitete sie durch eine Bohrung am Ende der Versuchswanne über einen großlumigen Schlauch in einen Auffangbehälter. Der Wechsel der maximal acht Versuchslösungen erfolgte mittels eines Systems von mechanisch gekoppelten Schlauchklemmen. Das Präparat wurde so nah wie möglich am Lösungszufluss platziert und das Fliesspapier so positioniert, dass der Flüssigkeitspegel in der Versuchswanne niedrig war. Damit wurde ein schneller Austausch der Versuchslösungen am Präparat gewährleistet. Die Flussrate betrug etwa 5 ml pro

Minute und das Volumen der Versuchswanne 0,2 ml, so dass die Versuchslösung 25 mal pro Minute ausgetauscht wurde.

Die Versuchswanne beim CCD-System bestand aus einer kreisrunden Aussparung von 1,5 cm in einer 4 mm dicken Plexiglasplatte, ebenfalls mit einem Deckglas als Boden. Die Versuchslösungen befanden sich wiederum ca. 50 cm oberhalb der Versuchswanne und wurden über ein Zuflusssystem, das in eine Glaskapillare mit einem Durchmesser von 1,5 mm mündete, direkt vor das Präparat in die Versuchswanne geleitet und direkt dahinter mit einer Vakuumkolbenpumpe abgesaugt. Auch hier wurde der Wechsel der Versuchslösungen wiederum über ein System von mechanisch gekoppelten Schlauchklemmen erreicht. Die Flussrate des Systems betrug 5 ml pro Minute. Das Kammervolumen wurde also 7 mal pro Minute ausgetauscht.

2.6 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Die Bestimmung der Zellgröße unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wurde mit Hilfe konfokaler Laserscan-Mikroskopie vorgenommen. Zur Erstellung der konfokalen Bilder wurde eine kommerzielle Laserscan-Mikroskop-Einheit verwendet (TCS NT, Leica), die aus einem aufrechten Mikroskop (Leitz DMR, Leica, Bensheim), einer Lasereinheit und verschiedenen elektronischen Justierungs-Modulen bestand. Das Mikroskop war mit drei Objektiven ausgestattet (HC PL Fluotar 10 x, HC PL APO 20 x, HCX PL APO 63 x). Ein Motor in Verbindung mit einem Piezo-Element ermöglichte Bewegungen des Präparats in xyz-Richtung mit einer Genauigkeit von 40 nm. Der Scankopf war auf einem Stativ montiert und enthielt einen Lichtleiter, Linsen, Fluoreszenzfilter, dichroische Spiegel, drei SEVs sowie die Scanvorrichtung. Das Licht eines Krypton/Argon-Lasers mit 75 mW und den Wellenlängen 488 nm, 568 nm oder 647 nm konnte alternierend durch den Lichtleiter über einen dichroischen Spiegel und das Objektiv auf das Präparat fokussiert werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch das Objektiv, ein System aus Spiegeln und zwei Bandpass- sowie einem Langpass-Filter (BP 525/50, BP 600/30 und LP 665) von drei SEVs detektiert. Die Ansteuerung

der Filter, der Spiegel und der Scanvorrichtung erfolgte über einen Personalcomputer. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Licht der Wellenlänge 488 nm verwendet. Für die Experimente wurden die Farbstoffe Oregon Green®488 BAPTA-1 und BODYPI®FL-Verapamil verwendet. Oregon Green®-488-BAPTA-1 wurde iontophoretisch in die Neuronen injiziert (siehe 2.4). Bei Experimenten mit BODYPI®FL-Verapamil wurde das Segmentalganglion für eine Minute in einen 50 µM Farbstoffansatz eingelegt und anschließend in Normalsalzlösung aufbewahrt. BODYPI®FL-Verapamil wurde bei -20 °C lichtgeschützt gelagert, Oregon Green®488-BAPTA-1 bei +7 °C.

2.7 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Experimente wurden in einem geerdeten Faraday-Käfig durchgeführt. Die Segmentalganglien wurden mit zwei Minutiennadeln in einer mit Sylgard (Dow Corning) ausgegossenen Versuchswanne mit einem Volumen von 0,2 ml an den Konnektiven so fixiert, dass die Ventralseite nach oben wies. Die Versuchswanne war über eine Agarbrücke (5% Agar, 3 M KCl) mit einem chlorierten Silberdraht geerdet. Die Glasmikroelektroden wurden mit 3 M KCl gefüllt und wiesen in Normalsalzlösung Widerstände von 20 - 40 MΩ auf. Positionierung und Einstich der Elektrode in das jeweilige Neuron erfolgten mit einem mechanischen Mikromanipulator unter optischer Kontrolle (Binokular, Zeiss). Die Versuchslösungen wurden über eine Durchflussapparatur mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml pro Minute in die Versuchswanne geleitet und mit einer Vakuumkolbenpumpe über eine Glaskapillare wieder abgesaugt. Das Kammervolumen wurde also 10 mal pro Minute ausgetauscht.

Die Messungen wurden mit einem Zweikanal-Tintenschreiber aufgezeichnet (Gould 2200S, USA). Ein Datenerfassungs- und Konvertierungsprogramm (E. von Berg, Institut für Neurobiologie, Universität Düsseldorf) ermöglichte eine digitale Registrierung der Daten sowie die Auswertung mit Microsoft Excel.

2.8 Ernährung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden mit Rinderblut gefüttert, dem direkt nach der Schlachtung die gerinnenden Proteine entnommen wurden. Das Blut wurde in Portionen zu 50 ml in Därme abgefüllt und auf 30 °C erwärmt. Mit der Fütterung wurde ca. 1 Stunde nach Schlachtung des Rindes begonnen. Die Blutaufnahme durch die Blutegel erfolgte innerhalb einer Stunde und führte zu einer Gewichtszunahme der Tiere auf das 6-fache des Ausgangswerts (Abb. 7).

2.9 Versuchslösungen, Fluoreszenzfarbstoffe und Pharmaka

2.9.1 Herstellung der Versuchslösungen

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen ist in Tabelle 1 wiedergegeben. NaCl und HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure; Roth, Karlsruhe) wurden in fester Form eingewogen und in demineralisiertem Wasser gelöst. KCl, MgCl₂ und CaCl₂ wurden aus einer 1 M Stammlösung zugesetzt. Der pH-Wert der Na⁺-haltigen Lösungen wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt, wobei sich die Na⁺-Konzentration um 4 mM erhöhte. Die Osmolalität der Normalsalzlösung betrug 190 - 196 mosmol/kg H₂O und stimmte nahezu mit der Osmolalität der Blutegel-Hämolymphe überein (199,9 ± 2,8 mosmol/kg H₂O; *Hildebrandt & Zerbst-Boroffka* 1992). In der 89 mM K⁺-Lösung war NaCl durch KCl ersetzt, der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 1 M KOH auf 7,4 eingestellt. In der nominell K⁺-freien Lösung war KCl durch NaCl ersetzt. Für Versuchslösungen mit unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen wurde eine nominell K⁺-freie und eine Lösung mit 59 mM K⁺ hergestellt, aus denen Lösungen mit 10, 20 und 30 mM gemischt wurden. Die Osmolalität der Versuchslösungen wurde regelmäßig überprüft.

Die Auswirkungen veränderter osmotischer Bedingungen sowie von Veränderungen in der Zusammensetzung des extrazellulären Ionenmilieus auf spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle wurden mit modifizierten Lösungen näher charakterisiert. Dabei wurden die von *Hildebrandt & Zerbst-Boroffka* (1992) und *Kolb* (1974) ermittelten Werte der Blutegel-

Hämolymph und des Rinderblutes beachtet (Tabelle 3), um die Auswirkungen der Nahrungsaufnahme auf die Funktion der Ca^{2+} -Kanäle zu untersuchen. Zum einen wurden anisotone Lösungen verwendet, in denen die NaCl-Konzentration um 30 mM reduziert oder erhöht war (Osmolalität: 132 bzw. 243 mosmol/kg H_2O). Zum anderen wurden Versuchslösungen mit veränderter Ca^{2+} -Konzentration (0,8 und 4,0 mM) oder verändertem pH-Wert (6,2 und 8,6) verwendet, wobei die Osmolalität unverändert blieb (190 - 196 mosmol/kg H_2O). Alle Versuchslösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (Entsalzungsanlage: Milli Q Reagent Watersystem, Millipore) mit einem spezifischen Widerstand von ca. 18 $\text{M}\Omega \text{ cm}$ angesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Versuchslösungen (Angaben in mM). Alle Lösungen enthielten 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 und 10 mM HEPES

Lösungen	NaCl	KCl
Normalsalzlösung (NSL)	85	4
nom. K^+ -frei	89	-
10 mM K^+	79	10
20 mM K^+	69	20
30 mM K^+	59	30
59 mM K^+	30	59
89 mM K^+	-	89

2.9.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, ihre Konzentration, die Beladungsmethode und die jeweilige Anwendung sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Fluoreszenzfarbstoffe (Bezugsquelle: Molecular Probes)

Fluoreszenzfarbstoff	Konzentration	Beladung	Anwendung
Fura-2	50 mM (wässrige Lösung)	Iontophorese	Ca ²⁺ /Volumen
BODYPI®FL-Verapamil	50 µM (gelöst in NSL)	Inkubation	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle
Oregon Green®488-BAPTA-1	50 mM (wässrige Lösung)	Iontophorese	Volumen

2.9.3 Pharmaka

Verapamil und Diltiazem

Das Phenylalkylamin (±)-Verapamil und das Benzothiazepin (+)-cis-Diltiazem sind Antagonisten von L-Typ Ca²⁺-Kanälen. Die Substanzen wurden als Feststoffe eingewogen und den Versuchslösungen kurz vor Versuchsbeginn zugegeben. Lösungen mit (±)-Verapamil wurden für 5 - 10 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben, um den Lösungsvorgang zu beschleunigen.

Bay K 8644

Das 1,4-Dihydropyridin (-)-(S)-Bay K 8644 wirkt als Agonist von L-Typ Ca²⁺-Kanälen. Von der Substanz wurde eine 250 µM Stammlösung in Ethanol hergestellt, aus der der Agonist in einer Konzentration von 1 µM den Versuchslösungen kurz vor den Versuchen zugegeben wurde. Bei dieser Verdünnung hatte Ethanol (0,4 %) keinen Einfluss auf [Ca²⁺]_i. Die Pharmaka wurden alle bei Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.10 Auswertung der Daten

Die unter identischen Versuchsbedingungen erhaltenen Messwerte sind als arithmetisches Mittel ± Standardabweichung (S.D.) angegeben. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde der t-Test nach Student angewandt. Das Signifikanzniveau wurde zu $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Nahrungsaufnahme des medizinischen Blutegels

Beim medizinischen Blutegel unterliegen Osmolarität und/oder chemische Zusammensetzung des Extrazellulärmediums erheblichen Schwankungen. Bei einer einzigen Mahlzeit nimmt der Blutegel große Mengen an Säugetierblut auf und benötigt dann Monate für dessen Verdauung. Die in Abb. 7 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, dass das Körpergewicht des Blutegels nach einer Mahlzeit innerhalb von ca. 30 Minuten von 5 ± 1 g auf 28 ± 5 g anstieg (vergl. *Lent & Dickinson* 1987). Innerhalb eines Tages reduzierte sich das Körpergewicht bereits wieder auf 18 ± 2 g und blieb dann über die Beobachtungsdauer von 7 Monaten praktisch konstant („saltatorisches Wachstum“). Frühere Untersuchungen zur Nahrungsaufnahme des Blutegels zeigten, dass schon während des Fressvorgangs die Aktivität der Nephridien erhöht wird. Wasser wird ausgeschieden und das Fremdblut im Verdauungstrakt eingedickt (*Boroffka* 1968, *Pütter* 1907). Die mit der Blutmahlzeit aufgenommenen anorganischen Ionen (Tabelle 3) sind bereits nach 24 Stunden in die Hämolymphe überführt. Nach einer Blutmahlzeit nahmen die Konzentrationen von Na^+ und Cl^- in der Hämolymphe zu und damit auch deren Osmolarität (*Wenning* 1980, *Zerbst-Boroffka* 1973).

Tabelle 3: Konzentration anorganischer Ionen (in mM) im Rinderblut und in der Blutegel-Hämolymphe.

anorg. Ionen	Rinderblut	Hämolymphe
Natrium	$113,0 \pm 4,3$	$124,5 \pm 4,2$
Kalium	$10 \pm 0,9$	$5,7 \pm 0,4$
Calcium	$1,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
Magnesium	$2,1 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,2$
Chlorid	$87,5 \pm 2,3$	$40,8 \pm 1,6$

Die Angaben zum Rinderblut stammen von *Kolb* (1974), die zur Blutegel-Hämolymphe von *Hildebrandt & Zerbst-Boroffka* (1992).

Auch unterschiedliche Umweltbedingungen führten zu Änderungen in der chemischen Zusammensetzung der Blutegel-Hämolymphe, beispielsweise Schwankungen des O_2 -Gehalts zu Änderungen des pH-Werts (*Hildebrandt & Zerbst-Boroffka* 1992). Alle diese Änderungen können das Zentralnervensystem beeinflussen und damit das Verhalten des Tieres ändern (*Nicholls & Kuffler* 1964, *Wilson et al.* 1996). Bei langfristigen Änderungen zellulärer Eigenschaften fungiert Ca^{2+} als wichtiger intrazellulärer Bote (*Ghosh et al.* 1993). Da bei Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle eine besondere Rolle bei der Generierung von Ca^{2+} -Signalen spielen (*Dierkes et al.* 1997), wurde primär deren Funktionsweise bei Veränderung der ionalen Zusammensetzung des Extrazellulärmediums untersucht.

3.2 Einfluss der Farbstoffinjektion auf elektrophysiologische Parameter

Fura-2 bindet Ca^{2+} im Bereich physiologischer Ca^{2+} -Konzentrationen ($K_d = 135$ nM; *Grynkiewicz et al.* 1985). Daher führt die Injektion des Farbstoffs zu einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Pufferkapazität. Um mögliche Auswirkungen dieses Effektes zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Parameter, wie Membranruhepotential sowie Frequenz und Amplitude spontan auftretender Aktionspotentiale vor und nach der Farbstoffinjektion ermittelt (Tabelle 4). Nach der Farbstoffinjektion war das Ruhepotential bei allen untersuchten Neuronen hoch signifikant in negative Richtung verschoben. Von den 249 untersuchten Retzius-Neuronen waren 224 spontan aktiv. Bei diesen Zellen war die Amplitude der Aktionspotentiale nach den Injektionen hoch signifikant erhöht und die Frequenz hoch signifikant erniedrigt. Bei N-Neuronen traten spontane Aktionspotentiale nur 1 bis 2 Minuten nach dem Elektrodeneinstich auf. Von 82 untersuchten N1-Neuronen waren 77 spontan aktiv (94 %), von 190 N2-Neuronen nur 123 (65 %). Außerdem war die Frequenz der Aktionspotentiale bei N1-Neuronen größer als bei N2-Neuronen, die Amplituden der Aktionspotentiale unterschieden sich jedoch nicht. Von 147 untersuchten AP-Neuronen waren 114 spontan aktiv. Die Amplitude der Aktionspotentiale war nach der Injektion nicht signifikant verändert, die Aktionspoten-

tialfrequenz war jedoch, wie bei den Retzius-Neuronen, hoch signifikant erniedrigt. Die Veränderungen von Aktionspotentialamplitude und -frequenz waren bei Retzius- und AP-Neuronen bei Verstellung des Membranruhepotentials in negative Richtung zu erwarten. Die Negativierung des Membranruhepotentials wurde somit nicht oder nur zum Teil durch die Ausbildung eines negativen Elektrodenpotentials vorgetäuscht (Dierkes 1994). Bei P- und N-Neuronen konnten keine Aussagen zu Veränderungen der Aktionspotentialfrequenz und -amplitude gemacht werden, da diese Zellen allenfalls kurz nach dem Einstich der Elektrode spontan aktiv waren.

Tabelle 4: Wirkung der Fura-2-Injektion auf das Membranruhepotential (E_m) sowie auf Amplitude (A_{AP}) und Frequenz (F_{AP}) spontan auftretender Aktionspotentiale.

Zelltyp	E_m (mV)		A_{AP} (mV)		F_{AP} (Hz)	
	vor Inj.	nach Inj.	vor Inj.	nach Inj.	vor Inj.	nach Inj.
Retzius	$-37,1 \pm 5,5$	$-42,8 \pm 5,9^{**}$	$18,9 \pm 3,2$	$23,2 \pm 5,3^{**}$	$0,9 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,9^{**}$
P	$-35,5 \pm 5,2$	$-39,9 \pm 7,4^{**}$	-	-	-	-
N1	$-35,2 \pm 5,4$	$-40,1 \pm 6,1^{**}$	$81,5 \pm 23,0$	-	$1,9 \pm 0,6$	-
N2	$-33,9 \pm 3,9$	$-38,5 \pm 4,6^{**}$	$85,3 \pm 16,7$	-	$0,8 \pm 0,6$	-
AP	$-29,4 \pm 23,8$	$-32,2 \pm 6,3^{**}$	$10,9 \pm 3,5$	$11,3 \pm 3,4$	$8,7 \pm 2,1$	$6,0 \pm 2,1^{**}$

Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 77 - 534$ Einzelmessungen. Die vor und 2 Minuten nach der Farbstoffinjektion ermittelten Parameter wurden auf signifikante Unterschiede hin geprüft (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Bei Retzius-Neuronen wurde eine Farbstoffmenge entsprechend einer Gesamtladung von $0,7 - 1,0 \mu\text{C}$ injiziert, bei P-, N- und AP-Neuronen entsprechend einer Gesamtladung von $0,3 - 0,4 \mu\text{C}$.

3.3 Messprotokolle

Um die Wirkung von Blockern von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen zu untersuchen, wurde die extrazelluläre K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_a$) von 4 auf 89 mM erhöht. Der resultierende K^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ist auf eine Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zurückzuführen (Dierkes et al. 1997, Hochstrate et al. 1995). Dieser $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg ist völlig reversibel und mehrfach nacheinander auslösbar, wobei eine signifikante Änderung der Amplitude nicht zu beobachten war (Abb. 11; Hochstrate et al. 1995).

Zur Bestimmung der Schwellenkonzentration, bei der ein K^+ -induzierter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg gerade detektierbar ist, wurde $[\text{K}^+]_a$ stufenweise für jeweils 5 Minuten verändert (Dierkes et al. 1997, Hochstrate et al. 1995). In den Experimenten wurde $[\text{K}^+]_a$ zunächst von 4 auf 0 mM erniedrigt und dann stufenweise auf 4, 10, 20, 30 und 59 mM erhöht.

3.4 K^+ -induzierte Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter isotonen Bedingungen

3.4.1 Einfluss von Fura-2 auf die cytosolische Ca^{2+} -Pufferkapazität

Für die Experimente mit dem CCD-System wurden mehrere Neuronen nacheinander mit Fura-2 beladen. Da manche Neuronen den Farbstoff relativ schnell wieder verlieren (Munsch & Deitmer 1995, Wüsten 2003), war es wichtig genügend Farbstoff zu injizieren, ohne jedoch die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität all zu sehr zu erhöhen. Durch Erhöhung der Ca^{2+} -Pufferkapazität können beispielsweise $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen in ihrer Kinetik oder Amplitude deutlich verändert werden (Hochstrate & Schlue 1995, Takahashi et al. 1999). Um den Einfluss der Farbstoffinjektion auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität zu untersuchen, wurden die Neuronen mit Farbstoffmengen entsprechend einer Gesamtladung von 0,1 - 1,2 μC beladen und Amplitude (R_{peak}) sowie Anstiegskinetik (time-to-peak; ttp) des durch 89 mM K^+ hervorgerufenen Anstiegs von R ermittelt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Einfluss der injizierten Farbstoffmenge auf Amplitude (R_{peak}) und Anstiegszeit (ttp in s) des K^+ -induzierten Anstiegs von R (360/380) bei den untersuchten Neuronentypen.

Injektion (μC)	Retzius	P	N	AP
	R_{peak} (ttp)	R_{peak} (ttp)	R_{peak} (ttp)	R_{peak} (ttp)
0,1 (n = 5)	$1,39 \pm 0,06$ (49 $\pm$ 9)	$0,94 \pm 0,04$ (34 $\pm$ 9)	$1,67 \pm 0,15$ (28 $\pm$ 10)	$1,20 \pm 0,12$ (38 $\pm$ 7)
0,2 (n = 10)	$1,38 \pm 0,24$ (49 $\pm$ 16)	$0,90 \pm 0,09$ (35 $\pm$ 7)	$1,65 \pm 0,15$ (29 $\pm$ 10)	$1,16 \pm 0,12$ (39 $\pm$ 4)
0,4 (n = 14)	$1,36 \pm 0,07$ (50 $\pm$ 17)	$0,93 \pm 0,07$ (35 $\pm$ 9)	$1,63 \pm 0,15$ (28 $\pm$ 12)	$1,13 \pm 0,12$ (39 $\pm$ 6)
0,6 (n = 18)	$1,40 \pm 0,05$ (51 $\pm$ 15)	$0,90 \pm 0,05$ (35 $\pm$ 9)	$1,63 \pm 0,06$ (30 $\pm$ 7)	$1,14 \pm 0,19$ (38 $\pm$ 13)
0,8 (n = 22)	$1,38 \pm 0,11$ (53 $\pm$ 15)	$0,82 \pm 0,10$ ** (50 $\pm$ 20)	$1,48 \pm 0,12$ * (34 $\pm$ 7)	$0,99 \pm 0,11$ * (42 $\pm$ 7)
1,0 (n = 16)	$1,32 \pm 0,20$ (56 $\pm$ 21)	$0,74 \pm 0,25$ ** (52 $\pm$ 13 **)	$1,40 \pm 0,23$ * (33 $\pm$ 5)	$0,98 \pm 0,18$ * (47 $\pm$ 6)
1,2 (n = 13)	$1,31 \pm 0,08$ (55 $\pm$ 24)	$0,73 \pm 0,19$ ** (58 $\pm$ 12 **)	$1,43 \pm 0,23$ * (37 $\pm$ 0,1)	$0,99 \pm 0,14$ * (50 $\pm$ 8 *)

Angegeben sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus n = 5 - 22 Einzelmessungen. Die Erhöhung der $[K^+]_a$ von 4 auf 89 mM erfolgte für 1 Minute. Als Bezug für die statistische Prüfung dienten jeweils die bei einer Injektion von 0,1 μC erhaltenen Daten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Die nach Farbstoffinjektion zwischen 0,2 und 1,2 μC ermittelten Messdaten wurden auf signifikante Unterschiede zu den bei der geringsten Injektion (0,1 μC) erhaltenen Messdaten geprüft, da bei dieser Farbstoffmenge ein Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferkapazität zu vernachlässigen sein sollte (Dierkes 1998). Bei Retzius-Neuronen hatte die Variation der Farbstoffinjektion keinen signifikanten Einfluss auf Amplitude oder Kinetik des K^+ -induzierten Ratio-Anstiegs. Dies traf bis zu einer Farbstoffmenge

von 0,6 μC auch bei P-, N- und AP-Neuronen zu. Jedoch kam es bei diesen drei Neuronentypen ab einer Farbstoffmenge von 0,8 μC zu einer signifikanten Abnahme der Signalamplitude. Bei P-Neuronen verminderte sich die Anstiegszeit ab einer Farbstoffmenge von 1,0 μC und bei AP-Neuronen ab einer Farbstoffmenge von 1,2 μC . Bei N-Neuronen hingegen war die Anstiegszeit nicht signifikant verändert.

3.4.2 K^+ -induzierte Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Die Wirkung veränderter $[\text{K}^+]_a$ auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter isotonen Bedingungen bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen ist in Abb. 8 dargestellt. Bei Retzius-, N- und AP-Neuronen setzte ein $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$ ein, bei P-Neuronen bei $[\text{K}^+]_a = 30 \text{ mM}$. Die Amplituden der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege waren für jede $[\text{K}^+]_a$ -Stufe bei N-Neuronen am größten und bei P-Neuronen am kleinsten. Bei $[\text{K}^+]_a = 59 \text{ mM}$ ergab sich anhand der Amplituden folgende Reihung: $\text{N} > \text{Retzius} > \text{AP} \geq \text{P}$. Die K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege waren innerhalb von ca. 10 Minuten bei allen Neuronen völlig reversibel (Tabelle 6). Bei $[\text{K}^+]_a = 20$ bzw. 30 mM erreichte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ innerhalb der 5-minütigen Applikationsdauer ein konstantes Plateau. Bei N-Neuronen wurden bei $[\text{K}^+]_a = 30 \text{ mM}$ gelegentlich transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege registriert (Abb. 8A). Bei $[\text{K}^+]_a = 59 \text{ mM}$ wurde bei N- und P-Neuronen das Maximum bereits nach ca. 60 Sekunden erreicht. Anschließend war insbesondere bei N-Neuronen ein Abfall zu beobachten, wobei innerhalb der Applikationsdauer kein Plateau erreicht wurde. Transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege traten bei Retzius- und AP-Neuronen nicht und bei P-Neuronen nur vereinzelt auf. Das transiente Verhalten bei $[\text{K}^+]_a = 59 \text{ mM}$ ist in Abb. 8B quantifiziert. Es ist zu erkennen, dass die Differenz zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ am Ende der Applikationszeit ($R_{5\text{min}}$) und dem Maximalwert (R_{peak}) mit der Amplitude des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs zunahm. Analog durchgeführte Experimente bei Retzius- und P-Neuronen mit dem SEV-System führten zu qualitativ identischen Resultaten (siehe Abb. 17B, 18B).

Tabelle 6: R (360/380) bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen bei Variation von $[K^+]_a$.

$[K^+]_a$ (mM)	Retzius	P	N	AP
4	$0,415 \pm 0,03$	$0,382 \pm 0,01$	$0,410 \pm 0,02$	$0,422 \pm 0,03$
0	$0,396 \pm 0,02$	$0,385 \pm 0,02$	$0,398 \pm 0,02$	$0,421 \pm 0,04$
4	$0,391 \pm 0,02$	$0,383 \pm 0,02$	$0,400 \pm 0,02$	$0,413 \pm 0,03$
10	$0,388 \pm 0,02$	$0,382 \pm 0,02$	$0,404 \pm 0,02$	$0,413 \pm 0,02$
20	$0,418 \pm 0,04$	$0,386 \pm 0,02$	$0,484 \pm 0,04$	$0,461 \pm 0,03$
30	$0,548 \pm 0,08$	$0,405 \pm 0,02$	$0,583 \pm 0,07$	$0,546 \pm 0,05$
59	$0,845 \pm 0,17$	$0,545 \pm 0,04$	$0,978 \pm 0,10$	$0,659 \pm 0,04$
4	$0,438 \pm 0,05$	$0,400 \pm 0,02$	$0,440 \pm 0,04$	$0,460 \pm 0,04$

Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus $n = 16 - 21$ Messungen mit dem CCD-System. Die Durchführung der Experimente ist in Abb. 8A illustriert.

3.4.3 K^+ -induzierte Volumenänderungen

Zur mikrofluorimetrischen Messung von Volumenänderungen eignen sich Fluoreszenzfarbstoffe, deren Fluoreszenzemission nur von der Farbstoffkonzentration, nicht jedoch von Veränderungen des cytosolischen Milieus abhängt. Diese Bedingung ist bei Fura-2 am Isofluarpunkt bei 360 nm (F_{360}) erfüllt (Abb. 4). In Abb. 9 ist eine simultane Messung von Zellvolumen und $[Ca^{2+}]_i$ bei einem Retzius-Neuron dargestellt. Die Erhöhung von $[K^+]_a = 20$ mM oder höher führte zu einem deutlichen Abfall von F_{360} , der nach Rückwechsel in $[K^+]_a = 4$ mM weitgehend reversibel war (Abb. 9A). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Blutegel-Neuronen einen Farbstoffverlust aufweisen, vermutlich bedingt durch Auswärtstransport, der sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben lässt (Munsch & Deitmer 1995, Wüsten 2003). Um den Farbstoffverlust zu quantifizieren, wurde F_{360} über 15 Minuten unter physiologischen Bedingungen gemessen und der Abfall des Signals durch eine Exponentialfunktion approximiert (rote Linie in Abb. 9A), die dann zur Isolierung der Volumen-bedingten Fluoreszenzänderungen genutzt wurde (Abb. 9B). Der Abfall von F_{360} setzte wie der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, bei

$[K^+]_a = 20 \text{ mM}$ ein (Abb. 9A, C). Bei $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ lag das Zellvolumen nach 5-minütiger Applikation ca. 60 % über dem Ausgangsvolumen, ohne jedoch ein Plateau, im Unterschied zu $[Ca^{2+}]_i$, erreicht zu haben.

Die Lage der Neuronen wurde nach jedem Experiment kontrolliert. Retzius-Neuronen zeigten dabei nur geringe Veränderungen, während P-Neuronen sich erheblich verschoben und sich manchmal sogar außerhalb des Messareals befanden. Daher wurden Volumenmessungen ausschließlich bei Retzius-Neuronen durchgeführt.

3.4.4 K^+ -induzierte E_m -Änderungen

In Abb. 10 sind Registrierbeispiele von K^+ -induzierten E_m -Änderungen bei Retzius- und P-Neuronen dargestellt. Der Entzug des extrazellulären K^+ führte bei Retzius-Neuronen zu einer leichten Membranhyperpolarisation um 5 bis 10 mV, bei P-Neuronen zu einer stärkeren Membranhyperpolarisation um 10 bis 18 mV. Dabei wurde ein stationäres E_m während der 5-minütigen Applikation von K^+ -freier Lösung nicht erreicht. Unmittelbar nach Rückwechsel auf $[K^+]_a = 4 \text{ mM}$ trat bei Retzius-Neuronen eine starke transiente Membranhyperpolarisation auf. Ein vergleichbarer Effekt war bei P-Neuronen nur selten zu beobachten. Die Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 20 mM oder höher führte bei P-Neuronen zu raschen Membrandepolarisationen, die bereits nach ca. 1 Minute stationär waren. Bei Retzius-Neuronen erfolgte unter diesen Bedingungen ebenfalls eine rasche Membrandepolarisation, ein stabiles Plateau wurde aber nur in ca. 50 % der Messungen erreicht. In den übrigen Experimenten erfolgte eine langsame Verstellung des E_m in positive Richtung um etwa 4 mV innerhalb der 5-minütigen Applikationsdauer.

3.5 Pharmakologische Eigenschaften der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle bei Vertebraten lassen sich anhand biophysikalischer und pharmakologischer Eigenschaften in L-, N-, P-, Q-, R und T-Typ Kanäle einteilen (Dunlap et al. 1995, Mannhold 1995). Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, die bei den meisten wenn nicht allen Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels exprimiert sind, zeigen Eigenschaften, die denen von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen bei Vertebraten ähneln (Beck et al. 2001, Dierkes 1998, Wang et al. 1999, Wende 2000). Die Ca^{2+} -Kanäle werden erst durch starke Membrandepolarisationen aktiviert, bleiben auch bei langanhaltender Membrandepolarisation aktiv und werden durch verschiedene polyvalente Kationen sowie durch Menthol blockiert (Dierkes et al. 1998, Hochstrate et al. 1995). Pharmakologische Untersuchungen wurden meist an Retzius-Neuronen durchgeführt (Hochstrate et al. 1995).

3.5.1 Wirkung der L-Typ Antagonisten Diltiazem und Verapamil

Um den Effekt der L-Typ Antagonisten Diltiazem (Benzothiazepin) und Verapamil (Phenylalkylamin) auf die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle von Blutegel-Neuronen zu untersuchen, wurden die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege miteinander verglichen, die durch einen 1-minütigen 89 mM K^+ -Puls in der Vorkontrolle und in Gegenwart des Antagonisten induziert wurden. Die Methode setzt voraus, dass die Amplitude des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs bei wiederholter Auslösung konstant bleibt. Um dies zu prüfen, wurden in einem Abstand von 10 Minuten 89 mM K^+ -Pulse appliziert (Abb. 11). In Tabelle 7 sind die durch 5 aufeinanderfolgende K^+ -Pulse induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege (ΔR_{peak}) wiedergegeben. Die Daten zeigen, dass die K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege tatsächlich bei allen Neuronen wiederholt auslösbar waren.

Tabelle 7: $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege induziert durch aufeinanderfolgende K^+ -Pulse.

Pulsnummer	Retzius ΔR_{peak}	P ΔR_{peak}	N ΔR_{peak}	AP ΔR_{peak}
1	$1,01 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,02$
2	$0,94 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,11$	$1,48 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,01$
3	$0,98 \pm 0,14$	$0,61 \pm 0,09$	$1,50 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,03$
4	$1,10 \pm 0,22$	$0,60 \pm 0,13$	$1,55 \pm 0,16$	$0,43 \pm 0,04$
5	$1,08 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,04$	$1,56 \pm 0,12$	$0,42 \pm 0,05$

Angegeben sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs (ΔR_{peak}) für 5 aufeinanderfolgende K^+ -Pulse aus $n = 8 - 12$ Messungen mit dem CCD-System. Die Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 89 mM erfolgte jeweils für 1 Minute, der Pulsabstand betrug 10 Minuten.

In Gegenwart der L-Typ Antagonisten Diltiazem und Verapamil (je 100 μ M) war bei den untersuchten Neuronentypen der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vermindert, während die Anstiegsgeschwindigkeit konstant blieb (Abb. 12). Bei allen untersuchten Neuronen war die blockierende Wirkung von Verapamil signifikant größer als die von Diltiazem. Zudem war die blockierende Wirkung beider Antagonisten bei P- und N-Neuronen meist signifikant größer als bei Retzius- und AP-Neuronen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Blockade des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs durch L-Typ Antagonisten.

L-Typ-Ca^{2+}-Antagonist	Retzius rel.ΔR	P rel.ΔR	N rel.ΔR	AP rel.ΔR
Diltiazem	$0,55 \pm 0,21$ (n = 8)	$0,36 \pm 0,14 *$ (n = 8)	$0,31 \pm 0,18 *$ (n = 6)	$0,44 \pm 0,07$ (n = 4)
Verapamil	$0,36 \pm 0,22$ (n = 7)	$0,13 \pm 0,15 *$ (n = 4)	$0,24 \pm 0,21$ (n = 6)	$0,32 \pm 0,24$ (n = 9)

Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 4 - 9$ Messungen mit dem CCD-System. Angegeben sind die Verhältnisse (rel. ΔR) zwischen den Ratio-Anstiegen in Gegenwart des Antagonisten und in der Vorkontrolle. Die $[K^+]_a$ -Erhöhung auf 89 mM erfolgte für 1 Minute. Signifikante Unterschiede zum Effekt der Antagonisten bei Retzius-Neuronen sind in der Tabelle gekennzeichnet (* = $p < 0,05$).

3.5.2 Wirkung des L-Typ Agonisten Bay K 8644

Die Offenwahrscheinlichkeit von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen bei Vertebraten wird durch das 1,4 Dihydropyridin (-)(S)-Bay K 8644 erhöht und damit auch der Ca^{2+} -Einstrom durch die Kanäle. Dabei zeigt bereits eine geringe Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eine signifikante Wirkung (Kim & Chung 1999, Maruya et al. 2003). Die Wirkung dieses L-Typ Agonisten bei Blutegel-Neuronen wurde bislang nicht beschrieben.

Tabelle 9: Wirkung des L-Typ Agonisten Bay K 8644 auf den K^{+} -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen.

$[\text{K}^{+}]_a \text{ (mM)}$		Retzius	P	N	AP
4	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,415 \pm 0,03$	$0,382 \pm 0,01$	$0,410 \pm 0,02$	$0,422 \pm 0,03$
	R_{Agonist}	$0,415 \pm 0,01$	$0,396 \pm 0,04$	$0,423 \pm 0,05$	$0,442 \pm 0,03$
0	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,396 \pm 0,02$	$0,385 \pm 0,02$	$0,398 \pm 0,02$	$0,421 \pm 0,04$
	R_{Agonist}	$0,416 \pm 0,01$	$0,398 \pm 0,03$	$0,398 \pm 0,02$	$0,442 \pm 0,03$
4	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,391 \pm 0,02$	$0,383 \pm 0,02$	$0,400 \pm 0,02$	$0,413 \pm 0,03$
	R_{Agonist}	$0,409 \pm 0,04$	$0,390 \pm 0,04$	$0,411 \pm 0,03$	$0,433 \pm 0,04$
10	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,388 \pm 0,02$	$0,382 \pm 0,02$	$0,404 \pm 0,02$	$0,413 \pm 0,02$
	R_{Agonist}	$0,379 \pm 0,04$	$0,384 \pm 0,05$	$0,410 \pm 0,03$	$0,444 \pm 0,04$
20	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,418 \pm 0,04$	$0,386 \pm 0,02$	$0,484 \pm 0,04$	$0,461 \pm 0,03$
	R_{Agonist}	$0,503 \pm 0,07^{**}$	$0,396 \pm 0,04$	$0,560 \pm 0,14^{**}$	$0,549 \pm 0,04^{**}$
30	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,548 \pm 0,08$	$0,405 \pm 0,02$	$0,583 \pm 0,07$	$0,546 \pm 0,05$
	R_{Agonist}	$0,849 \pm 0,14^{**}$	$0,450 \pm 0,07^{**}$	$0,738 \pm 0,16^{**}$	$0,637 \pm 0,10^{**}$
59	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,845 \pm 0,17$	$0,545 \pm 0,04$	$0,978 \pm 0,10$	$0,659 \pm 0,04$
	R_{Agonist}	$1,131 \pm 0,20^{*}$	$0,654 \pm 0,15^{**}$	$0,981 \pm 0,14^{**}$	$0,785 \pm 0,10^{**}$
4	$R_{\text{Kontr.}}$	$0,438 \pm 0,05$	$0,400 \pm 0,02$	$0,440 \pm 0,04$	$0,460 \pm 0,04$
	R_{Agonist}	$0,468 \pm 0,10$	$0,412 \pm 0,06$	$0,465 \pm 0,05$	$0,473 \pm 0,08$

Angegeben sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) der K^{+} -induzierten Ratio-Anstiege unter Kontrollbedingungen ($R_{\text{Kontr.}}$) und in Gegenwart von Bay K 8644 (R_{Agonist}) bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen ($n = 15 - 21$, CCD-System). Signifikante Unterschiede zwischen $R_{\text{Kontr.}}$ und R_{Agonist} sind in der Tabelle gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Wie Daten in Abb. 13 und Tabelle 9 zeigen, war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei allen vier untersuchten Neuronen in Gegenwart von Bay K 8644 signifikant verstärkt. Der Vergleich der Spuren in Abb. 13 A, B zeigt zudem, dass die Anstiegsgeschwindigkeit bei den einzelnen K^+ -Stufen erhöht war. Dagegen blieb die Schwelle des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs in Gegenwart von Bay K 8644 erhalten, ebenso wie dessen Reversibilität. Bay K 8644 hatte selbst keine Wirkung auf $[Ca^{2+}]_i$.

3.5.3 Lokalisierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle

Der L-Typ Antagonist Verapamil bindet an die porenbildenden α_1 -Untereinheiten (Yamaguchi *et al.* 2003). Um Aussagen zur Lokalisation der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle im Blutegel-Zentralnervensystem zu erhalten, wurden Segmentalganglien in Normalsalzlösung mit 50 μ M BODYPI®FL-Verapamil, einem fluoreszierenden Verapamilderivat für 1 Minute inkubiert. Die konfokalen Aufnahmen der inkubierten Segmentalganglien zeigen, dass die Fluoreszenz des Verapamilderivats nicht auf die Plasmamembran der Neuronen beschränkt ist, sondern dass auch im Cytosol eine deutliche Fluoreszenz auftrat (Abb. 14A). Bei höherer Vergrößerung zeigte sich jedoch eine stärkere Anfärbung der Neuronen im Bereich der Plasmamembran (Abb. 14B).

3.6 Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$, E_m und Zellvolumen

Hyponaträmie und eine erniedrigte Osmolarität vergrößern die Aktivität spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in den Pyramidenzellen des Rattenhippocampus und steigern damit deren Erregbarkeit, wohingegen Hypernaträmie und eine verringerte Osmolarität die Kanalaktivität verringern (Huang & Somjen 1997, Somjen 1999). Durch Änderungen des Zellvolumens können mechanosensitive Kanäle aktiviert werden, zum Beispiel dehnungsaktivierte Kationen-Kanäle durch eine Zellschwellung (Sachs 1992). Derartige Kanäle wurden auch bei Blutegel-Neuronen gefunden (Pellegrino *et al.* 1990).

3.6.1 $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei Retzius, P, N, AP

Registrierbeispiele, gemessen mit dem CCD-System, zur Wirkung anisotoner Bedingungen auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen sind in Abb. 15A, B und entsprechende Messungen mit dem SEV-System bei Retzius- und P-Neuronen in Abb. 17 und 18 gezeigt. Unter hypotonen Bedingungen (-30 mM NaCl) blieb die Schwelle des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs erhalten (Abb. 15A), jedoch waren die Anstiege ab $[K^+]_a = 20$ mM (N, Retzius) bzw. 30 mM (AP, P) signifikant vergrößert (Abb. 16). Wie unter Kontrollbedingungen (Abb. 8A) waren auch unter hypotonen Bedingungen die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege innerhalb von etwa 10 Minuten reversibel. Unter hypertonen Bedingungen (+30 mM NaCl) blieb die Schwelle des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei Retzius-, N- und AP-Neuronen ebenfalls erhalten, während sie bei P-Neuronen auf $[K^+]_a = 59$ mM erhöht war (Abb. 15B). Bei allen Neuronen waren die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege verringert, wobei signifikante Unterschiede erst bei $[K^+]_a = 59$ mM auftraten (Abb. 16).

Die in Abb. 15 wiedergegebenen Daten zeigen darüber hinaus, dass der transiente Charakter des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals bei $[K^+]_a = 59$ mM unter hypotonen Bedingungen verstärkt und unter hypertonen Bedingungen reduziert war (Tabelle 10). Diese Veränderungen stehen in Einklang mit dem bereits beschriebenen Befund, dass der transiente Charakter allgemein mit der Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zunimmt (Abb. 8B).

Tabelle 10: Häufigkeit transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei $[K^+]_a = 59$ mM.

	Retzius	P	N	AP
	$n_{trans.}/n_{ges.}$	$n_{trans.}/n_{ges.}$	$n_{trans.}/n_{ges.}$	$n_{trans.}/n_{ges.}$
+ 30 mM NaCl	4 / 16	6 / 20	6 / 9	0 / 6
Kontrolle	2 / 30	14 / 30	8 / 12	0 / 7
- 30 mM NaCl	12 / 17	18 / 33	12 / 12	1 / 8

Angegeben ist die Anzahl der transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege ($n_{trans.}$) sowie die Gesamtzahl der Messungen ($n_{ges.}$).

Die K^+ -induzierte Depolarisation von Retzius- und P-Neuronen war unter hypotonen Bedingungen verstärkt (Abb. 17 - 19). Im Mittel war E_m bei den verschiedenen $[K^+]_a$ um 6 mV positiver als unter Kontrollbedingungen. Hypertone Bedingungen hatten jedoch bei den beiden Neuronen keinen Einfluss auf das Ruhe- E_m und die K^+ -induzierte Membrandepolarisation (Abb. 19B).

3.6.1 Zellvolumen von Retzius-Neuronen

Der Wechsel in hypotone Versuchslösung (-30 mM NaCl) führte zu Zellschwellungen um 20 - 30 %. Die anschließende Entfernung des extrazellulären K^+ hatte keinen Einfluss auf das Zellvolumen, die Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 10, 20, 30 und 59 mM löste dagegen jeweils eine weitere Zellschwellung aus. Beim Übergang auf $[K^+]_a = 4$ mM wurde eine Verzögerung der Volumenabnahme beobachtet (Abb. 20A). Der Wechsel in hypertone Versuchslösung (+30 mM NaCl) führte zu Zellschrumpfungen um 15 - 20 %. Die Entfernung des extrazellulären K^+ hatte wiederum keinen Effekt, während Erhöhung von $[K^+]_a$ zu einer Wiedezunahme des Zellvolumens führte, allerdings erst ab $[K^+]_a = 20$ mM. Bei höheren $[K^+]_a$ stieg das Zellvolumen weiter an und lag bei 59 mM sogar deutlich über dem Ausgangswert in isotoner Lösung. Beim Übergang auf $[K^+]_a = 4$ mM konnte eine rasche Volumenabnahme beobachtet werden und beim Rückwechsel in isotone Versuchslösung trat eine zeitweilige Zellschwellung über das Ausgangsvolumen hinaus auf (overshoot; Abb. 20C).

In Tabelle 11 sind die Änderungen des relativen Zellvolumens ($\Delta Vol_{rel.}$) für die einzelnen Schritte des K^+ -Stufenprotokolls wiedergegeben. Unter hypotonen Bedingungen trat ein Volumenanstieg bereits bei geringeren $[K^+]_a$ auf als unter hypertonen Bedingungen. Die K^+ -induzierten Zellschwellungen waren sowohl unter isotonen als auch unter anisotonen Bedingungen nur partiell reversibel.

Tabelle 11: K^+ -induzierte Änderungen des Zellvolumens von Retzius-Neuronen unter unterschiedlichen osmotischen Bedingungen.

K^+ -Schritte (mM)	4 → 0	0 → 4	4 → 10	10 → 20	20 → 30	30 → 59	59 → 4
	$\Delta Vol_{rel.}$	$\Delta Vol_{rel.}$	$\Delta Vol_{rel.}$	$\Delta Vol_{rel.}$	$\Delta Vol_{rel.}$	$\Delta Vol_{rel.}$	$\Delta Vol_{rel.}$
+ 30 mM NaCl	0 ± 6	1 ± 8	2 ± 8	6 ± 10	14 ± 12	13 ± 9	-20 ± 11
Kontrolle	-1 ± 2	2 ± 3	5 ± 5	10 ± 7	20 ± 17	26 ± 33	-26 ± 21
- 30 mM NaCl	2 ± 4	1 ± 3	7 ± 6	17 ± 14	27 ± 24	9 ± 39	-25 ± 12

Angegeben sind Mittelwerte ($\pm$ S.D.) der Änderungen des relativen Zellvolumens ($\Delta Vol_{rel.}$, in %) aus $n = 4 - 8$ Messungen. Das Volumen wurde 5 Minuten nach dem Übergang in die jeweilige Lösung bestimmt. Als Bezugswert für das während der jeweiligen K^+ -Stufe erreichte Volumen diente das in der vorangegangenen Stufe erreichte Volumen.

Morphologische Darstellung K^+ -induzierter Änderungen des Zellvolumens unter isotonen und anisotonen Bedingungen

In Tabelle 12 sind die maximalen Querschnittsflächen von Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen bei isotoner Erhöhung von $[K^+]_a$ von 4 auf 59 mM und zurück wiedergegeben. Von den untersuchten Neuronentypen hatten Retzius-Neuronen den größten Zellquerschnitt und N-Neuronen den kleinsten. Durch die Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM kam es bei allen Neuronen zu einer Vergrößerung der Zellfläche, wobei die relative Zunahme bei Retzius-Neuronen am größten und bei N-Neuronen am kleinsten war. Bei allen Neuronen wurde nach Rückwechsel auf $[K^+]_a = 4$ mM die Ausgangsfläche wieder erreicht.

Tabelle 12: Querschnittsflächen von Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen bei Erhöhung von $[K^+]_a$ von 4 auf 59 mM und zurück.

$[K^+]_a$ (mM)	Retzius	P	N	AP
4	5707 ± 619	2323 ± 225	1880 ± 636	3048 ± 719
59	6653 ± 309	2957 ± 239	2227 ± 722	3863 ± 710
4	5622 ± 364	2497 ± 61	1886 ± 631	3082 ± 797

Angegeben sind die maximalen Querschnittsflächen der Zellkörper in μm^2 . Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus $n = 5 - 7$ Messungen. Die Werte wurden 9 Minuten nach Veränderung von $[K^+]_a$ mit Hilfe eines konfokalen Laser-Mikroskops gemessen.

Aus den Querschnittsflächen lassen sich unter Annahme einer Kugelgeometrie die Zellvolumina berechnen. Dabei ergaben sich für die untersuchten Neuronentypen unter Ruhebedingungen folgende Volumina: Retzius-Neuronen: $3,24 \pm 0,53 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$, P-Neuronen: $0,8 \pm 0,32 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$, N-Neuronen: $0,6 \pm 0,56 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$ und AP-Neuronen: $1,25 \pm 0,61 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$. Das hier ermittelte Volumen von Retzius-Neuronen entsprach dem Wert früherer Untersuchungen (*Schlue et al.* 1997). Nach Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM ergaben sich folgende Volumina: Retzius-Neuronen: $4,0 \pm 0,35 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$ (+ 23 %), P-Neuronen: $1,2 \pm 0,28 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$ (+ 27 %), N-Neuronen: $0,8 \pm 0,64 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$ (+ 16 %) und AP-Neuronen: $1,8 \pm 0,20 \cdot 10^{-7} \text{cm}^3$ (+ 23 %).

Die K^+ -induzierten Veränderungen des relativen Zellquerschnitts unter isotonen und anisotonen Bedingungen sind in Abb. 22 zusammenfassend dargestellt. Unter isotonen Bedingungen erfolgten die K^+ -induzierten Änderungen relativ rasch. Bei P-, N- und AP-Neuronen waren die maximalen Änderungen bereits nach 1 Minute erreicht, bei Retzius-Neuronen hingegen etwas später (vergl. Abb. 20). P-Neuronen zeigten in Gegenwart von $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ eine Wiederabnahme des Zellquerschnitts. Die K^+ -induzierten Veränderungen des Zellquerschnitts waren schnell reversibel (Abb. 22A).

Die Änderung der Osmolarität induzierte je nach Richtung eine Zu- oder Abnahme des Zellquerschnitts. Die K^+ -induzierten Änderungen waren unter anisotonen Bedingungen unverändert, allerdings war bei P-Neuronen eine Abnahme der relativen Zellfläche bei längerer Applikation von $[K^+]_a = 59$ mM nicht zu beobachten.

Änderungen von $[K^+]_a$ und der extrazellulären Osmolarität führen auch zu Änderungen des Zellkernquerschnitts. In Abb. 23A - C sind konfokale Aufnahmen von Zellkernen von Retzius-Neuronen sowie in Abb. 23D die statistische Auswertung dargestellt. Nach Erhöhung von $[K^+]_a$ war die Querschnittsfläche der Zellkerne reversibel vergrößert. Die Änderung der Osmolarität induzierte je nach Richtung eine Zu- oder Abnahme des Zellkernschnitts um bis zu 20 %. Die K^+ -induzierten Änderungen des Kernquerschnitts waren unter hypertonen Bedingungen unverändert, unter hypotonen Bedingungen dagegen deutlich vermindert.

3.7 Einfluss von pH_a und $[Ca^{2+}]_a$ auf die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle

3.7.1 Einfluss des pH_a auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei Retzius- und P-Neuronen

Neuronale Aktivität kann Änderungen des intra- und extrazellulären pH-Werts (pH_i , pH_a) hervorrufen, die ihrerseits zur Modulation des zellulären Metabolismus oder von Ionenkanälen führen (Chesler & Kaila 1992, Roos & Boron 1981, Traynelis & Cull-Candy 1990). Insbesondere Veränderungen von pH_a modulieren die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen bei den unterschiedlichsten Zelltypen (Ohmori & Yoshii 1977, Tombaugh & Somjen 1997), so auch bei den Retzius-Neuronen im Zentralnervensystem des Blutegeles (Hochstrate et al. 2001a).

Registrierbeispiele zur Beeinflussung des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs durch pH_a bei Retzius- und P-Neuronen sind in Abb. 24 und 25 gezeigt. Bei $pH_a = 8,6$ war der $[Ca^{2+}]_i$ -

Anstieg bei beiden Neuronen insgesamt vergrößert und bei $\text{pH}_a = 6,2$ verkleinert, wobei jedoch die Effekte nicht bei jeder $[\text{K}^+]_a$ signifikant waren (Abb. 26A). Bei beiden Neuronentypen war die Schwelle zur Auslösung eines $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $\text{pH}_a = 8,6$ zu niedrigeren und bei $\text{pH}_a = 6,2$ zu höheren $[\text{K}^+]_a$ verschoben. Bei Retzius-Neuronen löste die Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ auf 20, 30 und 59 mM bei $\text{pH}_a = 8,6$ transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege aus.

Bei Retzius-Neuronen wurden das Ruhe- E_m sowie die K^+ -induzierten Membrandepolarisationen durch pH_a nicht beeinflusst (Abb. 26B). Bei P-Neuronen führte dagegen die Erhöhung von pH_a zu einer leichten Depolarisation und die Erniedrigung zu einer leichten Hyperpolarisation (Abb. 26B). Die transiente Membranhyperpolarisation beim Wechsel von $[\text{K}^+]_a = 4$ auf 0 mM war sowohl bei $\text{pH}_a = 8,6$ als auch 6,2 deutlich reduziert (Abb. 25A, C).

3.7.2 Einfluss von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m

In Zentralnervensystemen kann es durch synaptische Aktivität zur Erniedrigung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ kommen. Die Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ können in Neuronen Ionenkanäle, Neurotransmitter-Rezeptoren und speziell Ca^{2+} -sensitive Rezeptoren (CaSR) beeinflussen (Cohen & Fields 2004). Die Beeinflussung von Ionenkanälen durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ kann zum Beispiel durch die Veränderung des extrazellulären Oberflächenpotentials der Plasmamembran erfolgen (Piccolino & Pignatelli 1996, Wilson et al. 1983), wie es auch bei Retzius-Neuronen gezeigt wurde (Hochstrate et al. 2001b).

Registrierbeispiele, gemessen mit dem CCD-System, zum Einfluss von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen sind in Abb. 27A, B und entsprechende Messungen mit dem SEV-System bei Retzius- und P-Neuronen in Abb. 29 und 30 gezeigt. Die Veränderung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ von 2 mM auf 0,8 oder 4 mM hatte keinen Einfluss auf die Schwelle zur Auslösung eines $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs, jedoch

waren die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8$ mM minimal vergrößert und bei $[Ca^{2+}]_a = 4$ mM minimal verkleinert (Abb. 28, 31).

Der Vergleich der Neuronentypen untereinander zeigte deutliche Unterschiede in der Häufigkeit transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei der Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM (Tabelle 13). Insgesamt ist die Tendenz zu erkennen, dass transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege eher bei niedriger als bei hoher $[Ca^{2+}]_a$ auftreten. Der Zusammenhang zwischen der Ausprägung des transienten Charakters und der Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs lässt vermuten, dass das verstärkte Auftreten transienter Signale auf den größeren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8$ mM zurückzuführen ist (Abb. 27C).

Tabelle 13: Häufigkeit transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM.

	Retzius	P	N	AP
$[Ca^{2+}]_a$ (mM)	$n_{trans.} / n_{ges.}$	$n_{trans.} / n_{ges.}$	$n_{trans.} / n_{ges.}$	$n_{trans.} / n_{ges.}$
4	1 / 20	5 / 33	15 / 17	0 / 8
2	2 / 30	14 / 30	8 / 12	0 / 7
0,8	15 / 19	8 / 30	11 / 13	0 / 7

Angegeben ist die Anzahl der transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege ($n_{trans.}$) sowie die Gesamtzahl der Messungen ($n_{ges.}$).

Die K^+ -induzierte Membrandepolarisation von Retzius- und P-Neuronen blieb durch die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ weitgehend unbeeinflusst. Allerdings war bei P-Neuronen die Membranhyperpolarisation bei Entzug des extrazellulären K^+ verkleinert (Abb. 30A, C).

3.8 Zusammenhang zwischen transientem Charakter und Amplitude des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs

Der Zusammenhang zwischen der Ausprägung des transienten Charakters und der Amplitude des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs ist in Abb. 32 gezeigt. Unter isotonen Bedingungen war bei Retzius-Neuronen bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM kein transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu beobachten, während unter Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität, extrazelluläre Alkanisierung oder eine Erniedrigung von $[Ca^{2+}]_a$ transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege häufig auftraten. Bei P-Neuronen waren transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bereits unter Kontrollbedingungen häufig. Entsprechend hatten eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität, extrazelluläre Ansäuerung oder eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_a$ wenig Effekt. Die Ausprägung des transienten Charakters nahm mit der Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zu. Das verstärkte Auftreten transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege unter hypotonen Bedingungen, erhöhtem pH_a oder erniedrigter $[Ca^{2+}]_a$ könnte daher auf den stärkeren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zurückzuführen sein. Bei P-Neuronen konnte allerdings bereits bei geringen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen (200 - 300 nM) transientes Verhalten beobachtet werden.

3.9 Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei Retzius- und P-Neuronen bei Veränderung von Osmolarität, pH_a oder $[Ca^{2+}]_a$

Der Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei Veränderung von Osmolarität, pH_a oder $[Ca^{2+}]_a$ ist in Abb. 33 und 34 gezeigt. Unter isotonen Bedingungen lag das Schwellenpotential zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle bei Retzius-Neuronen zwischen -30 und -40 mV und bei P-Neuronen bei ca. -30 mV. Anisotone Bedingungen hatten bei beiden Neuronentypen nur wenig Einfluss auf das Schwellenpotential, jedoch war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei gleicher Membrandepolarisation unter hypertonen Bedingungen stark verringert (Abb. 33A, 34A). Die Erhöhung von pH_a auf 8,6 führte bei beiden Neuronentypen zu einer Verschiebung des Schwellenpotentials in negative Richtung und die Erniedrigung auf 6,2 zu einer Verschiebung in positive Richtung. Bei P-Neuronen wurde bereits das Ruhe- E_m bei pH_a -Erhöhung in

negative Richtung und bei pH_a -Erniedrigung in positive Richtung verschoben. Bei gleichem E_m war der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei erhöhtem pH_a vergrößert und bei erniedrigtem pH_a verkleinert (Abb. 33B, 34B). Die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_a$ von 2 mM auf 0,8 oder 4 mM hatte bei beiden Neuronentypen keinen Effekt auf das Schwellenpotential sowie den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 33C, 34C).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Osmolarität, des pH-Werts und der Ca^{2+} -Konzentration auf die funktionellen Eigenschaften spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* mit Hilfe von mikrofluorimetrischen, bildgebenden und elektrophysiologischen Methoden untersucht. Mittels CCD-gestützter Mikrofluorimetrie und konfokaler Laserscan-Mikroskopie konnten mehrere Neuronen in einem einzelnen Segmentalganglion simultan untersucht werden. Als Maß für die Aktivität der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle diente der unter den verschiedenen Versuchsbedingungen durch K^+ -induzierte Depolarisationen hervorgerufene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Zusätzlich zum Ca^{2+} -Einstrom durch die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle wurde der Einfluss der extrazellulären Osmolarität auf das Zellvolumen untersucht.

Änderungen der Osmolarität, des pH-Werts und der Ca^{2+} -Konzentration sind physiologisch relevant. Da an der Regulierung dieser Parameter häufig das Zentralnervensystem beteiligt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Änderungen der Osmolarität, des pH-Werts und der Ca^{2+} -Konzentration auf neuronale Funktionen vorgenommen.

4.1 Eigenschaften spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle im Zentralnervensystem von Vertebraten

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ermöglichen den Einstrom von Ca^{2+} durch die Plasmamembran ins Zellinnere und steuern dort eine Vielzahl von Prozessen (Berridge *et al.* 2000, Carafoli 2002). Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle bei Vertebraten werden an Hand funktioneller und pharmakologischer Eigenschaften in L-, N-, P-, Q-, R- und

T-Typ Kanäle eingeteilt, wobei die Trennung in P- und Q-Typ noch umstritten ist (Davila 1999, Randall 1998). L-Typ-Kanäle werden durch 1,4-Dihydropyridine, Benzothiazepine und Phenylalkylamine blockiert und durch Bay K 8644 aktiviert (Ertel et al. 2000, Striessnig et al. 1998, Yamaguchi et al. 2003). N-Typ-Kanäle werden durch ω -Conotoxin GVIA blockiert, P/Q-Typ-Kanäle durch ω -Agatoxin IVA, R-Typ-Kanäle durch ω -Agatoxin IIIA und T-Typ-Kanäle durch verschiedene Benzimidazole (Ertel et al. 1997, Glossmann & Striessnig 1990, Randall & Tsien 1997). Die porenbildende Untereinheit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle ist die $\alpha 1$ -Untereinheit (190 - 250 kDa), mit der zwei oder drei weitere Untereinheiten assoziiert sind (Dunlap et al. 1995, Ertel et al. 2000). Die $\alpha 1$ -Untereinheit besteht aus vier Domänen (I - IV) mit jeweils sechs transmembranalen Segmenten (S1 - S6), wobei die Spannungssensoren in den Segmenten S4 lokalisiert sind (Ertel et al. 2000).

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle im Zentralnervensystem des medizinischen Bluteigel

Die bisherigen Untersuchungen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in Bluteigel-Neuronen lassen eine Verwandtschaft mit den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen von Vertebraten vermuten (Dierkes et al. 2004). Dieser Zusammenhang wird durch die Wirkung von Diltiazem, Verapamil und Bay K 8644 auf den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen gestützt (Abb. 12, 13).

Die Ca^{2+} -Kanäle der meisten Neuronen im Bluteigel-Zentralnervensystem werden bei Membranpotentialen zwischen -40 und -30 mV aktiviert, bleiben bei langanhaltender Depolarisation geöffnet und zeigen eine geringe Inaktivierung (Dierkes et al. 1997, Hochstrate et al. 1995). Die Kanäle werden blockiert durch verschiedene polyvalente Kationen ($\text{La}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \approx \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$, Dierkes 1998), den cyclischen Alkohol Menthol (Dierkes 1998, Hochstrate et al. 1995) sowie durch L-Typ-spezifische Antagonisten wie Dihydropyridine, Benzothiazepine und Phenylalkylamine (Beck et al. 2001, Dierkes 1998, Dierkes et al. 2004, Wang et al. 1999). Dagegen sind die

Neurotoxine, die spezifisch verschiedene Typen von Ca^{2+} -Kanälen bei Vertebraten blockieren, beim Bluteigel wirkungslos (*Dierkes et al.* 2004, *Trueta et al.* 2003).

4.1.1 Wirkung von L-Typ Antagonisten

Diltiazem und Verapamil gehören zu zwei unterschiedlichen Stoffklassen (Benzothiazepin bzw. Phenylalkylamin), die beide bei Vertebraten spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle blockieren. Bei den untersuchten Bluteigel-Neuronen hatten beide Substanzen eine blockierende Wirkung auf den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 12). Dabei war zum einen Verapamil wirksamer als Diltiazem. Zum anderen war die Wirksamkeit von Verapamil bei P- und N-Neuronen höher als bei Retzius- und AP-Neuronen, während Diltiazem bei allen untersuchten Neuronen etwa gleich effektiv war.

Die Untersuchungen zur Verteilung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle im Bluteigel-Segmentalganglion zeigten, dass bei allen Neuronen fluoreszenzmarkiertes Verapamil (BODYPI®FL-Verapamil) sowohl in der Plasmamembran als auch im Cytosol lokalisiert war (Abb. 14A). Verapamil ist membranpermeabel und bindet wahrscheinlich auf der cytosolischen Seite an den Kanal (*Hockerman et al.* 1997). Die Aufnahme von Verapamil durch Bluteigel-Neuronen konnte durch Messungen mit ionensensitiven Glasmikroelektroden bestätigt werden (*Klees*, persönliche Mitteilung). Anhand der Ergebnisse können keine eindeutigen Aussagen über die Lokalisation der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle im Bluteigel-Segmentalganglion gemacht werden. Immerhin war die in der Plasmamembran des Zellsomas lokalisierte Fluoreszenz meist intensiver als die Fluoreszenz im Cytosol, was auf eine spezifische Markierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen hinweist (Abb. 14B).

4.1.2 Wirkung des L-Typ Agonisten Bay K 8644

Die Aktivität von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen wird durch manche 1,4-Dihydropyridine verstärkt. Bekanntes Beispiel für ein agonistisch wirkendes 1,4-Dihydropyridin ist Bay K 8644, das Öffnungsdauer und Offenwahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -Kanäle erhöht, ohne jedoch den Einzelkanalstrom oder das Schwellenpotential zu beeinflussen (*Michels et al.* 2002, *Nowycky et al.* 1985).

Bei allen untersuchten Blutegel-Neuronen führte Bay K 8644 zu einer signifikanten Erhöhung des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs, wobei die Schwelle zur Auslösung eines gerade detektierbaren Anstiegs erhalten blieb (Abb. 13). Dabei war Bay K 8644, wie bei Vertebraten, bereits in einer Konzentration von 1 μM wirksam. Diese Ergebnisse zeigen, dass der L-Typ Agonist Bay K 8644 die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle von Blutegel-Neuronen sehr ähnlich beeinflusst wie die von Vertebraten. Die pharmakologischen Befunde dieser Arbeit sprechen somit insgesamt für eine Verwandtschaft der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle des Blutegels mit den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen der Vertebraten.

4.2 Einfluss veränderter extrazellulärer Bedingungen auf die Aktivität der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle

Änderungen der Osmolarität oder der extrazellulären ionalen Bedingungen hatten keinen Effekt auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$, solange das E_m der Neuronen in Nähe des Ruhewerts lag, jedoch waren deutliche Auswirkungen auf den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zu beobachten (Abb. 19A, 26A, 31A; vergl. *Hochstrate et al.* 2001a, b). Die Kontrolle von $[\text{K}^+]_a$ ist speziell in Nervensystemen von großer Bedeutung. Bei Neuronen führt die Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ zur Membrandepolarisation und zur Inaktivierung spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, die erst wieder Aktionspotentiale generieren können, wenn $[\text{K}^+]_a$ auf den Ruhewert zurückkehrt (*Syková* 1997).

Unter physiologischen Bedingungen kann neuronale Aktivität einen Anstieg von $[K^+]_a$ auf bis zu 10 mM verursachen (Baylor & Nicholls 1969). In den hier beschriebenen Versuchen musste $[K^+]_a$ jedoch auf 20 bzw. 30 mM erhöht werden, um einen messbaren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg auszulösen. Bei den verschiedenen Neuronentypen konnten deutliche Unterschiede in der Größe des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs festgestellt werden. Die größten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege traten bei N-Neuronen auf, gefolgt von Retzius-, AP- und P-Neuronen (Abb. 8A). Die Veränderung der Osmolarität oder der extrazellulären ionalen Bedingungen hatte keinen Einfluss auf diese Reihenfolge (Abb. 8A, 15A, 27A).

Die Größe des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs ist von verschiedenen Faktoren abhängig, zu denen die Ca^{2+} -Pufferung über Ca^{2+} -bindende Proteine, die Aktivität von Ca^{2+} -Pumpen sowie Dichte und Aktivität der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle gehören. Über diese Parameter lassen sich allein an Hand von $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen keine Aussagen treffen, da sie allesamt Zeitverlauf und Amplitude des Signals bestimmen.

Die Messung von Ca^{2+} -Strömen durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen ergab folgende Reihung der Neuronen nach ihrer maximalen Stromamplitude: Retzius > P ≥ N > AP (Stewart *et al.* 1989). Die Vermutung, dass die Anzahl spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bei AP-Neuronen geringer ist als bei P- und N-Neuronen, deckt sich mit dem Befund, dass der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei AP-Neuronen geringer oder annähernd gleich groß war wie bei N- und P-Neuronen (Abb. 8A). Dagegen war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei N-Neuronen deutlich größer als bei P-Neuronen, obwohl die Ca^{2+} -Ströme bei beiden Neuronen etwa gleich waren. Diese Diskrepanz könnte auf der unterschiedlichen Spannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Kanäle beruhen. Bei P-Neuronen war das Schwellenpotential zur Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle deutlich positiver als bei N-Neuronen (Abb. 32, 33; Dierkes *et al.* 1997), und die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten, dass maximale Ca^{2+} -Ströme bei P-Neuronen erst bei +12 mV auftraten, bei N-Neuronen bereits bei -2 bis -5 mV (Stewart *et al.* 1989). Die niedrigen K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei P-Neuronen scheinen also auf eine geringere Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle zu beruhen.

Weiterhin waren große Unterschiede im Auftreten transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege zu beobachten. Bei N-Neuronen traten transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege häufig bereits bei niedrigen $[K^+]_a$ von 20 oder 30 mM auf. Diese Anstiege beruhen auf der vorübergehenden Generierung von Aktionspotentialen, da transiente Signale in Na^+ -freier Lösung ausbleiben (Dierkes *et al.* 1997, Wende 2000). Bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM kam es auch bei Retzius- und P-Neuronen zu transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen, die jedoch nicht auf die Auslösung von Aktionspotentialen zurückzuführen sind, da bei Verwendung des Stufenprotokolls Aktionspotentiale bei hoher $[K^+]_a$ ausbleiben (Dierkes *et al.* 1997). Weiter ist eine verminderte Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle durch eine Membranrepolarisation auszuschließen, da das Membranpotential bei erhöhter $[K^+]_a$ entweder stabil blieb, wie meist bei P-Neuronen, oder sogar weiter depolarisierte, wie bei Retzius-Neuronen. Das Auftreten transienter Ereignisse war dagegen abhängig von der Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals. Experimentelle Bedingungen, die zu einer Vergrößerung des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $[K^+]_a = 59$ mM führten, bewirkten bei Retzius- und N-Neuronen ein erhöhtes Auftreten transienter Ereignisse (siehe -30 mM NaCl, Abb. 15A, 17C, 18C; $pH_a = 8,6$, Abb. 24C, 25C; $[Ca^{2+}]_a = 0,8$ mM, Abb. 27A, 29C, 30C). Umgekehrt bewirkten experimentelle Bedingungen, die zu einer Verringerung des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $[K^+]_a = 59$ mM führten, ein vermindertes Auftreten transienter Ereignisse (siehe +30 mM NaCl, Abb. 15B, 17A, 18A; $pH_a = 6,2$, Abb. 24A, 25A; $[Ca^{2+}]_a = 4,0$ mM, Abb. 27B, 29A, 30A). Bei P-Neuronen traten transiente Ereignisse schon bei niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen auf (Abb. 32). Bei AP-Neuronen wurden auch bei $[K^+]_a = 59$ mM keine transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege beobachtet (Abb. 8C, 15C, 27C).

Das Auftreten transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege könnte durch eine Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle verursacht sein. Die Ca^{2+} -abhängige Kanal-Inaktivierung ist ein wichtiger Rückkopplungsmechanismus gegen eine Ca^{2+} -Überladung der Zellen, wobei verschiedene Systeme beteiligt sein können (Zühlke & Reuter 1998). Untersuchungen an L-Typ Ca^{2+} -Kanälen bei Vertebraten zeigten, dass die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle direkt oder indirekt durch einen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg inaktiviert werden können. Bei der direkten Inaktivierung bindet Ca^{2+}

auf der cytoplasmatischen Seite an Calmodulin, das mit dem Kanal assoziiert ist und verursacht dadurch eine Konformationsänderung (*Haack & Rosenberg 1994, Soldatov 2003*). Die direkte Inaktivierung erfolgt sehr schnell im Millisekundenbereich, die $[Ca^{2+}]$ für eine halbmaximale Inhibierung (IC_{50}) liegt bei ca. 4 μM (*Höfer 1997*). Bei der indirekten Inaktivierung bindet Ca^{2+} an Proteinphosphatasen (PP2A, PP2B), die das Kanalprotein dephosphorylieren. Bei Aktivierung von PP2A wird die Öffnungszeit und bei Aktivierung von PP2B die Verfügbarkeit der Ca^{2+} -Kanäle vermindert. Die halbmaximale Aktivierung von PP2B erfolgt bei $[Ca^{2+}]_i = 260$ nM, die von PP2A ist nicht genau bekannt (*Groschner et al. 1996, Schuhmann et al. 1997*). Die Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle über PP2A und PP2B vollzieht sich im Minutenbereich (*Davare et al. 2000*), also im selben Zeitbereich wie die Wiederabnahme von $[Ca^{2+}]_i$ bei transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen. Dies lässt vermuten, dass der transiente Charakter der hier beschriebenen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auf der Inaktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle durch Dephosphorylierung beruht.

Untersuchungen an Herzzellen zeigten, dass die Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle durch Dephosphorylierung in einem dynamischen Gleichgewicht mit der Aktivierung durch Phosphorylierung steht, wobei die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) erfolgt. Somit können dephosphorylierte bzw. inaktive Ca^{2+} -Kanäle durch PKC wieder verfügbar gemacht werden (*duBell & Rogers 2004*). Bei P-Neuronen trat eine Inaktivierung bereits bei niedrigen, bei Retzius- und N-Neuronen erst bei höheren $[Ca^{2+}]_i$ auf (Abb. 8C, 15C, 27C). Möglicherweise spiegelt dies Unterschiede im dynamischen Gleichgewicht zwischen Ca^{2+} -abhängiger Phosphorylierung und Dephosphorylierung wider.

4.3 Abhängigkeit des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs von E_m

Eine Verschiebung von E_m in negative Richtung durch Entzug des extrazellulären K^+ hatte bei keinem der untersuchten Neuronen einen Einfluss auf $[Ca^{2+}]_i$. Dies zeigt, dass die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in der Nähe des Ruhe- E_m sämtlich geschlossen

sind. T-Typ Ca^{2+} -Kanäle werden bereits bei einer geringen Membrandepolarisation aktiviert und gehen dann rasch in einen inaktivierten Zustand über, der sich durch Verstellung des E_m in negative Richtung in einen aktivierbaren Zustand überführen lässt (Chemin 2003). Da beim Wechsel von K^+ -freier in physiologische Lösung ($[\text{K}^+]_a = 4 \text{ mM}$) kein $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg auftrat, scheinen T-Typ Ca^{2+} -Kanäle bei den untersuchten Neuronen nicht vorhanden zu sein.

Zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle war bei den untersuchten Blutegel-Neuronen eine deutliche Membrandepolarisation nötig, welche durch eine Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ auf 20 mM (Retzius, N, AP) bzw. 30 mM (P) erzielt wurde (siehe Dierkes *et al.* 1997, Hochstrate *et al.* 1995). Bei Retzius-Neuronen lag das Schwellenpotential zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle zwischen -30 und -40 mV und bei P-Neuronen bei ca. -30 mV (siehe Dierkes *et al.* 1997). Diese Schwellen wurden durch die Änderung der Badosmolarität oder von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ kaum beeinflusst (Abb. 33A, C; 34 A, C), jedoch durch Erhöhung des pH_a in negative und durch Erniedrigung des pH_a in positive Richtung verschoben (Abb. 33B, 34B). Bei beiden Neuronen war das Schwellenpotential bei $\text{pH}_a = 8,6$ um ca. 20 mV negativer als bei $\text{pH}_a = 6,2$, d.h. die Zellen müssen bei extrazellulärer Alkalinisierung erheblich weniger depolarisiert werden als bei extrazellulärer Ansäuerung, damit es zur Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle kommt.

Untersuchungen an Retzius-Neuronen lassen vermuten, dass Änderungen von pH_a keinen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung oder die Aufnahme von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher haben (Hochstrate *et al.* 2001a). Vielmehr verursacht die pH_a -Änderung wahrscheinlich eine Verschiebung des Oberflächenpotentials der Plasmamembran, was zur Änderung des elektrischen Feldes über den Spannungssensoren der Kanäle führt (Hille 1992, McLaughlin 1977, 1989). Von Änderungen des Oberflächenpotentials betroffen sind auch spannungsabhängige Na^+ - und K^+ -Kanäle, jedoch scheint die Wirkung bei Ca^{2+} -Kanälen am stärksten zu sein (Tombaugh & Somjen 1997). Die Modulation der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle durch pH_a sollte auch im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels eine Rolle spielen, da

neuronalen Aktivität oder die Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren zu pH_a -Verschiebungen führen können. (Dörner 1991, Rose & Deitmer 1995b).

Bei Retzius- und P-Neuronen war der K^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg unter hypertonen Bedingungen deutlich verkleinert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Ca^{2+} -Einstrom durch die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle bei erhöhter Osmolarität gehemmt ist. Eine Beeinflussung der Potentialabhängigkeit scheint dagegen nicht zu bestehen, da das Schwellenpotential unbeeinflusst blieb. Sehr ähnliche Befunde wurden bei CA1-Neuronen im Hippocampus und bei Muskelzellen erhalten, wobei die Effekte unabhängig davon waren, ob die Osmolarität der Lösungen durch NaCl, Harnstoff oder Raffinose geändert wurde (Huang & Somjen 1997, Wagner *et al.* 2000). Somit scheint der verkleinerte K^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei Blutegel-Neuronen unter hypertonen Bedingungen allgemein auf die Zellschrumpfung zurückzuführen zu sein. Möglicherweise übt die schrumpfende Plasmamembran einen lateralen Druck auf die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle aus, so dass diese nicht mehr vollständig öffnen können (Huang & Somjen 1997).

4.4 Abhängigkeit des E_m vom extrazellulären pH

Bei P-Neuronen war E_m bei $[\text{K}^+]_a$ zwischen 4 und 30 mM bei extrazellulärer Alkalinisierung in negative und bei extrazellulärer Ansäuerung in positive Richtung verschoben (Abb. 25A, C). Bei Retzius-Neuronen war dagegen E_m unabhängig von pH_a (Abb. 24A, C). Die Abhängigkeit des E_m von pH_a bei P-Neuronen könnte auf die Aktivierung bzw. Deaktivierung pH-sensitiver K^+ -Kanäle (TASK = Two-pore-domain acid sensitive potassium channel) zurückzuführen sein. TASK-Kanäle werden in vielen Geweben exprimiert und tragen zur K^+ -Leckleitfähigkeit im Ruhezustand bei, da sie tonisch aktiv sind. Sie spielen daher gerade in Nervensystemen eine große Rolle (Duprat *et al.* 1997, Lesage 2003, North 2000, Patel & Honoré 2001). Es werden fünf Isoformen (TASK-1 - 5) unterschieden, die sich hinsichtlich ihrer pH-Sensitivität unterscheiden (Patel & Lazdunski 2004, Talley *et al.* 2003). Die Experimente bei P-

Neuronen deuten auf eine Beteiligung von TASK-1 und/oder TASK-2 hin. Bei $\text{pH}_a = 7,4$ zeigt TASK-1 eine Aktivität von 50 % des Maximalwerts und TASK-2 eine Aktivität von 25 %. Bei Verstellung des pH_a auf 8,6 steigt die Aktivität von TASK-1 auf 100 % und die von TASK-2 auf 75 %. Bei $\text{pH}_a = 6,2$ gehen die Aktivitäten beider Kanäle auf 5 % zurück (Decher *et al.* 2001, Patel & Lazdunski 2004).

4.5 Einfluss von $[\text{K}^+]_a$ und Badosmolarität auf das Zellvolumen

Der Wassertransport über der Plasmamembran tierischer Zellen hängt weitgehend vom osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum ab. Jede Veränderung des osmotischen Gradienten führt somit zur Veränderung des Zellvolumens (Sarkidi & Parker 1991). Um in gewissen Grenzen auf osmotische Veränderungen reagieren zu können, verfügen tierische Zellen über volumenregulatorische Mechanismen. Als Antwort auf eine Zellschwellung kommt es zu einer regulatorischen Volumenabnahme (regulatory volume decrease, RVD) und auf eine Zellschrumpfung zu einer regulatorischen Volumenzunahme (regulatory volume increase, RVI; Strange 1993).

Der Entzug des extrazellulären K^+ hatte weder unter isotonen noch unter anisotonen Bedingungen einen Effekt auf das Volumen der Retzius-Neuronen. Dagegen löste die Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ auf 10 mM und mehr bei den untersuchten Neuronen stets eine Zellschwellung aus (Abb. 20B). Untersuchungen an Retzius-Neuronen mit ionensensitiven Dreikanal-Glasmikroelektroden zeigten, dass die K^+ -induzierte Zellschwellung auf der simultanen Aufnahme von K^+ und Cl^- und der damit verbundenen Wasseraufnahme beruht (Trosiner 2003). Eine K^+ -induzierte Zunahme des Zellvolumens wurde auch bei kultivierten Astrocyten, Schnecken-Neuronen und Neuropil-Gliazellen des medizinischen Blutegels gefunden (Ayrapetyan & Suleymanian 1979, Ballanyi *et al.* 1990, Walz 1992).

Die Verminderung der Badosmolarität verursachte eine Volumenzunahme und die Erhöhung der Osmolarität eine Volumenabnahme. Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ unter hypotonen

Bedingungen führte zu einer weiteren Volumenzunahme, die ähnlich wie unter isotonen Bedingungen verlief. Auch unter hypertonen Bedingungen trat eine K^+ -induzierte Volumenzunahme auf, deren Schwelle allerdings zu höheren $[K^+]_a$ verschoben war (Abb. 20C). Die Verschiebung der Schwelle und das Auftreten des „overshoots“ nach Wechsel von hypertoner zu isotoner Badlösung könnten auf eine regulatorische Volumenzunahme (RVI) zurückzuführen sein. Dass Retzius-Neuronen unter hypertonen Bedingungen NaCl aufnehmen, wurde bereits nachgewiesen (Dierkes *et al.* 2003).

4.6 Schlussbetrachtung

Bedingt durch seine Lebensweise im Süßwasser hat der Blutegel ein osmotisches Gefälle von innen nach außen aufrechtzuerhalten. Hierbei müssen zur Erhaltung des dynamischen Gleichgewichts Mechanismen gefordert werden, die den Salzverlust ersetzen und das mit dem osmotischen Gefälle eingedrungene Wasser entfernen (Boroffka 1968). Aber auch durch Nahrungsaufnahme und bei Habitatwechsel ist der Blutegel erheblichen osmotischen Schwankungen ausgesetzt. Daher ist eine Kontrolle der NaCl-Aufnahme beim Fressvorgang oder Einwandern in Brackwasser mit unterschiedlicher Salinität wichtig (Zerbst-Boroffka 1973, Herter 1939). Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Osmolarität der Hämolymphe konstant bleibt, wenn die Osmolarität der Umgebung abnimmt, während sie ansteigt, wenn die Osmolarität der Umgebung zunimmt (Nieczaj & Zerbst-Boroffka 1993). Ein derartiger Anstieg der extrazellulären Osmolarität sollte die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in den Neuronen signifikant beeinflussen. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die synaptische Transmission zwischen Retzius- und P-Neuronen (polysynaptisch) sowie die zwischen N- und AP-Neuronen (monosynaptisch) unter hypertonen Bedingungen partiell gehemmt war (Langer 2003). Eine mögliche Ursache hierfür scheint der verkleinerte Ca^{2+} -Einstrom durch die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle unter hypertonen Bedingungen zu sein.

Unter natürlichen Lebensbedingungen ist weiter die Kontrolle des extrazellulären pH-Werts von großer Bedeutung. Durch jahreszeitliche Schwankungen kommt es häufig zu Änderungen des O₂-Gehalts im Habitat des Blutegels, die zu Änderungen des pH-Werts der Hämolymphe führen. Dabei löst eine Abnahme des O₂-Gehalts eine Ansäuerung aus, die wiederum eine Erniedrigung der Konzentration organischer Säuren und eine Zunahme der NaCl-Konzentration nach sich zieht. Umgekehrt induziert eine Zunahme des O₂-Gehalts eine Alkanilisierung, die zu einer Erhöhung der Konzentration organischer Säuren und zu einer Abnahme der NaCl-Konzentration führt. Dabei scheinen sich die Änderungen der NaCl-Konzentration und die Änderungen der Konzentration der organischen Säuren gegenseitig zu kompensieren, so dass das osmotische Gleichgewicht gewahrt bleibt (*Hildebrandt & Zerbst-Boroffka* 1992). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass Änderungen des pH_a im physiologischen Bereich nicht nur allgemein einen großen Effekt auf die Aktivierung der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle von Blutegel-Neuronen haben, sondern bei manchen Neuronen das Membranpotential selbst beeinflussen.

5. Zusammenfassung

1. Es wurden der Einfluss der Osmolarität, des pH-Werts und der Ca^{2+} -Konzentration auf die funktionellen Eigenschaften spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen des Blutegel-Zentralnervensystems untersucht. Zusätzlich wurden Experimente zur näheren pharmakologischen Charakterisierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle durchgeführt. Hierzu wurden mikrofluorimetrische Messsysteme verwendet, welche zum einen die simultane Bestimmung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Zellvolumen bei einer einzelnen Zelle und zum anderen die simultane Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei mehreren Zellen ermöglichten. Darüber hinaus wurden Messungen des Membranpotentials (E_m) mit Hilfe Elektrolyt-gefüllter Glasmikroelektroden durchgeführt sowie konfokale Aufnahmen zur bildlichen Darstellung von Volumenänderungen erstellt. Die Experimente wurden an Zellen im intakten Gewebeverband (*in situ*) durchgeführt.
2. Diltiazem und Verapamil (jeweils 100 μM), beide Antagonisten von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen, führten bei allen untersuchten Neuronen zu einer Reduktion des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs. Dabei wirkte Verapamil stärker als Diltiazem. Außerdem war die Wirkung von Verapamil bei P- und N-Neuronen stärker als bei Retzius- und AP-Neuronen, während die Wirkung von Diltiazem bei den verschiedenen Neuronen etwa gleich war. Der L-Typ Agonist Bay K 8644 (1 μM) führte bei allen Neuronentypen zu einer Vergrößerung des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs. Diese Befunde sprechen für die Verwandtschaft der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in Blutegel-Neuronen mit den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen von Vertebraten.
3. Die Schwelle des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs lag bei Retzius-, N- und AP-Neuronen bei $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$ und bei P-Neuronen bei $[\text{K}^+]_a = 30 \text{ mM}$. Die Neuronen unterschieden sich deutlich in der Amplitude des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs. Die größten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege traten bei N-Neuronen auf, gefolgt von Retzius-, AP- und P-Neuronen.

4. Bei $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ war bei Retzius-, P- und N-Neuronen ein transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu beobachten, wobei der transiente Charakter bei Retzius- und N-Neuronen mit der Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zunahm. Das transiente Verhalten wurde durch Verminderung der extrazellulären Osmolarität, Alkalinisierung oder Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration gefördert und umgekehrt durch Erhöhung der extrazellulären Osmolarität, Ansäuerung oder Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration vermindert. AP-Neuronen, bei denen der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gering war, zeigten keine transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Signale.
5. Das Schwellenpotential zur Auslösung eines $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs lag bei Retzius-Neuronen zwischen -30 und -40 mV und bei P-Neuronen bei ca. -30 mV, unabhängig von der extrazellulären Osmolarität oder der Ca^{2+} -Konzentration. Der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war jedoch unter hypertonen Bedingungen stark verringert. Das Schwellenpotential zur Auslösung eines $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs war bei beiden Neuronentypen bei $pH_a = 8,6$ in negative Richtung und bei $pH_a = 6,2$ in positive Richtung verschoben. Das Membranpotential von Retzius-Neuronen war bei allen $[K^+]_a$ unabhängig von pH_a , während es bei P-Neuronen zwischen $[K^+]_a = 4$ und 30 mM bei $pH_a = 8,6$ in negative und bei $pH_a = 6,2$ in positive Richtung verschoben war.
6. Die Schwelle der K^+ -induzierten Volumenzunahme lag unter isotonen Bedingungen bei allen Neuronentypen bei $[K^+]_a = 20 \text{ mM}$. Unter hypertonen Bedingungen war diese Schwelle zu größeren $[K^+]_a$ verschoben, wohingegen unter hypotonen Bedingungen keine Veränderungen beobachtet wurde.
7. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die funktionellen Eigenschaften der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle von Blutegel-Neuronen durch Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität und Änderungen des extrazellulären pH-Werts markant beeinflusst werden. Vergleichbare Änderungen treten beim Fressvorgang oder erhöhter Aktivität im neuronalen Netzwerk des Blutegels auf und deuten so darauf

hin, dass spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle eine Rolle bei der Änderung zellulärer Eigenschaften auf diese Reize hin spielen.

6. Literaturverzeichnis

Alvarez-Leefmans, F.J., Altamirano, J., Crowe, W.E. (1995). Use of ion-selective microelectrodes and fluorescent probes to measure cell volume. *Methods Neurosci.* **27**: 361 - 391

Anderson, P.A.V., Greenberg, R.M. (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **129B**: 17 - 28

Angstadt, J.D., Calabrese, R.L. (1991). Calcium currents and graded synaptic transmission between heart interneurons of the leech. *J. Neurosci.* **11**: 746 - 759

Arbas, E.A., Calabrese, R.L. (1990). Leydig neuron activity modulates heartbeat in the medicinal leech. *J. Comp. Physiol.* **167A**: 665 - 671

Ashcroft, F.M. (2000). *Ion Channels and Disease*. Academic Press, London

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

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

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

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

- Beck, A., Lohr, C., Deitmer, J.W. (2001). Calcium transients in subcompartments of the leech Retzius neuron as induced by single action potentials. *J. Neurobiol.* **48**: 1 - 18
- Bennett, M.K., Scheller, R.H. (1994). A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 63 - 100
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 11 - 21
- Blaustein, M.P., Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol. Rev.* **79**: 763 - 863
- Bookman, R.J., Liu, Y. (1990). Analysis of calcium channel properties in cultured leech Retzius cells by internal perfusion, voltage-clamp and single-channel recording. *J. Exp. Biol.* **149**: 223 - 237
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* **83**: 675 - 678
- Boroffka, I. (1968). Osmo- und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis*. *Z. vergl. Physiol.* **57**: 348 - 375
- Brodfoehr, P.D., Thorogood, M.S.E. (2001). Identified neurons and leech swimming behavior. *Prog. Neurobiol.* **63**: 371 - 381
- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J., Hebert, S.C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**: 575 - 580
- Carafoli, E. (2002). Calcium signalling: a tale for all seasons. *PNAS* **99**: 1115 - 1122

- Carretta, M. (1988). The Retzius cells in the leech: a review of their properties and synaptic connections. *Comp. Biochem. Physiol.* **91A**: 405 - 413
- Chemin, J., Monteil, A., Lory, P. (2003). Functional specificity of T-type calcium channels and their roles in neuronal differentiation. *J. Soc. Biol.* **197**: 235 - 247
- Chesler, M. (1990). The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **34**: 401 - 427
- Chesler, M., Kaila, K. (1992). Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci.* **15**: 396 - 402
- Clapham, D.E. (1995). Calcium Signalling. *Cell* **80**: 259 - 268
- Clark, A., Carafoli, E. (1983). The stoichiometry of the Ca^{2+} -pumping ATPase of erythrocytes. *Cell Calcium* **4**: 83 - 88
- Coggeshall, R.E., Fawcett, D.W. (1964). The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Neurophysiol.* **27**: 229 - 289
- Cohen, J.E., Fields, R.D. (2004). Extracellular calcium depletion in synaptic transmission. *Neuroscientist* **10**: 12 - 17
- Crowe, W.E., Altamirano, J., Huerto, L., Alvarez-Leefmans, F.J. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *J. Neurosci.* **6**: 283 - 296
- Davare, M.A., Horne, M.C., Hell, J.W. (2000). Protein Phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**: 39710 - 39717

Davila, H.M. (1999). Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. *Ann. NY Acad. Sci.* **868**: 102 - 117

Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Brüggemann, A., Busch, A.E., Steinmeyer, K. (2001). Characterisation of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.* **492**: 84 - 89

De Petris, L., Luchetti, A., Emma, F. (2001). Cell volume regulation and transport mechanisms across the blood-brain barrier: implications for the management of hypernatraemic states. *Eur. J. Pediatr.* **160**: 71 - 77

Di Bartola, S.P. (2001). Disorders of sodium - hypernatraemia and hyponatraemia. *J. Feline Med. Surg.* **3**: 185

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

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

Dierkes, P.W., Coulon, P., Neumann, S., Schlue, W.-R. (2003). Potentiometric measurement of cell volume changes and intracellular ion concentrations under voltage-clamp conditions in invertebrate nerve cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 762 - 766

Dierkes, P.W., 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., Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (1997). Voltage-dependent Ca^{2+} -influx into identified leech neurons. *Brain Res.* **746**: 285 - 293
- Dierkes, P.W., Wende, V., Hochstrate, P., Schlue, W. - R. (2004). L-type Ca^{2+} channel antagonists block voltage-dependent Ca^{2+} channels in identified leech neurons. *Brain Res.* **1030**: 159 - 167
- Dörner, R. (1991). Elektrophysiologische und autoradiographische Untersuchungen zur Wirkung von Glutamat bei Retzius-Neuronen und Neuropil-Gliazellen im Zentralnervensystem des Blutegels *Hirudo medicinalis*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- DuBell, W., Rogers, T.B. (2004). Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca^{2+} current in mouse cardiac myocytes. *J. Physiol.* **556**: 79 - 93
- Dunlap, K., Luebke, J.I., Turner, T.J. (1995). Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* **18**: 89 - 98
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K^{+} channel. *EMBO J.* **16**: 5464 - 5471
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M, Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.B., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**: 533 - 535
- Ertel, S.I., Ertel, E.A., Clozel, J.P. (1997). T-Type Ca^{2+} -channels and pharmacology blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **11**: 723 - 739

- Ghosh, A., Ginty, D.D., Bading, H., Greenberg, M.E. (1993). Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J. Neurobiol.* **25**: 294 - 303
- Glossmann, H., Striessnig, J. (1990). Molecular properties of calcium channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **114**: 1 - 104
- Groschner, K., Schuhmann, K., Mieskes, G., Baumgartner, W., Romanin, C. (1996). A type 2A phosphatase-sensitive phosphorylation site controls modal gating of L-type Ca^{2+} channels in human vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.* **318**: 513 - 517
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440 - 3450
- Haack, J.A., Rosenberg, R.L. (1994). Calcium-dependent inactivation of L-type calcium channels in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* **66**: 1051 - 1060
- Haugland, R.P. (2002). Handbook of fluorescent probes and research products. 9th edition. Molecular Probes, Inc., Eugene OR.
- Herter, K. (1939). Die Ökologie der *Hirudeen*. In Klassen und Ordnungen des Tierreichs (Hrsg. Bronn, H.G.), 4. Bd., III Abt., 4. Buch, Seiten 321 - 496
- Hildebrandt, J.P., Zerbst-Boroffka, I. (1992). Osmotic and ionic regulation during hypoxia in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* L. *J. Exp. Zool.* **263**: 374 - 381
- Hille, B. (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer, Sunderland, MA
- Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M.M., Yoshida, S., Noda, M. (2002). Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neurosci.* **5**: 511 - 512

- Hochstrate, P., Dierkes, P.W., Kilb, W., Schlue, W.-R. (2001a). Modulation of Ca^{2+} influx in leech retzius neurons. I. Effect of extracellular pH. *J. Membr. Biol.* **184**: 13 - 25
- Hochstrate P., Dierkes P.W., Kilb W., Schlue W.-R. (2001b). Modulation of Ca^{2+} influx in leech retzius neurons. II. Effect of extracellular Ca^{2+} . *J. Membr. Biol.* **184**: 27 - 33
- Hochstrate, P., Piel, C., Schlue, W.-R. (1995). Effect of extracellular K^+ on the intracellular free Ca^{2+} concentration in leech glial cells and Retzius neurones. *Brain Res.* **696**: 231 - 241
- Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (1994). Ca^{2+} influx into leech glial cells and neurones caused by pharmacologically distinct glutamate receptors. *Glia* **12**: 268 - 280
- Hochstrate, P., Schlue, W.-R. (1995). Ca^{2+} influx into leech neuropile glial cells mediated by nicotinic acetylcholine receptors. *Glia* **15**: 43 - 53
- Hockerman, G.H., Peterson, B.Z., Johnson, B.D., Catterall, W.A. (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 361 - 396
- Höfer, G.F., Hohenthanner, K., Baumgartner, W., Groschner, K., Klugbauer, N., Hoffmann, F., Romanin, C. (1997). Intracellular Ca^{2+} inactivates L-type Ca^{2+} channels with a hill coefficient of approximately 1 and an inhibition constant of approximately 4 mM by reducing channel's open probability. *Biophys. J.* **73**: 1857 - 1865.
- Hoffmann, E.K. (2000). Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell. Physiol. Biochem.* **10**: 273 - 288
- Huang, R., Somjen, G.G. (1997). Effects of hypertonia on voltage-gated ion currents in freshly isolated hippocampal neurons, and on synaptic currents in neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* **748**: 157 - 167

- Hucho, F., Tsetlin, V. (1996). Structural Biology of key nervous system proteins. *J. Neurochem.* **66**: 1781 - 1792
- Hussy, N., Deleuze, C., Desarmenien, M.G., Moos, F. C. (2000). Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog. Neurobiol.* **62**: 113 - 134
- Jarolimek, W., Misgeld, U., Lux, H.D. (1989). Activity dependent alkaline and acid transients in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.* **505**: 225 - 232
- Jessell, T.M., Kandel, E.R. (1993). Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* **72** (Suppl.): 1 - 30
- Kim, H. - C., Chung, M. - K. (1999). Voltage-dependent sodium and calcium currents in acutely isolated adult rat trigeminal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* **81**: 1123 - 1134
- Kolb, E. (1974). *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 3. Auflage, Seiten 449 - 451
- Kuffler, S.W., Potter, D.D. (1964). Glia in the leech nervous system: physiological properties and neuron-glia relationships. *J. Neurophysiol.* **27**: 290 - 320
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkel, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**: 247 - 306
- Langer, J. (2003). *Elektrophysiologische Untersuchungen der synaptischen Transmission zwischen identifizierten Blutegel-Neuronen unter veränderten osmotischen Bedingungen*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Lent, C.M. (1973). Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech. *Science* **179**: 693 - 696
- Lent, C.M., Dickinson, M.H. (1987). On the termination of ingestive behaviour by the medicinal leech. *J. Exp. Biol.* **131**: 1 - 15
- Lent, C.M., Zundel, D., Freedman, E., Groome, J.R. (1991). Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioral effects. *J. Comp. Physiol.* **168A**: 191 - 200
- Lesage, F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* **44**: 1 - 7
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M. Denis, C.S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**: 525 - 535
- Liedtke, W., Friedman, J.M. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *PNAS* **100**: 13698 - 13703
- Livanov, N. (1904). Untersuchungen zur Morphologie der *Hirudeen*. II. Das Nervensystem des vorderen Körperendes und seine Metamerie. *Zool. Jahrb. Anat.* **20**: 153 - 226
- Lohrmann, D.M., Kamemoto, F.I. (1987). The effect of dibutyryl cAMP on sodium uptake by isolated perfused gills of *Callinectes sapidus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**: 300 - 305
- Macagno, E.R. (1980). Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J. Comp. Neurol.* **190**: 283 - 302

- Mangoni, M.E., Cens, T., Dalle, C., Nargeot, J., Carnet, P. (1997). Characterisation of alpha 1A Ba²⁺, Sr²⁺ and Ca²⁺ currents recorded with the ancillary beta 1 - 4 subunits. *Receptors Channels* **5**: 1 - 14
- Mann, K.H. (1962). *Leeches (Hirudinea) - Their Structure, Physiology, Ecology and Embryology*. Pergamon Press, New York
- Mannhold, R. (1995). Calciumantagonisten vom Dihydropyridintyp: Medizinisch-chemische und molekularpharmakologische Eigenschaften. *Pharmazie in unserer Zeit* **24**: 137 - 153
- Maruya, H., Watanabe, Y., Okita, M., Lawlor, G.F., Utsumi, H., Niitsuma, T. (2003). Inhibitory Effects of D₂ agonists by striatal injection on excessive release of dopamine and hyperactivity induced by Bay K 8644 in rats. *Neuroscience* **118**: 1091 - 1098
- McLaughlin, S. (1977). Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Curr. Top. Membr. Trans.* **9**: 71 - 144
- McLaughlin, S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**: 113 - 136
- Michels, G., Matthes, J., Handrock, R., Kuchinke, U., Groner, F., Cribbs, L.L., Pereverzev, A., Schneider, T., Perez-Reyes, E., Herzig, S. (2002). Single-channel pharmacology of mibefradil in human native t-type and recombinant Ca_v3.2 calcium channels. *Mol. Pharmacol.* **61**: 682 - 694
- Morris, S. (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* **204**: 979 - 989

- Morris, S. Ahern, M.D. (2003). Regulation of urine reprocessing in the maintenance of sodium and water balance in the terrestrial Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* investigated under field conditions. *J. Exp. Biol.* **206**: 2869 - 2881
- Muallem, S., Zhang, B.-X., Loessberg, P.A., Star, R.A. (1992). Simultaneous recording of cell volume changes and intracellular pH or Ca^{2+} concentration in single osteosarcoma cells UMR-106-01. *J. Biol. Chem.* **267**: 17658 - 17664
- Muller, K.J., Nicholls, J.G., Stent, G.S. (1981). *Neurobiology of the Leech*. Cold Spring Harbor, New York
- Munsch, T., Deitmer, J.W. (1995). Maintenance of fura-2 fluorescence in glial cells and neurones of the leech central nervous system. *J. Neurosci. Meth.* **57**: 195 - 204
- Munsch, T., Nett, W., Deitmer, J.W. (1994). Fura-2 signals evoked by kainate in leech glial cells in the presence of different divalent cations. *Glia* **11**: 345 - 353
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**: 599 - 605
- Nemeth, E.F. (1995). Ca^{2+} -receptor-dependent regulation of cellular functions. *News Physiol. Sci.* **10**: 1 - 5
- Nett, W., Deitmer, J.W. (1998). Intracellular Ca^{2+} regulation by the leech giant glial cell. *J. Physiol. (Lond.)* **507**: 147 - 162
- Nicholls, J.G., Kuffler, S.W. (1964). Extracellular space as a pathway for exchange between blood and neurons in the central nervous system of the leech: ionic composition of glial cells and neurons. *J. Neurophysiol.* **27**: 645 - 671

- Nicholls, J.G., Van Essen, D. (1974). The nervous system of the leech. *Sci. Am.* **230**: 38 - 48
- Nieczaj, R., Zerst-Boroffka, I. (1993). Hyperosmotic acclimation in the leech *Hirudo medicinalis* L.: energy metabolism, osmotic, ionic and volume regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* **106A**: 595 - 602
- Nilius, B., Prenen, J., Droogmans, G. (1998). Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH. *Pflügers Arch.* **436**: 742 - 748
- Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. (2003). TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286C**: 195 - 205
- North, A.R. (2000). Potassium-channel closure taken to TASK. *Trends Neurosci.* **23**: 234 - 235
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W. (1985b). Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *PNAS* **82**: 2178 - 2182
- Ohmori, H., Yoshii, M. (1977). Surface potential reflected in both gating and permeation mechanisms of sodium and calcium channels of the tunicate egg cell membrane. *J. Physiol. (Lond.)* **267**: 429 - 463
- Pastor, J., Soria, B., Belmonte, C. (1996). Properties of the nociceptive neurons of the leech segmental ganglion. *J. Neurophysiol.* **75**: 2268 - 2279
- Patel, A.J., Honoré, E. (2001). Anesthetic-sensitive 2P Domain K⁺ Channels. *Anesthesiology* **95**: 1013 - 1021

- Patel, A.J., Lazdunski, M. (2004). The 2P-domain K^+ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch.* 448: 261 - 273
- Pellegrino, M., Pellegrini, M., Simoni, A., Gargini, C. (1990). Stretch-activated cation channels with large unitary conductance in leech central neurons. *Brain Res.* 525: 322 - 326
- Piccolino, M., Pignatelli, A. (1996). Calcium-independent synaptic transmission: artefact or fact? *Trends Neurosci.* 19: 120 - 125
- Pütter, A. (1907). Der Stoffwechsel des Blutegels. I. Teil Zeitschrift für allgemeine Physiologie 6: 217 - 286
- Randall, A.D. (1998). The molecular basis of voltage-gated Ca^{2+} channel diversity: is it time for T? *J. Membr. Biol.* 161: 207 - 213
- Randall, A.D., Tsien, R.W. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36: 879 - 893
- Retzius, G. (1981). Zur Kenntnis des centralen Nervensystems der Würmer. *Biologische Untersuchungen* 2: 1 - 28
- Ritter, M., Fuerst, J., Wöll, E., Chwatal, S., Gschwentner, M., Lang, F., Deetjen, P., Paulmichl, M. (2001). Na^+/H^+ Exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell function. *Cell. Physiol. Biochem.* 11: 1 - 18
- Roos, A., Boron, W.F. (1981). Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61: 296 - 434
- Rose, C.R., Deitmer, J.W. (1995). Stimulus-evoked changes of extra- and intracellular pH in the leech nervous system. II. Mechanisms and maintenance of pH homeostasis. *J. Neurophysiol.* 73: 132 - 140

- Ruat, M., Molliver, M.E., Snowman, A.M., Snyder, S.H. (1995). Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *PNAS* **92**: 3161 - 3165
- Sachs, F. (1992). Stretch-sensitive Ion Channels: an update. In Corey, D.P. & Roper, S.D. (eds). *Sensory Transduction*. The Rockefeller University Press, New York, NY, Seiten 241 - 260
- Saier, M.H. Jr., (2000). Families of proteins forming transmembrane channels. *J. Membr. Biol.* **175**: 165 - 180
- Sarkadi, B., Parker, J.C. (1991). Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochem. Biophys. Acta* **1071**: 407 - 427
- Sawyer, R.T. (1986). *Leech Biology and Behaviour*. Vol. I: Anatomy, Physiology and Behaviour. Clarendon Press, Oxford, UK
- Schatzmann, H.J. (1989). The calcium pump of the surface membrane and the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Physiol.* **51**: 473 - 485
- Schlue, W.-R., Kilb, W., Günzel, D. (1997). Ultramicroelectrodes for membrane research. *Electrochim. Acta* **42**: 3197 - 3205
- Schuhmann, K., Romanin, C., Baumgartner, W., Groschner, K. (1997). Intracellular Ca^{2+} inhibits smooth muscle L-Type Ca^{2+} channels by activation of protein phosphatase type 2B and direct interaction with the channel. *J. Gen. Physiol.* **110**: 503 - 513
- Shan, D., Zhang, R.J. (2001). Frequency coding of positional information by an identified neuron, the AP cell, in the leech, *Whitmania pigra*. *Brain Res. Bull.* **56**: 511 - 515

- Shimizu, H., Borin, M.L., Blaustein, M.P. (1997). Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in arterial myocytes. *Cell Calcium* **21**: 31 - 41
- Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720 - 731
- Soldatov, N.M. (2003). Ca^{2+} channel moving tail: link between Ca^{2+} -induced inactivation and Ca^{2+} signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**: 167 - 171
- Somjen, G.G. (1999). Low external NaCl concentration and low osmolarity enhance voltage-gated Ca currents but depress K currents in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Brain Res.* **851**: 189 - 197
- Stabel, J., Arens, J., Lambert, J.D.C., Heinemann, U. (1990). Effects of lowering $[\text{Na}^{+}]_o$ and $[\text{K}^{+}]_o$ and of ouabain on quisqualate-induced ionic changes in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **110**: 60 - 65
- Steffensen, I., Stys, P.K. (1996). The Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in neurons and glial cells. *Neuroscientist* **2**: 162 - 171
- Stewart, R.R., Nicholls, J.G., Adams, W.B. (1989). Na^{+} , K^{+} and Ca^{2+} currents in identified leech neurones in culture. *J. Exp. Biol.* **141**: 1 - 20
- Strange, K. (1993). Maintenance of cell volume in the central nervous system. *Pediatr. Nephrol.* **7**: 689 - 697
- Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M.J., Glossmann, H. (1998). Structural basis of drug binding to L Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**: 108 - 115

- Sunderland, A.J. (1980). A hitherto undocumented pair of neurons in the segmental ganglion of the leech which receive synaptic input from mechanosensory cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **67A**: 299 - 302
- Syková, E. (1997). The extracellular space in the CNS: Its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function. *Neuroscientist* **3**: 28 - 41
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **79**: 1089 - 1125
- Talley, E.M., Sirois, J.E., Lei, Q., Bayliss, D.A. (2003). Two-pore-domain (KCNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist* **9**: 46 - 56
- Tombaugh, G.C., Somjen, G.G. (1997). Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low-threshold Ca^{2+} currents in isolated rat CA1 neurons. *J. Neurophysiol.* **77**: 639 - 653
- Traynelis, S.F., Cull-Candy, S.G. (1990). Proton inhibiting of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebella neurons. *Nature* **345**: 347 - 350
- Trosiner, N.S. (2003). Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Neurotransmitter- und K^{+} -induzierten Volumenänderungen bei Retzius- und P-Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Trueta, C., Mendez, B., De-Miguel, F.F. (2003). Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. *J Physiol.* **547**: 405 - 416
- Urbanics, R., Leniger-Follert, E., Lübbers, D.W. (1978). Time course of changes of extracellular H^{+} and K^{+} activities during and after electrical stimulation of the brain cortex. *Pflügers Arch.* **378**: 47 - 53

- Wagner, C.A., Huber, S.M., Wärentges, S., Zempel, G., Kaba, N.K., Fux, R., Orth, N., Busch, G.L., Waldegger, S., Lambert, I., Nilius, B., Heinle, H., Lang, F. (2000). Effect of urea and osmotic cell shrinkage on Ca^{2+} entry and contraction of vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* **440**: 295 - 301
- Wakamori, M., Strobeck, M., Niidome, T., Teramoto, T., Imoto, K., Mori, Y. (1998). Functional characterization of ion permeation pathway in the N-type Ca^{2+} channel. *J. Neurophysiol.* **79**: 622 - 634
- Walz, W. (1992). Mechanism of rapid K^{+} -induced swelling of mouse astrocytes. *Neurosci. Lett.* **135**: 243 - 246
- Wang, Y., Strong, J.A., Sahley, C.L. (1999). Modulatory effects of myomodulin on the excitability and membrane currents in Retzius cells of the leech. *J. Neurophysiol.* **82**: 216 - 225
- Webel, R., Haug-Collet, K., Pearson, B., Szerencsel, R.T., Winkfein, R.J., Schnetkamp, P.P.M., Colley, N.J. (2002). Potassium-dependent sodium-calcium exchange through the eye of the fly. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **976**: 300 - 314
- Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H. Jr., Welsh, M.J. (2003). Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J. Neurosci.* **23**: 5496 - 5502
- Wende, V. (2000). Mikrofluorimetrische Untersuchungen zur Verteilung von Neurotransmitter-Rezeptoren bei identifizierten Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Wenning, A. 1999. Sensing effectors make sense. *Trends Neurosci.* **22**: 550 - 555

- Wenning, A., Erxleben, C.F., Calabrese, R.L. (2001). Indirectly gated Cl^- -dependent Cl^- -channels sense physiological changes of extracellular chloride in the leech. *J. Neurophysiol.* **86**: 1826 - 1838
- Wenning, A., Zerbst-Boroffka, I., Bazin, B. (1980). Water and salt excretion in the leech (*Hirudo medicinalis* L.). *J. Comp. Physiol.* **139**: 97 - 102
- Wilkinson, J.M., Coggeshall, R.E. (1975). Axonal numbers and sizes in the connectives and peripheral nerves of the leech. *J. Comp. Neur.* **162**: 387 - 396
- Wilson, R.J.A., Kristan, W.B. Jr., Kleinhaus, A.L. (1996). An increase in activity of serotonergic Retzius neurones may not be necessary for the consummatory phase of feeding in the leech *Hirudo medicinalis*. *J. Exp. Biol.* **199**: 1405 - 1414
- Wilson, D.L., Morimoto, K., Tsuda, Y., Brown, A.M. (1983). Interaction between calcium ions and surface charge as it relates to calcium currents. *J. Membr. Biol.* **72**: 117 - 130
- Wüsten, H J. (2003). Zellvolumen-Regulation und Änderungen intrazellulärer Ionenkonzentrationen in Retzius- und P-Neuronen des medizinischen Blutegels. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Yamaguchi, S., Zhorov, B. S., Yoshioka, K., Nagao, T., Ichijo, H., Adachi-Akahane, S. (2003). Key roles of Phe¹¹¹² and Ser¹¹¹⁵ in the pore-forming IIIS5-S6 linker of the L-type Ca^{2+} channel α_{1c} subunit (Ca_v 1.2) in binding of dihydropyridines and action of Ca^{2+} Channel Agonists. *Mol. Pharmacol.* **64**: 235 - 248
- Zerbst-Boroffka, I. (1973). Osmo- und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis* nach Nahrungsaufnahme. *J. Comp. Physiol.* **84**: 185 - 204

Zhang, X., Wilson, R.J., Li, Y., Kleinhaus, A.L. (2000). Chemical and thermal stimuli have short-lived effects on the Retzius cell in the medicinal leech. *J. Neurobiol.* **43**: 304 - 311

Zühlke, R.D., Reuter, H. (1998). Ca^{2+} sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} -channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the α_{1C} subunit. *PNAS* **95**: 3287 - 3294

7. Abbildungen

A



B

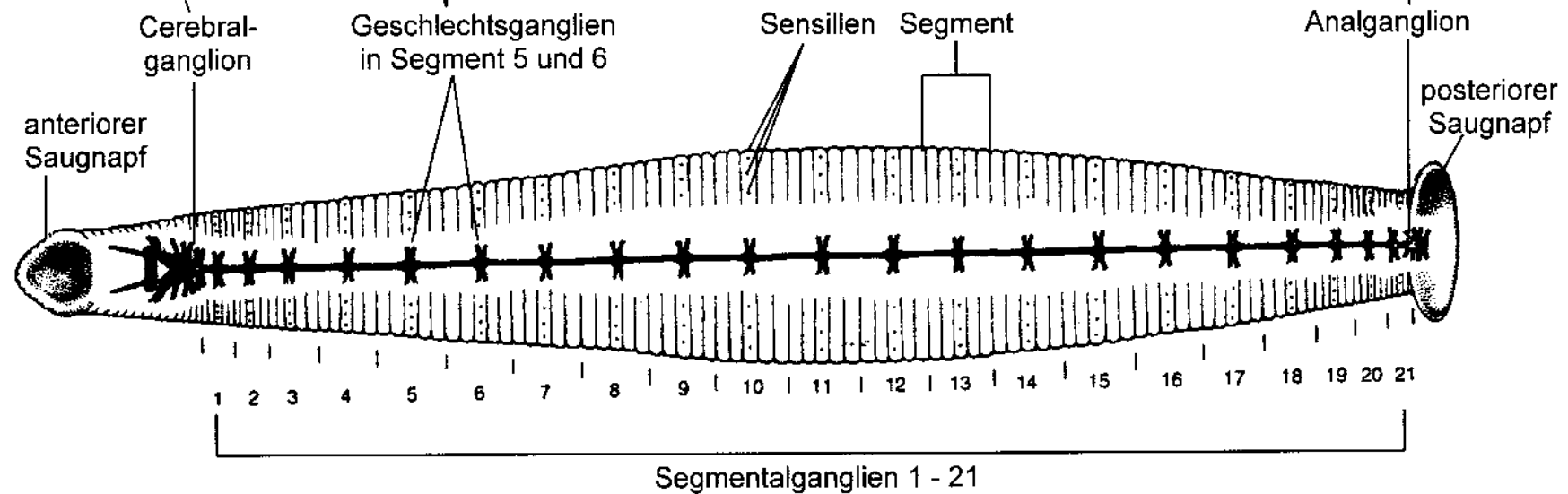
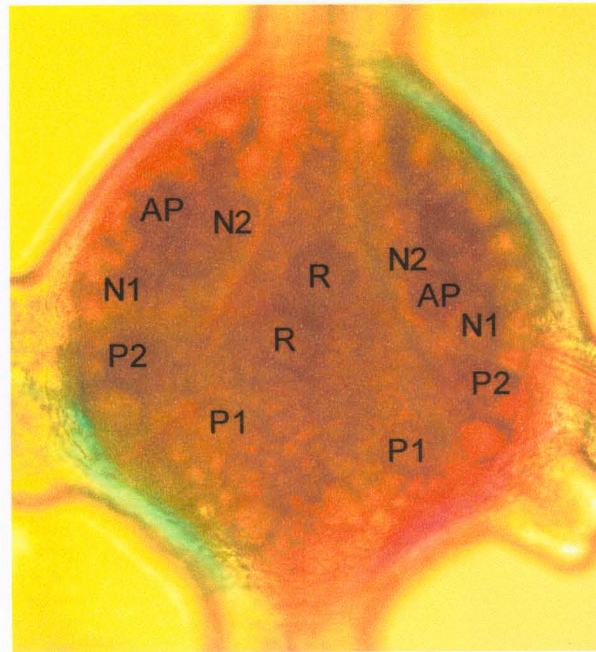


Abb. 1: Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*.

- A) Fotografische Aufnahme eines freipräparierten Zentralnervensystems des medizinischen Blutegels.
- B) Schematische Darstellung des Zentralnervensystems im Blutegelkörper (verändert nach *Nicholls et al. 1992*). Das Zentralnervensystem beginnt mit dem Cerebralganglion und endet mit dem Analganglion. Die 21 dazwischen liegenden Segmentalganglien sind untereinander sowie mit Cerebral- und Analganglion durch Konnektive verbunden.

A



B

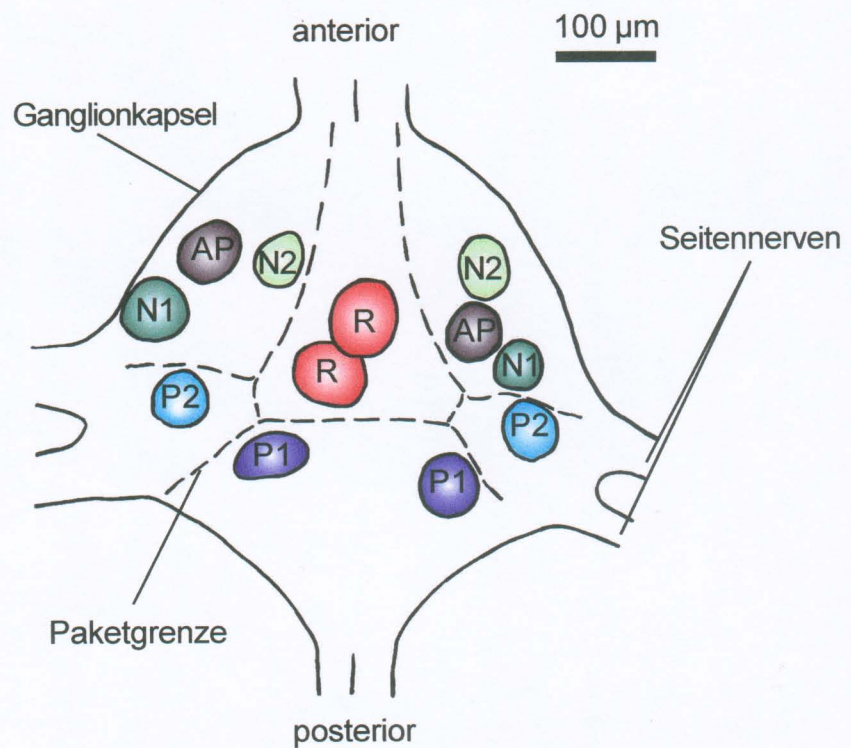


Abb. 2: Ventralansicht eines typischen Segmentalganglions des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*.

- A) Fotografische Aufnahme im Durchlicht.
- B) Schematische Darstellung.

Die Zellkörper der in dieser Arbeit untersuchten Neuronen sind gekennzeichnet: R, (Retzius); P, (pressure); N, (noxious); AP, (anterior pagoda).

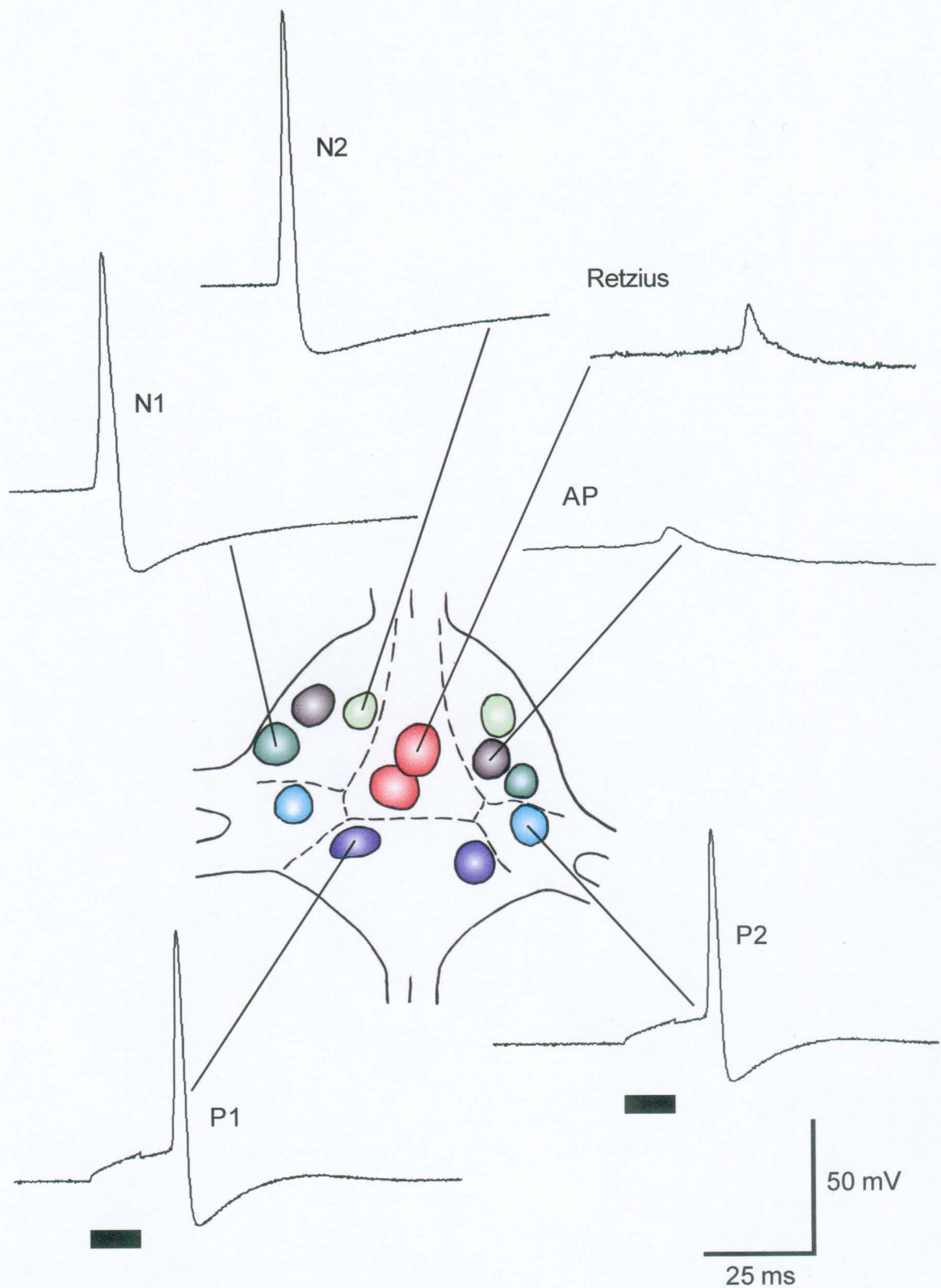


Abb. 3: Registrierbeispiele typischer Aktionspotentiale der in dieser Arbeit untersuchten Neuronen.

In Normalsalzlösung wurde bei Retzius- und AP-Neuronen in den meisten Experimenten eine regelmäßige Spontanaktivität beobachtet. N-Neuronen generierten für 1 bis 2 Minuten nach dem Elektrodeneinstich spontan Aktionspotentiale, danach kam die Aktivität zum Erliegen. P-Neuronen zeigten dagegen meist keine Spontanaktivität. Aktionspotentiale konnten jedoch durch Strominjektion (Balken; +2 nA für 10 ms) ausgelöst werden.

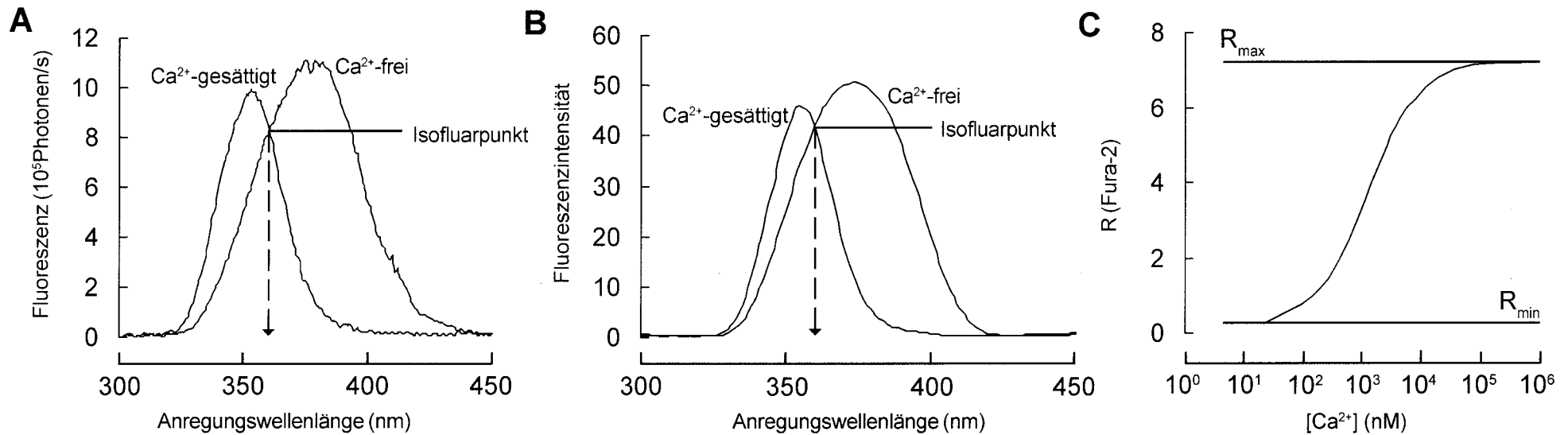


Abb. 4: Eichung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2

A, B) Mikrofluorimetrisch registrierte Anregungsspektren der Ca^{2+} -gesättigten und Ca^{2+} -freien Form von Fura-2. Die Fluoreszenzemission wurde zwischen 510 und 540 nm gemessen. Die Eichlösungen enthielten 100 μM Fura-2 in 100 mM KCl und 10 mM HEPES, pH 7,4. Der Ca^{2+} -freien Lösung wurden 10 mM EGTA und der Ca^{2+} -gesättigten Lösung 10 mM CaCl_2 zugegeben. Die Bindung von Ca^{2+} führt zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums zu kürzeren Wellenlängen. Der Schnittpunkt der beiden Spektren bei 360 nm stellt den Isofluarpunkt des Farbstoffs dar, bei dem die Fluoreszenzemission von der Ca^{2+} -Konzentration unabhängig ist.

Die in A dargestellten Emissionsspektren wurden mit dem SEV-System gemessen. Zur Bestimmung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden die Fluoreszenzemissionen („detektierte Photonen pro s“) bei Anregung mit 340 und 380 nm verwendet. Zur Messung des Zellvolumens wurde Fura-2 mit 360 nm angeregt. In B sind die Fluoreszenzintensitäten in „Kamera-spezifischen Einheiten“, die mit dem CCD-System gemessenen wurden, wiedergegeben. Zur Bestimmung der Ratio wurden die Fluoreszenzemissionen bei Anregung mit 360 und 380 nm verwendet.

C) Eichkurve nach der Ratio-Methode gemessen mit dem SEV-System. Gezeigt ist die Abhängigkeit des Verhältnisses der bei Anregung mit 340 und 380 nm ermittelten Fluoreszenzintensitäten ($F_{340}/F_{380} = R(\text{Fura-2})$) von der Ca^{2+} -Konzentration. Es wurden *in vitro* ermittelte Werte für $R_{\min}$, $R_{\max}$ sowie S_{t2}/S_{b2} eingesetzt. Die Dissoziationskonstante ($K_d = 135 \text{ nM}$) wurde aus der Literatur übernommen (Grynkiewicz *et al.* 1985).

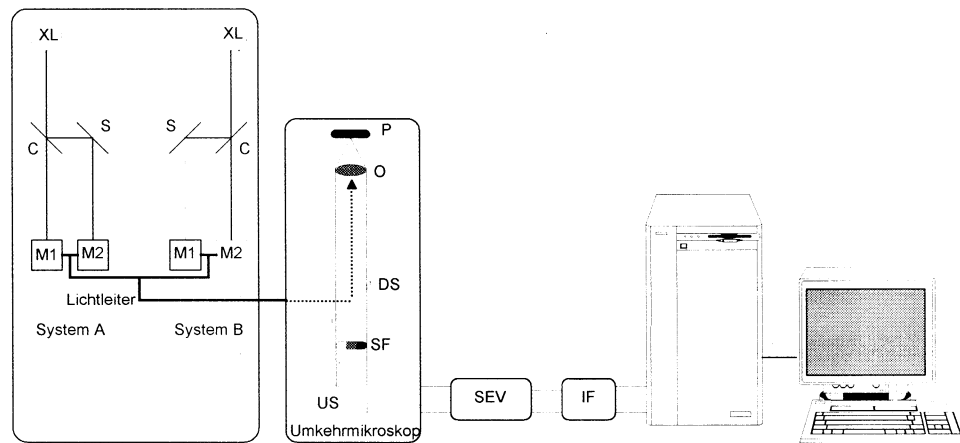
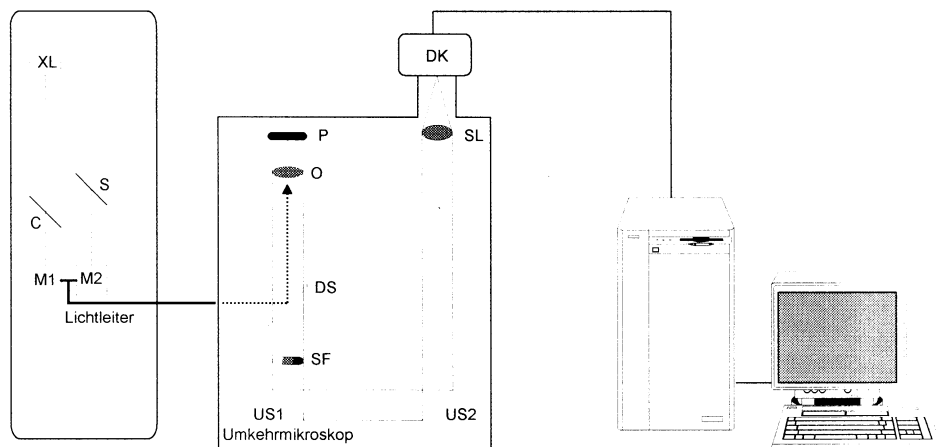
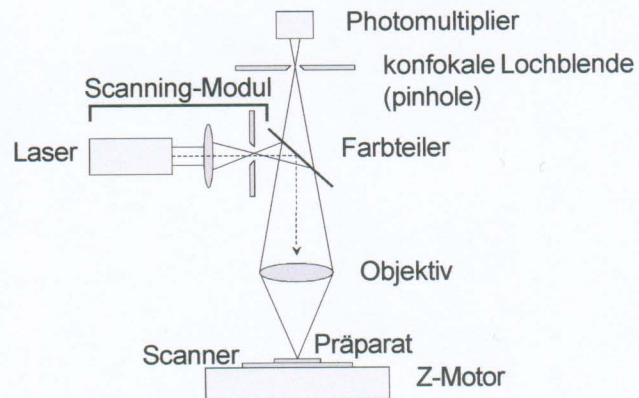
A**B**

Abb. 5: Schematische Darstellung der mikrofluorimetrischen Versuchsaufbauten.

- A) SEV-System: Mikrofluorimeter zur alternierenden Anregung mit 4 unterschiedlichen Wellenlängen. Das System zur Erzeugung des Anregungslichts bestand aus zwei baugleichen Untersystemen A und B. Das Licht der Xenonlampen (XL) wurde mittels zweier Chopper (C) abwechselnd über die beiden Spiegel (S) den jeweiligen Monochromatoren (M1, M2) zugeführt. Das aus den Monochromatoren austretende Anregungslicht gelangte über einen vierarmigen Quarzlichtleiter in ein Umkehrmikroskop, wo es über einen dichroitischen Spiegel (DS) und das Objektiv (O) zum Präparat (P) geleitet wurde. Die vom Präparat emittierte Fluoreszenzstrahlung wurde vom Objektiv aufgefangen und über DS, einen Umlenkspiegel (US) und einen Sperrfilter (SF, 510/540 nm) zum Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) geleitet. Das SEV-Signal wurde über ein Interface (IF) mit einem Personal Computer aufgezeichnet.
- B) CCD-System: Die Erzeugung des Anregungslichts und das Auffangen der Fluoreszenzemission erfolgten analog zu A. Im Unterschied zu A wurde das Fluoreszenzlicht über eine Sammellinse (SL) zu einer digitalen Kamera (DK) geleitet, deren Signal in einen Personal Computer eingespeist wurde.

A



B

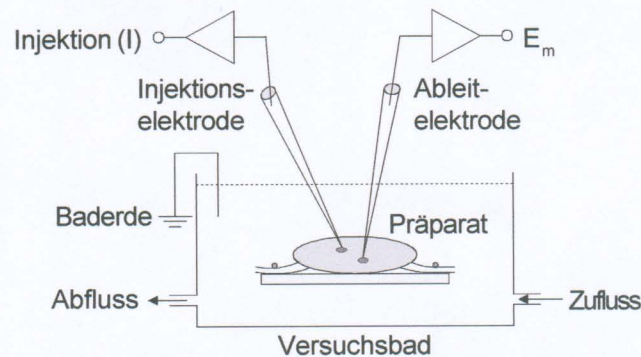


Abb. 6: Konfokale Laserscan-Mikroskopie, Farbstoffinjektion und Ableitung des Membranpotentials (E_m).

- A) Fotografische und schematische Darstellung eines CSLM (confocal scanning laser microscope). Beim CSLM handelt es sich um ein Lichtmikroskop, an das eine LSM-Unit (bestehend aus einem Laser- und einem Scanning-Modul) gekoppelt ist. Vom Laser generiertes Licht definierter Wellenlängen gelangt ins Scanning-Modul und wird alternierend über Scanspiegel durch das Objektiv auf das Präparat fokussiert (Scannen der Probe). Aus der Fokusebene emittiertes Licht gelangt über den Scanner zu den Farbteilern, wo die Fluoreszenzemission wellenlängenspezifisch diskriminiert und pixelweise auf die Detektoren (Photomultiplier) verteilt wird. Über Emissionsfilter kann der gewünschte Wellenlängenbereich der zu detektierenden Photonen zusätzlich eingeschränkt werden.
- B) Fotografische und schematische Darstellung der Versuchsaппeratur zur iontophoretischen Farbstoffinjektion und E_m -Messung. Fura-2 und Oregon Green®488 BAPTA-1 wurden durch einen negativen Injektionsstrom in die Neuronen injiziert.

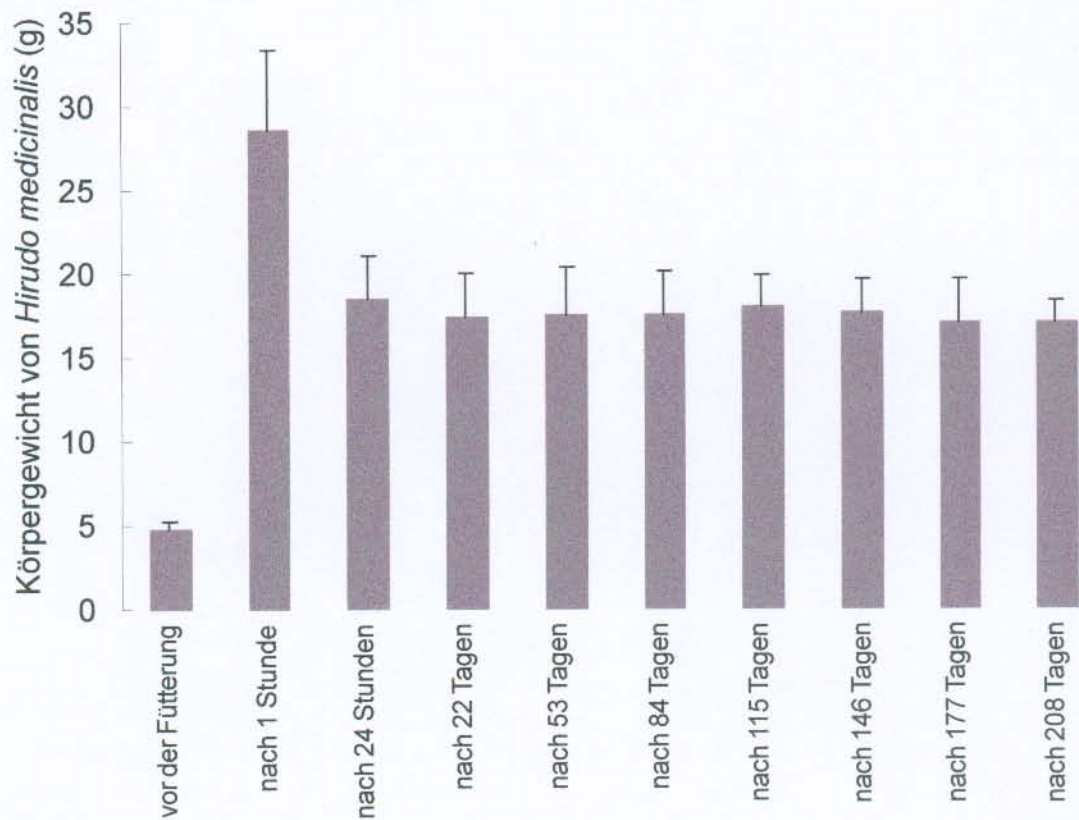
A**B**

Abb. 7: Zunahme des Körpergewichts von Blutegeln nach einer Fütterung.

- A) Die Fotografie zeigt mehrere Blutegel bei der Nahrungsaufnahme. Das zur Fütterung verwendete Rinderblut wurde in Portionen von etwa 50 ml in Darmstücke gefüllt und auf 30 °C erwärmt.
- B) Mittleres Körpergewicht ($\pm$ S.D.) von $n = 10$ Blutegeln unmittelbar vor und in unterschiedlichem Zeitabstand nach der Fütterung. Die Dauer der Fütterung betrug 30 Minuten.

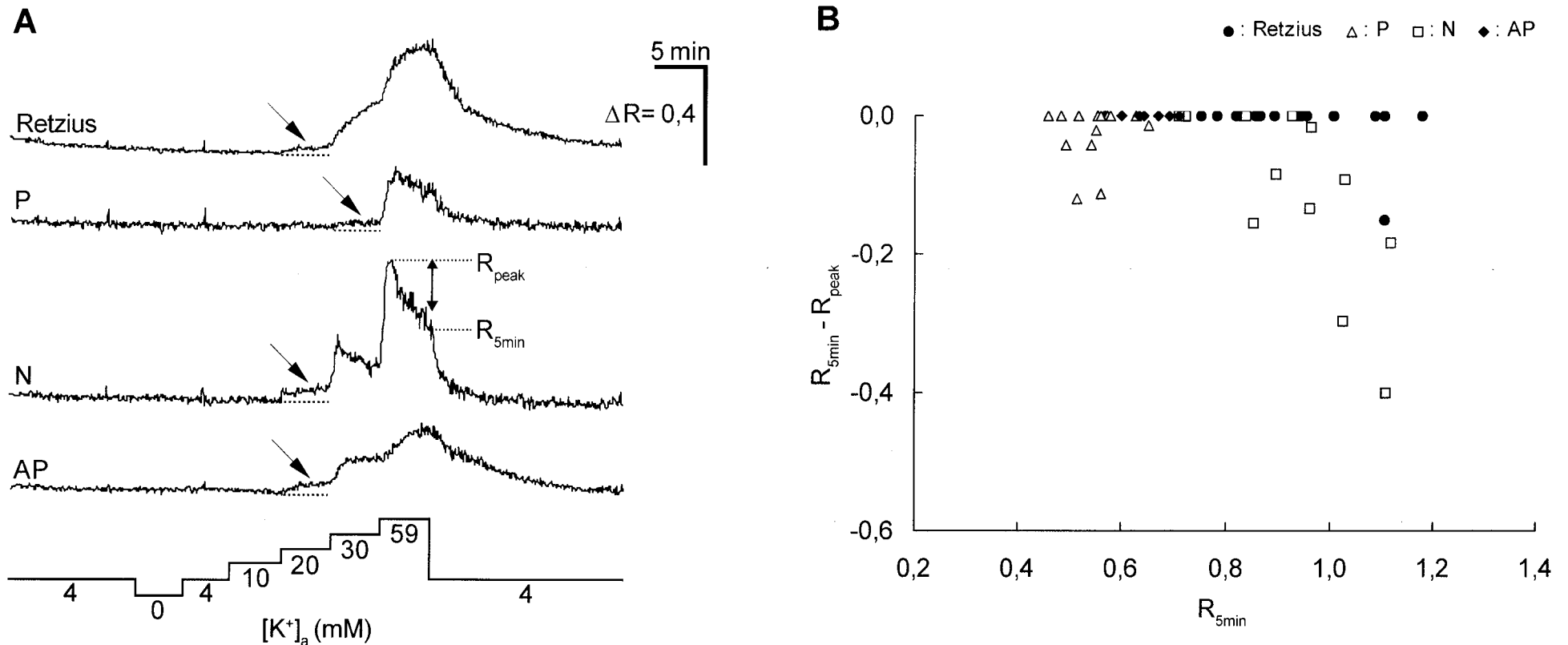


Abb. 8: Wirkung veränderter $[K^+]_a$ auf $[Ca^{2+}]_i$ bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen.

- A) Bei Retzius-, N- und AP-Neuronen war ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[K^+]_a = 20$ mM erkennbar und bei P-Neuronen erst bei $[K^+]_a = 30$ mM (Pfeile). Die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege waren bei N-Neuronen am größten und bei P-Neuronen am kleinsten und bei allen Neuronen innerhalb von 10 Minuten völlig reversibel. N-Neuronen zeigten bei $[K^+]_a = 30$ und 59 mM häufig transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (siehe Markierung in A). Bei Retzius-Neuronen traten selten transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auf und bei AP-Neuronen nie. Die Registrierbeispiele wurden simultan mit dem CCD-System gemessen ($R = F_{360}/F_{380}$).
- B) Abhängigkeit des transienten Verhaltens, quantifiziert durch $R_{5min} - R_{peak}$ (siehe A), von der maximalen Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $[K^+]_a = 59$ mM. N-Neuronen zeigten im Vergleich zu den anderen Neuronentypen starkes transientes Verhalten.

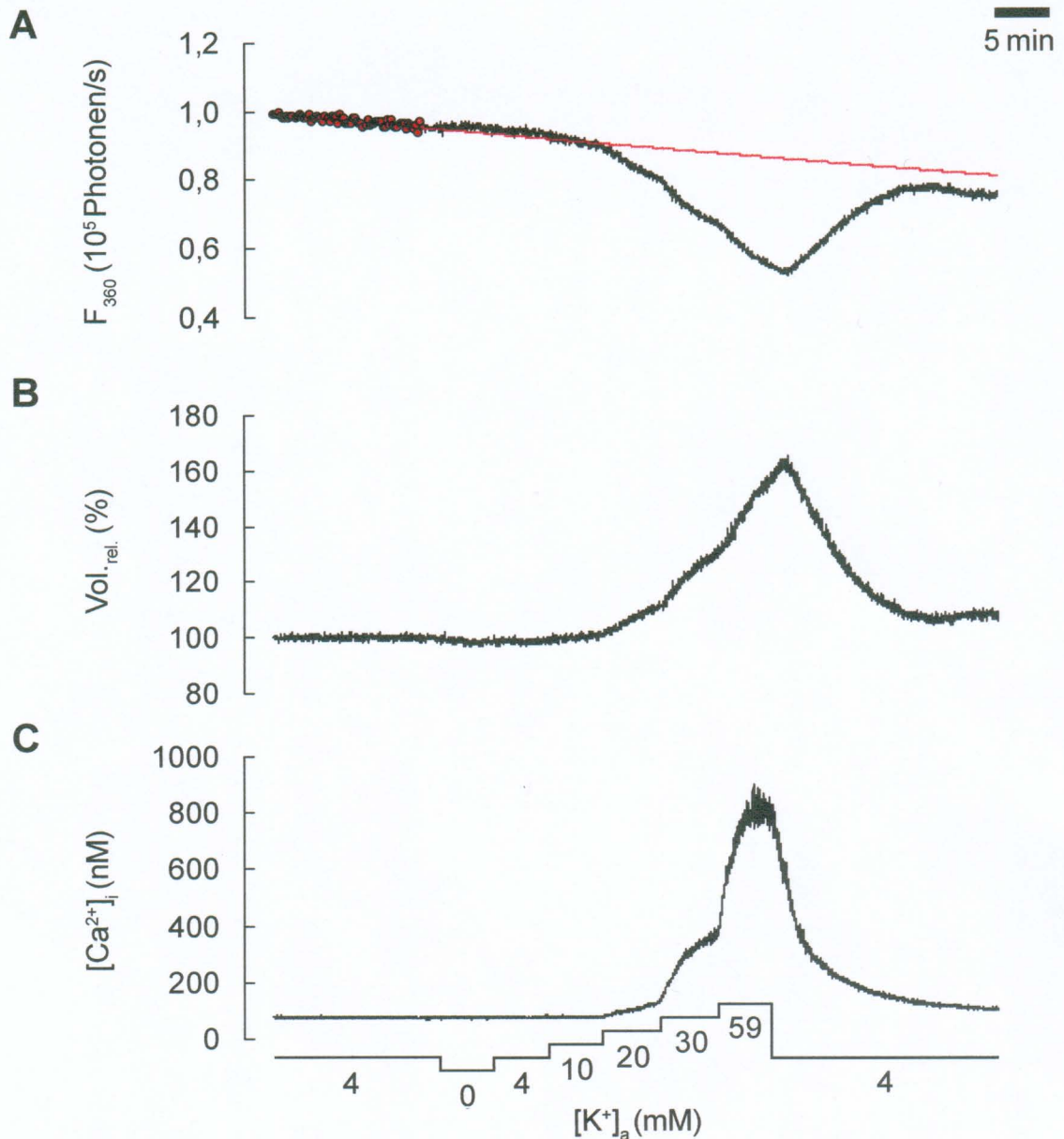


Abb. 9: Wirkung veränderter $[K^+]_a$ auf Volumen und $[Ca^{2+}]_i$ bei einem Retzius-Neuron.

- A, B) Die Veränderungen von $[K^+]_a$ im Bereich von 0 bis 10 mM hatten keinen Effekt auf die durch 360 nm angeregte Fura-2-Fluoreszenz (F_{360}), bei $[K^+]_a = 20, 30$ und 59 mM nahm F_{360} dagegen ab (A). Neben den K^+ -induzierten Änderungen trat während der gesamten Messdauer ein kontinuierlicher Abfall von F_{360} auf, der durch Farbstoffverlust bedingt war (siehe *Wüsten* 2003). Um den Farbstoffverlust zu quantifizieren, wurde F_{360} über 15 Minuten bei $[K^+]_a = 4$ mM gemessen und durch eine Exponentialfunktion approximiert (rote Linie). Diese Exponentialfunktion wurde zur Korrektur der Messdaten verwendet, um die Volumen-bedingten Änderungen von F_{360} zu ermitteln und damit das relative Zellvolumen (B). Die Fluoreszenz wurde in einem Messareal von 10% des Zellquerschnitts gemessen.
- C) Bei $[K^+]_a = 20, 30$ und 59 mM kam es zu einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Bei $[K^+]_a = 59$ mM war der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bereits nach 2 Minuten maximal, wohingegen $Vol_{rel.}$ auch nach 5 Minuten noch kein Plateau erreicht hatte.

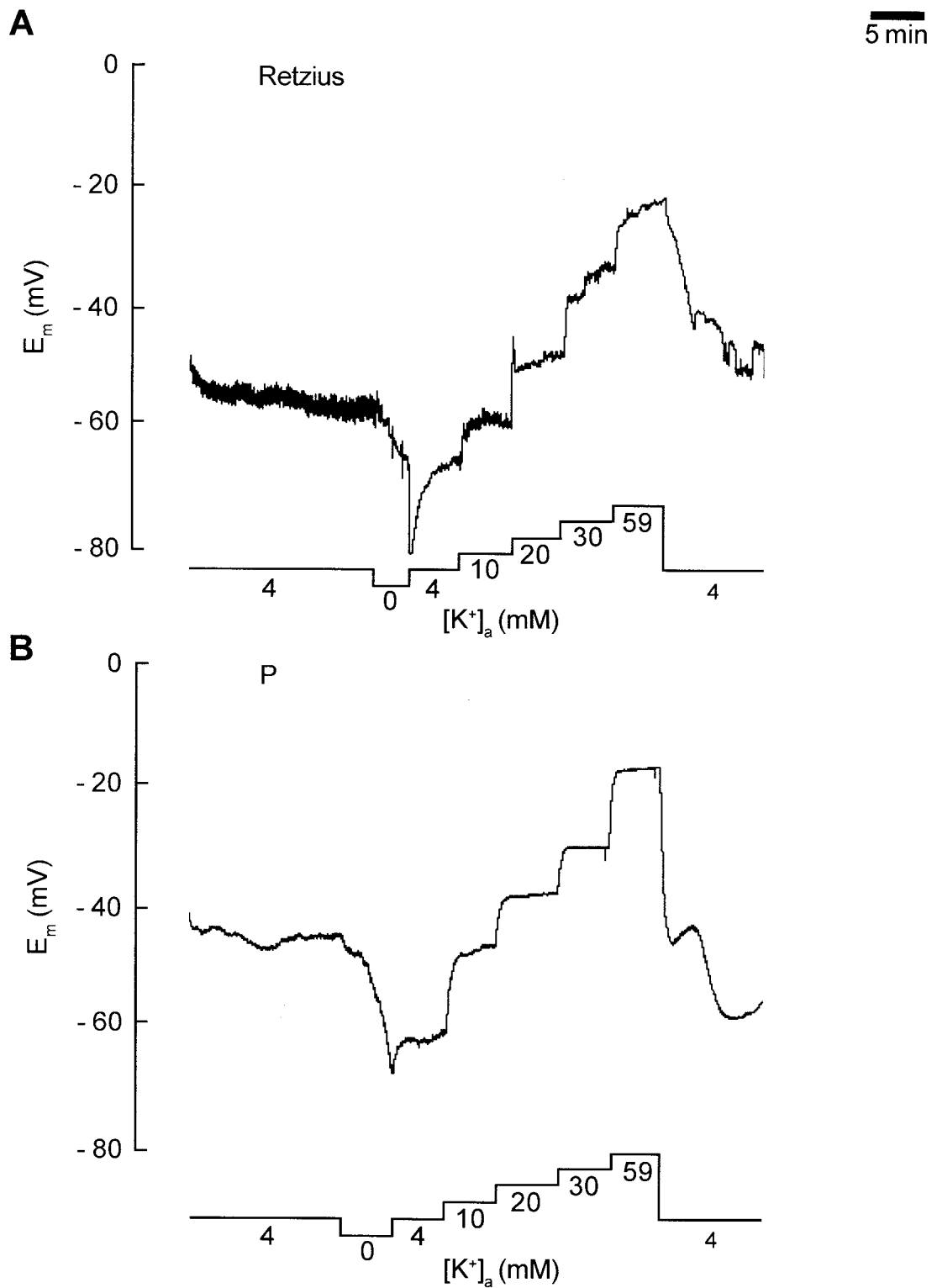


Abb. 10: K^+ -induzierte E_m -Änderungen bei Retzius- (A) und P-Neuronen (B).

Beide Neuronentypen hatten ein Membranruhepotential zwischen -40 und -60 mV und antworteten auf Entzug des extrazellulären K^+ mit einer Membranhyperpolarisation, die bei P-Neuronen stärker ausgeprägt war. Bei Rückwechsel auf $[K^+]_a = 4$ mM zeigten Retzius-Neuronen eine ausgeprägte, transiente Membranhyperpolarisation, die bei P-Neuronen nur selten zu beobachten war. Bei $[K^+]_a = 10, 20, 30$ bzw. 59 mM wurde bei P-Neuronen bereits nach 1 Minute ein stabiles Plateau erreicht, während 50 % der untersuchten Retzius-Neuronen weiter depolarisierten. Die K^+ -induzierten E_m -Änderungen waren bei beiden Neuronentypen weitgehend reversibel.

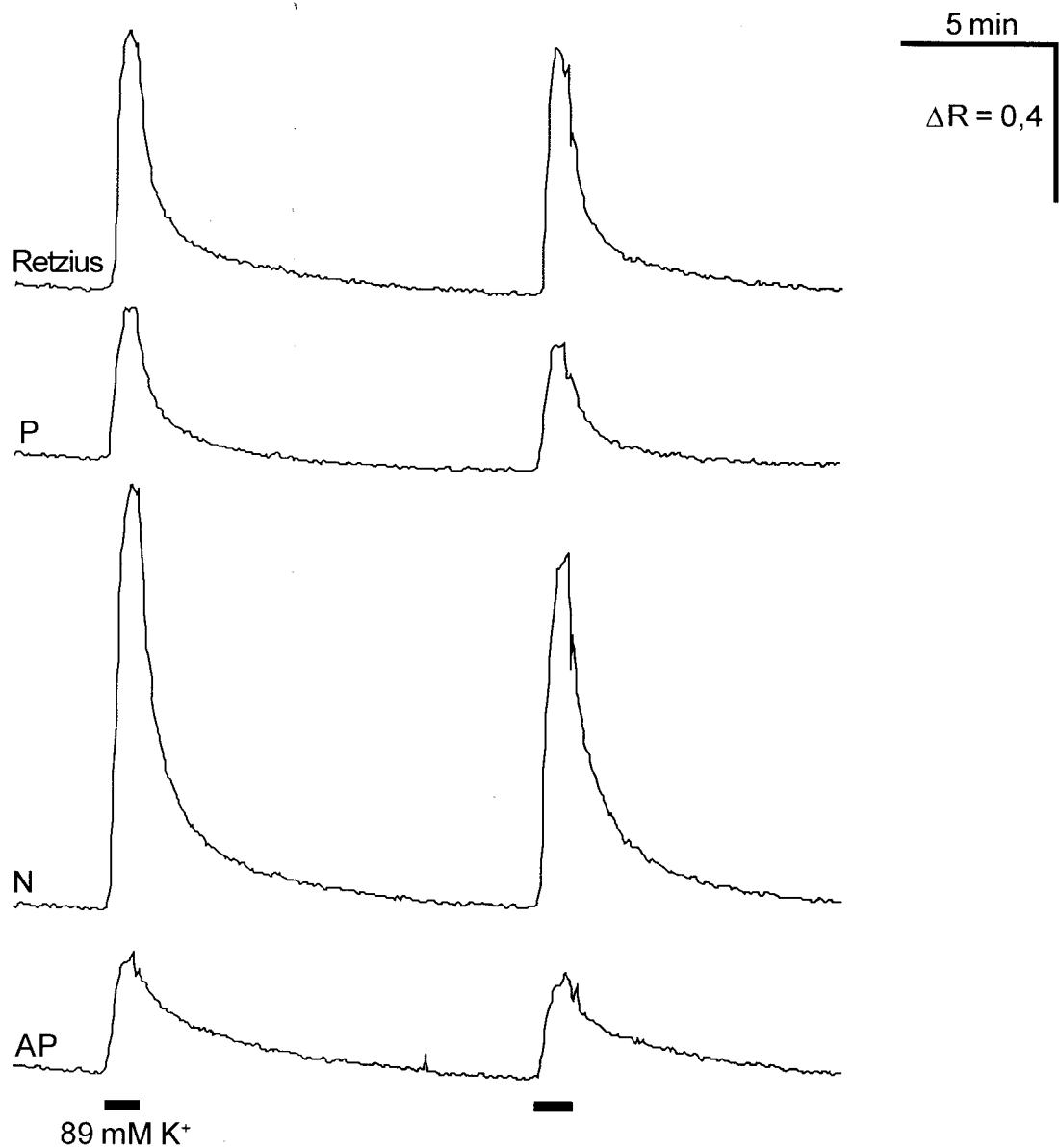


Abb. 11: $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen, induziert durch repetitive Erhöhung von $[K^+]_a$.

Die wiederholte Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 89 mM löste bei den verschiedenen Neuronen annähernd gleiche $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege aus. Simultanmessungen mit Hilfe des CCD-Systems ($R = F_{360}/F_{380}$).

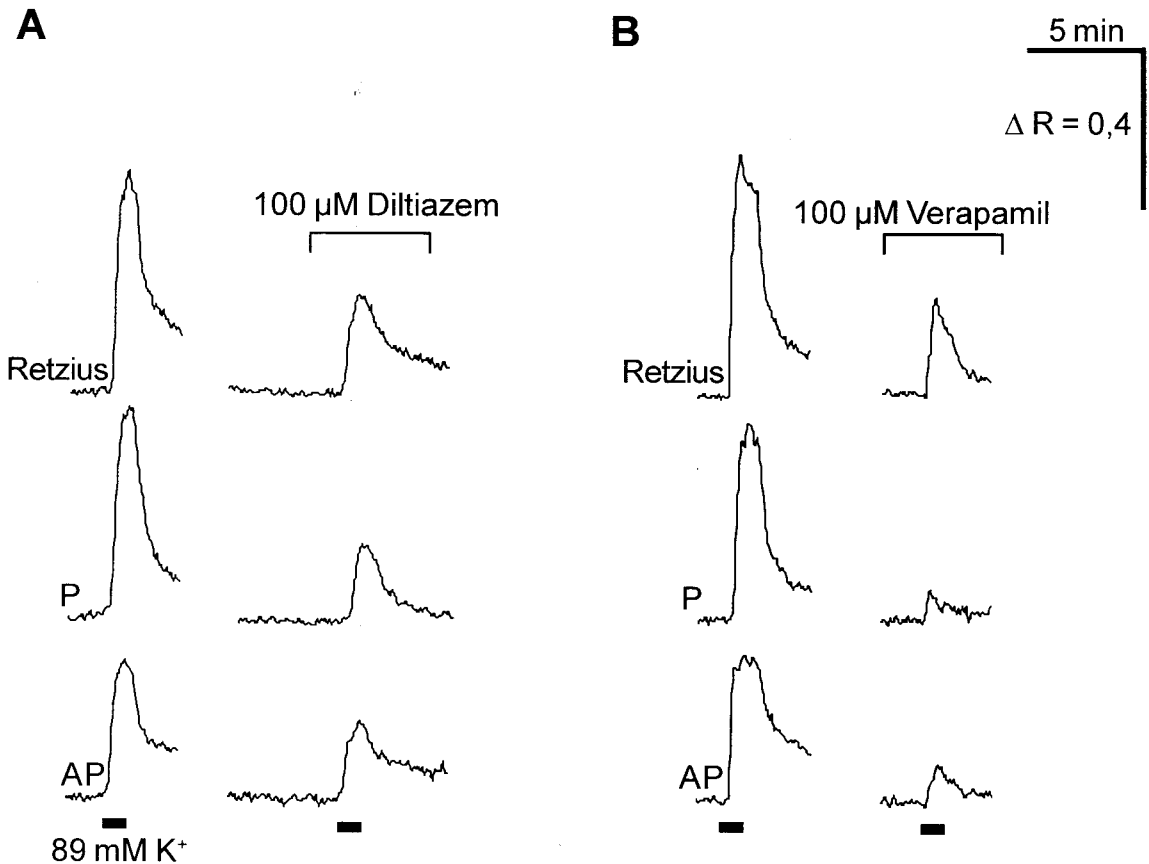


Abb. 12: Wirkung der L-Typ Antagonisten Diltiazem (A) und Verapamil (B) auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, AP- und P-Neuronen.

Bei den 3 Neuronentypen war die Kinetik des durch Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 89 mM induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs ähnlich. Das Antwortmaximum wurde noch während der Applikation erreicht. Diltiazem und Verapamil (beide 100 μM) hatten auf die Anstiegskinetik des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs keinen erkennbaren Einfluss, führten jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Amplitude. Der blockierende Effekt von Verapamil war stärker als der von Diltiazem. Außerdem war die Wirkung bei P-Neuronen stärker ausgeprägt als bei Retzius- und AP-Neuronen. Die Spuren in A und B wurden jeweils simultan mit dem CCD-System gemessen ($R = F_{360}/F_{380}$).

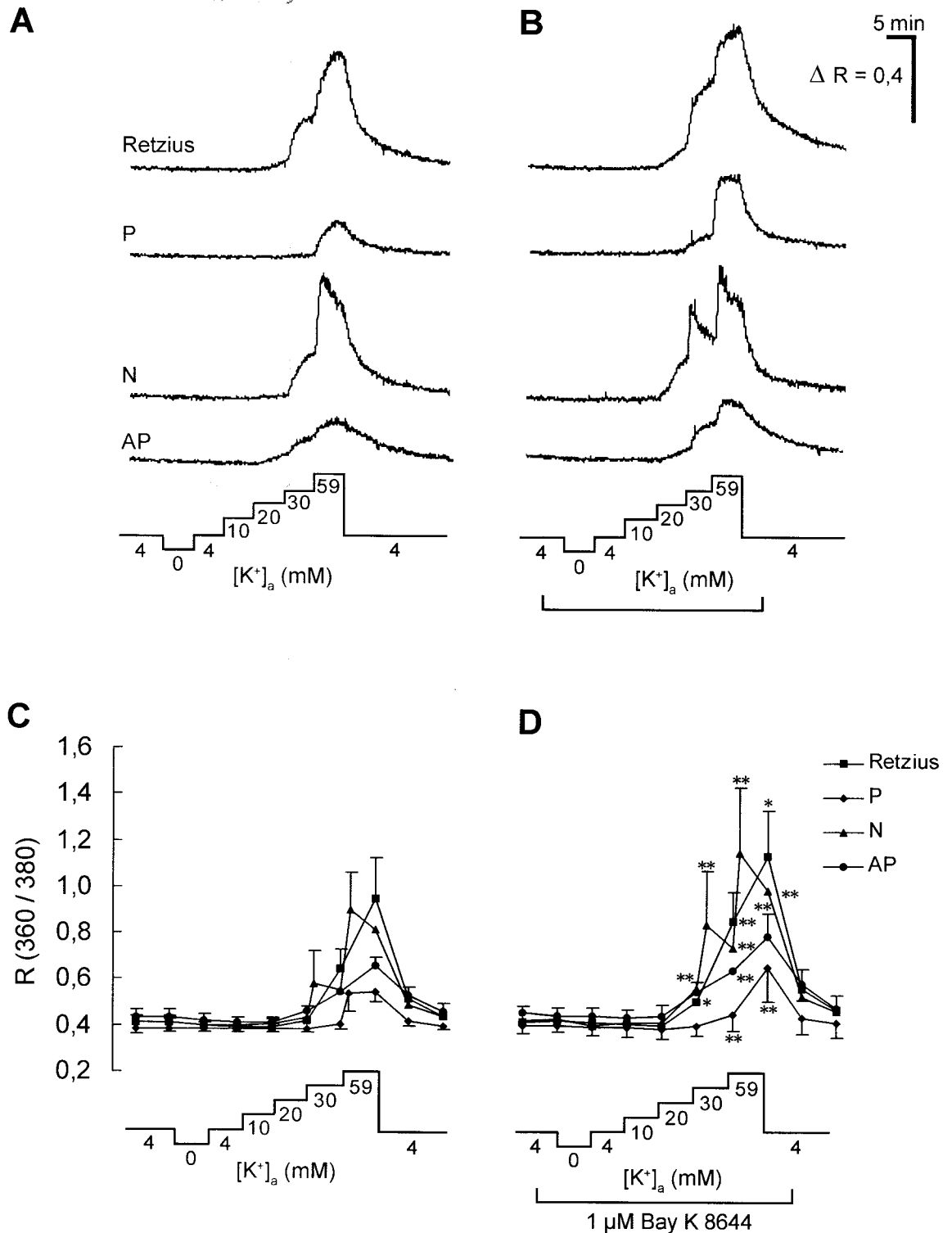


Abb. 13: Wirkung des L-Typ Agonisten Bay K 8644 auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen.

Unter Kontrollbedingungen war bei Retzius-, N- und AP-Neuronen ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bereits bei $[K^+]_a = 20$ mM zu beobachten, bei P-Neuronen erst bei $[K^+]_a = 30$ mM (A, C). Diese Schwellen wurden durch Bay K 8644 nicht beeinflusst. Jedoch war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei allen Neuronen signifikant erhöht.

Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 15 - 32$ Messungen. Die Registrierbeispiele in A sowie B wurden jeweils simultan mit dem CCD-System gemessen. Die Messpunkte in C und D geben $R (F_{360} / F_{380})$ am Ende der 5-minütigen Applikation der jeweiligen Lösung an. Falls während der Applikation ein transientes Maximum auftrat, so wurde dieses ebenfalls quantifiziert und als zusätzlichen Messpunkt eingetragen.

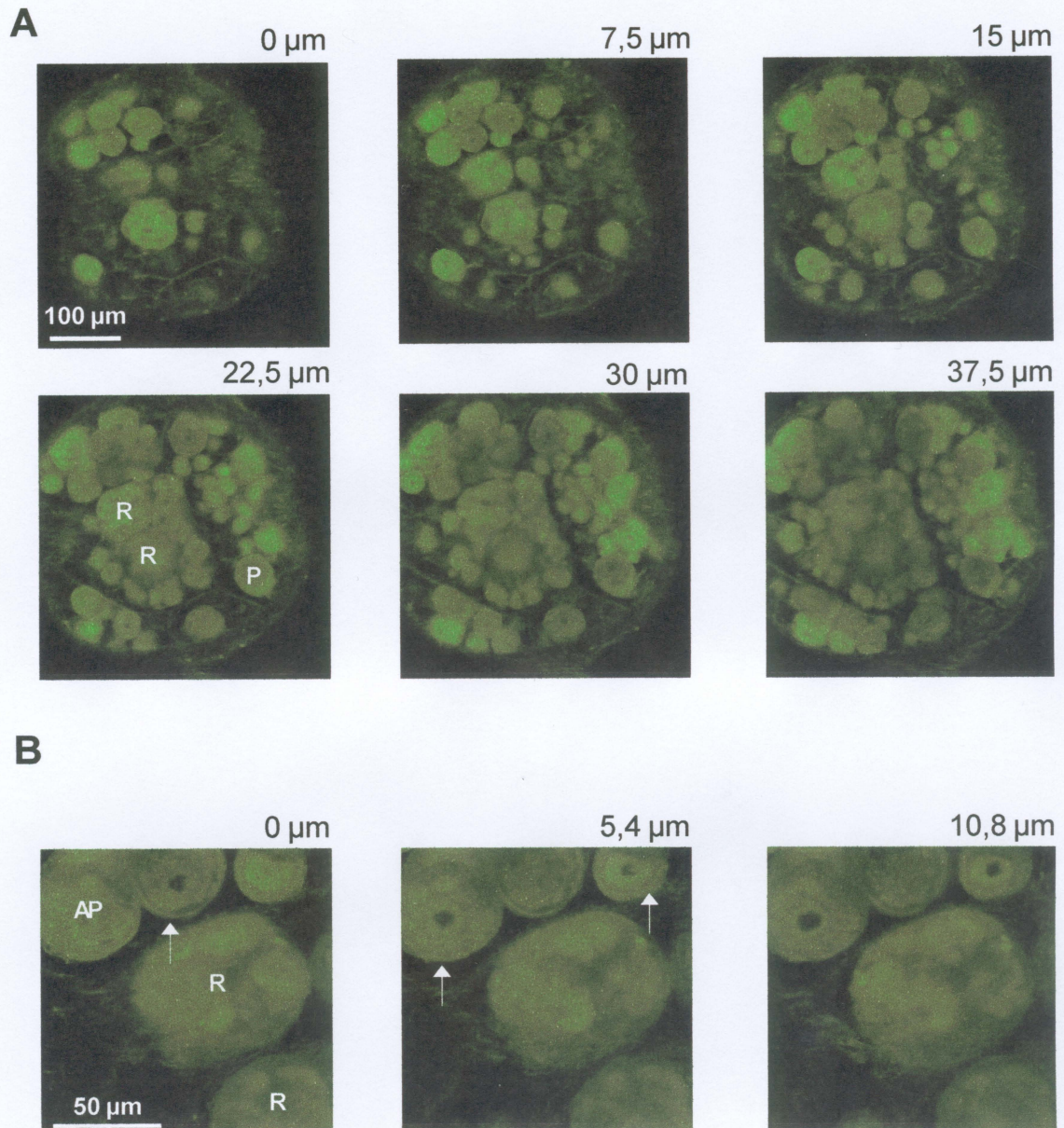


Abb. 14: Konfokale Aufnahmen eines Segmentalganglions zur Lokalisation der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle.

Das Ganglion wurde für 1 Minute in Normalsalzlösung mit 50 μM BODYPI®FL-Verapamil eingelegt und anschließend in Normalsalzlösung aufbewahrt. Die Aufnahmen wurden ca. 1 Stunde nach der Inkubation gemacht.

- A) Aufnahmen in verschiedenen Ebenen mit 7,5 μm Abstand. Offensichtlich wurden alle Neuronen im Segmentalganglion mit dem Farbstoff angefärbt.
- B) Ausschnittsvergrößerungen (Abstand der Schnittebenen: 5,4 μm). Deutlich ist zu erkennen, dass die Neuronen im Bereich der Plasmamembran heller angefärbt waren (Pfeile).

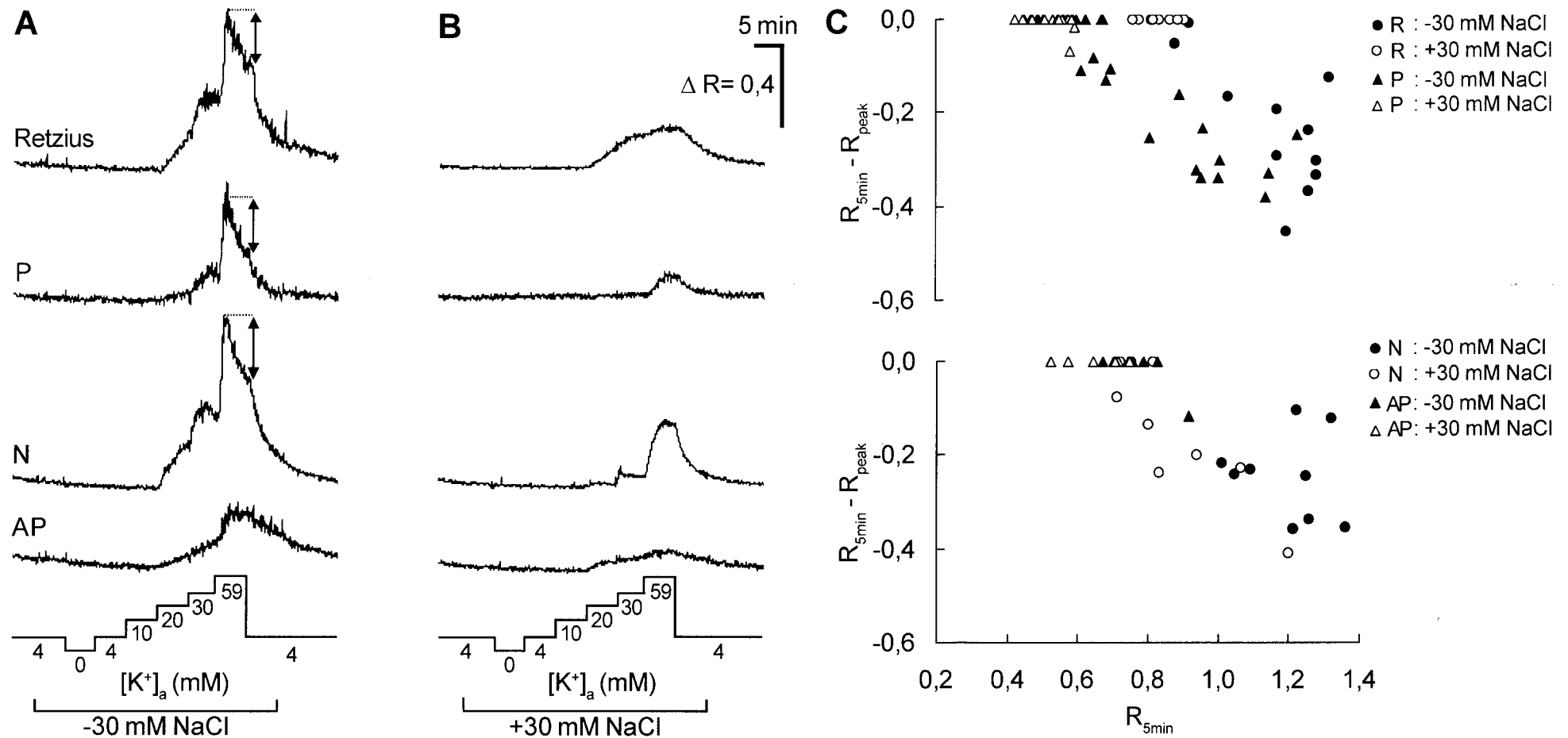


Abb. 15: Einfluss veränderter Osmolarität auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen.

Unter hypotonen Bedingungen (A) waren die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei allen Neuronen vergrößert und unter hypertonen (B) Bedingungen verkleinert (vergl. Abb. 8). Retzius- und P-Neuronen, nicht jedoch N- und AP-Neuronen, zeigten unter hypotonen Bedingungen bei $[K^+]_a = 59$ mM verstärktes transientes Verhalten (C). Unter hypertonen Bedingungen war das transiente Verhalten meist unterdrückt.

Die in A und B dargestellten Registrierbeispiele wurden jeweils simultan mit dem CCD-System gemessen.

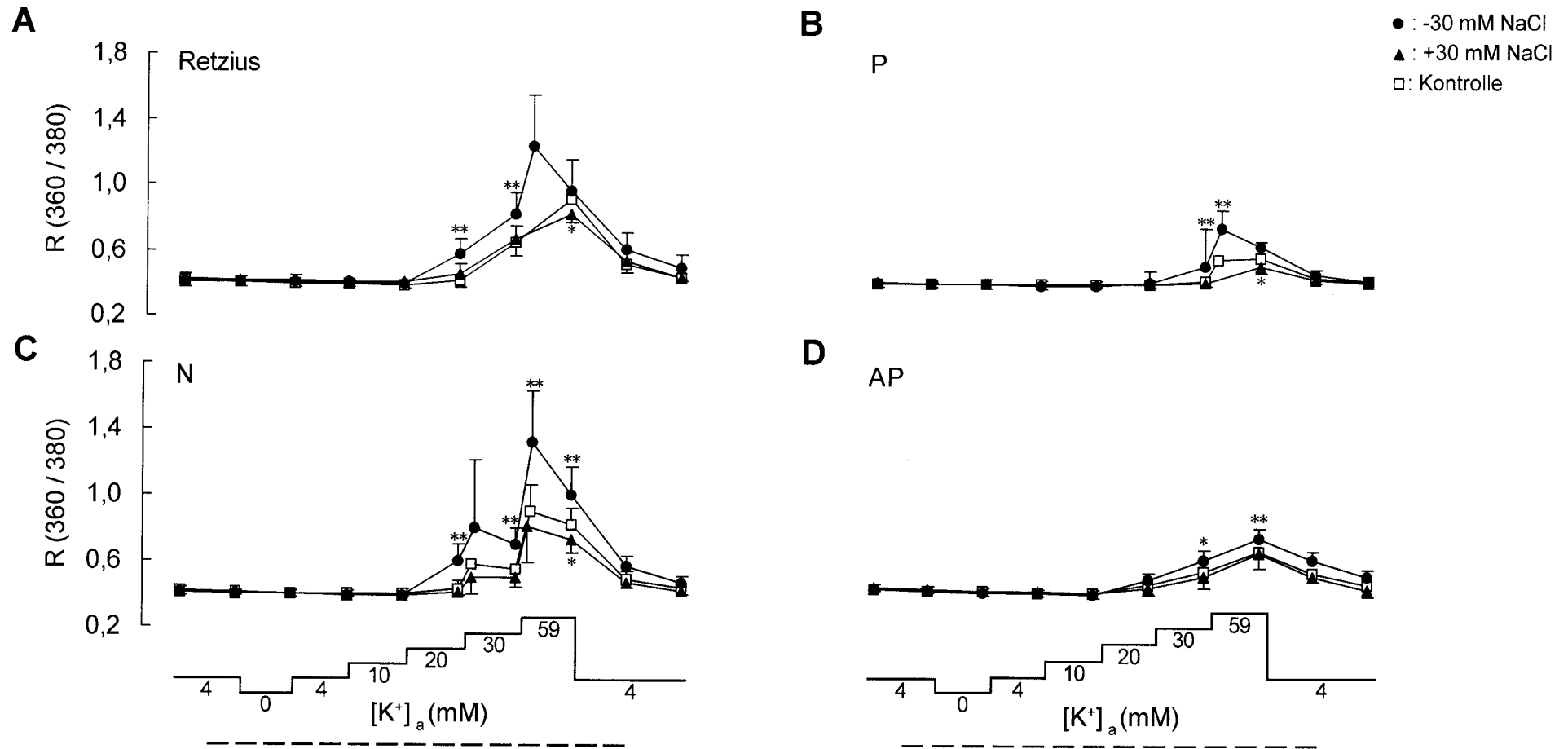


Abb. 16: K^+ -induzierter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei unterschiedlicher Badosmolarität bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen: Zusammenfassung der Daten.

Bei allen vier Neuronentypen war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg unter hypotonen Bedingungen vergrößert und unter hypertonen Bedingungen verkleinert. Die Schwelle zur Auslösung des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs blieb jedoch erhalten. Bei Retzius- und P-Neuronen wurden unter hypotonen Bedingungen bei $[K^+]_a = 59$ mM häufig transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege beobachtet, die unter Kontrollbedingungen nur selten auftraten (A,B).

Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 8 - 23$ (Retzius), $12 - 21$ (P), $9 - 12$ (N) und $6 - 9$ (AP) Messungen mit dem CCD-System; Sterne kennzeichnen signifikante Abweichungen von den unter Kontrollbedingungen erhaltenen Daten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Bezüglich der Gewinnung der Datenpunkte siehe Abb. 13. Die durchbrochene Linie kennzeichnet den Zeitraum der Veränderung der Badosmolarität.

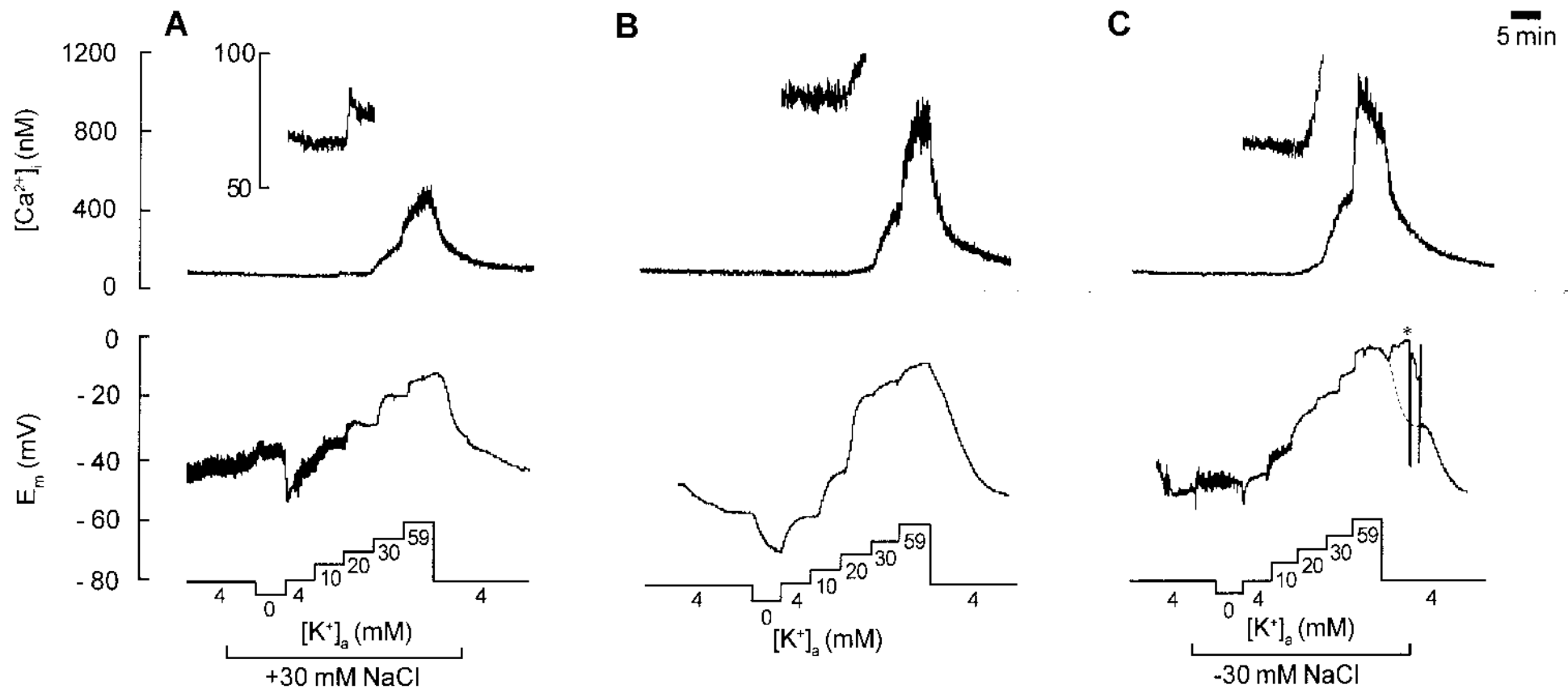


Abb. 17: Einfluss veränderter Badosmolarität auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei Retzius-Neuronen: Beispielregistrierungen.

Änderung der Badosmolarität bei $[K^+]_a = 4$ mM hatte keinen Effekt auf $[Ca^{2+}]_i$ oder E_m (A, C). Ein K^+ -induzierter $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde unabhängig von der Osmolarität bei $[K^+]_a = 20$ mM ausgelöst. Unter hypertonen Bedingungen (+30 mM NaCl) war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg insgesamt verkleinert und unter hypotonen Bedingungen (-30 mM NaCl) vergrößert (A, C, jeweils obere Spuren; Vergl. Abb. 16). Die Insets in den oberen Teilabbildungen zeigen die jeweilige Spur in vertikaler Spreizung, um die Schwelle des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zu verdeutlichen.

Unter hypotonen Bedingungen wurden die Neuronen während der E_m -Ableitungen oft verloren, vermutlich bedingt durch die große Zellvolumenänderung (* in C, untere Spur; vergl. Abb. 20).

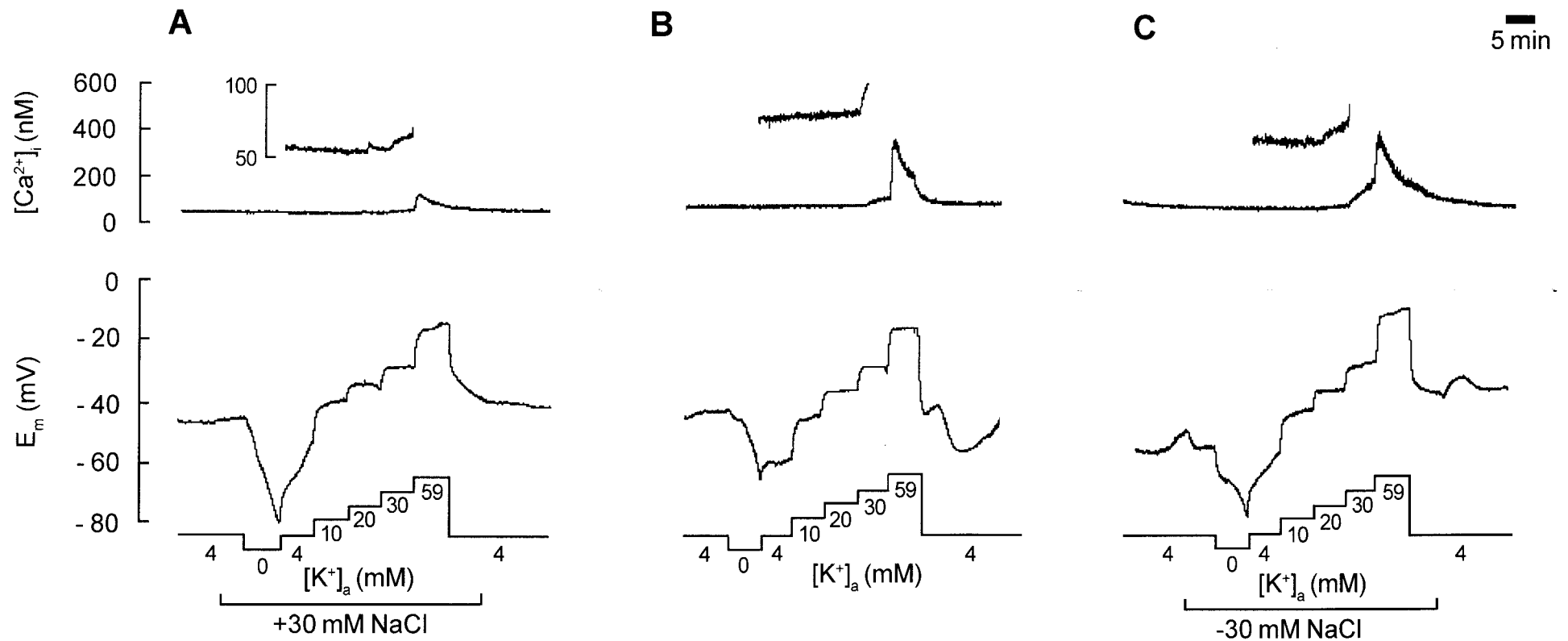


Abb. 18: Einfluss veränderter Badosmolarität auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei P-Neuronen: Beispielregistrierungen.

Unter hypertonen Bedingungen (+30 mM NaCl) wurde bei $[K^+]_a = 30$ mM ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ausgelöst (A), unter hypotonen Bedingungen (-30 mM NaCl) dagegen schon bei $[K^+]_a = 20$ mM (A, C, jeweils obere Spuren). Unter Kontrollbedingungen trat ein $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ebenfalls erst bei $[K^+]_a = 30$ mM ein (B, obere Spur); der Anstieg war jedoch größer als unter hypertonen Bedingungen. Die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege waren unter hypertonen Bedingungen verringert und unter hypotonen Bedingungen vergrößert. Die Insets in den oberen Teilabbildungen zeigen die jeweilige Spur in vertikaler Spreizung, um die Schwelle des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zu verdeutlichen.

Die K^+ -induzierten E_m -Verschiebungen waren nur wenig von der Badosmolarität beeinflusst (siehe Abb. 19).

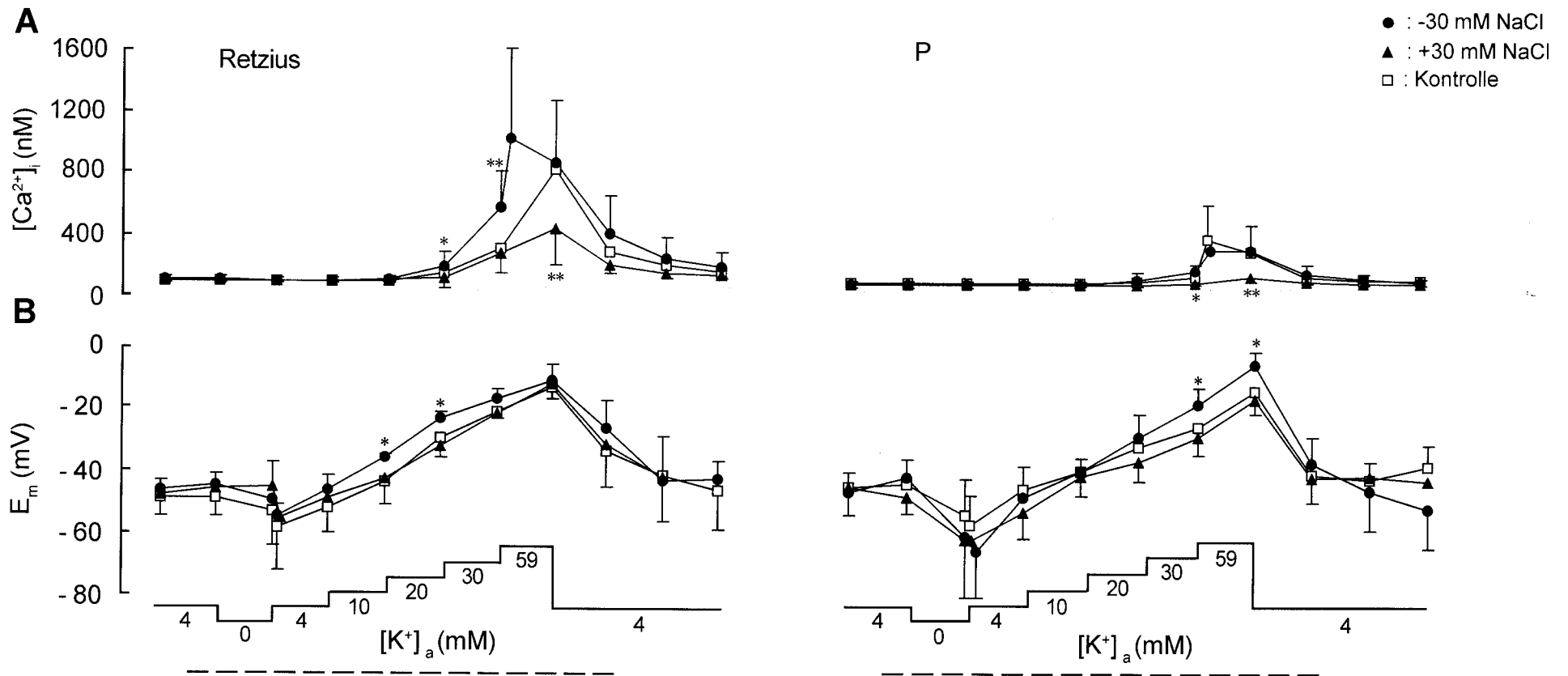


Abb. 19: Einfluss veränderter Badosmolarität auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ (A) und E_m (B) bei Retzius- und P-Neuronen: Zusammenfassung der Daten.

A) Bei Retzius-Neuronen war der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[K^+]_a = 20$ oder 30 mM unter hypotonen Bedingungen (-30 mM NaCl) signifikant erhöht und unter hypertonen Bedingungen ($+30$ mM NaCl) bei $[K^+]_a = 59$ mM signifikant erniedrigt. Bei P-Neuronen hatten hypotone Bedingungen keinen Effekt, während unter hypertonen Bedingungen der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[K^+]_a = 59$ mM ebenfalls signifikant reduziert war.

B) Retzius-Neuronen waren unter hypotonen Bedingungen bei $[K^+]_a = 10$ und 20 mM stärker depolarisiert als unter Kontrollbedingungen, P-Neuronen bei $[K^+]_a = 30$ und 59 mM. Hypertone Bedingungen hatten keinen Effekt auf E_m .

Daten in A und B sind Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 6 - 12$ (Retzius) und $6 - 11$ (P) Versuchen; Sterne kennzeichnen signifikante Abweichungen von den Kontrollbedingungen gewonnenen Daten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Bezüglich der Gewinnung der Datenpunkte siehe Abb. 13. Die durchbrochene Linie kennzeichnet den Zeitraum der Veränderung der Badosmolarität.

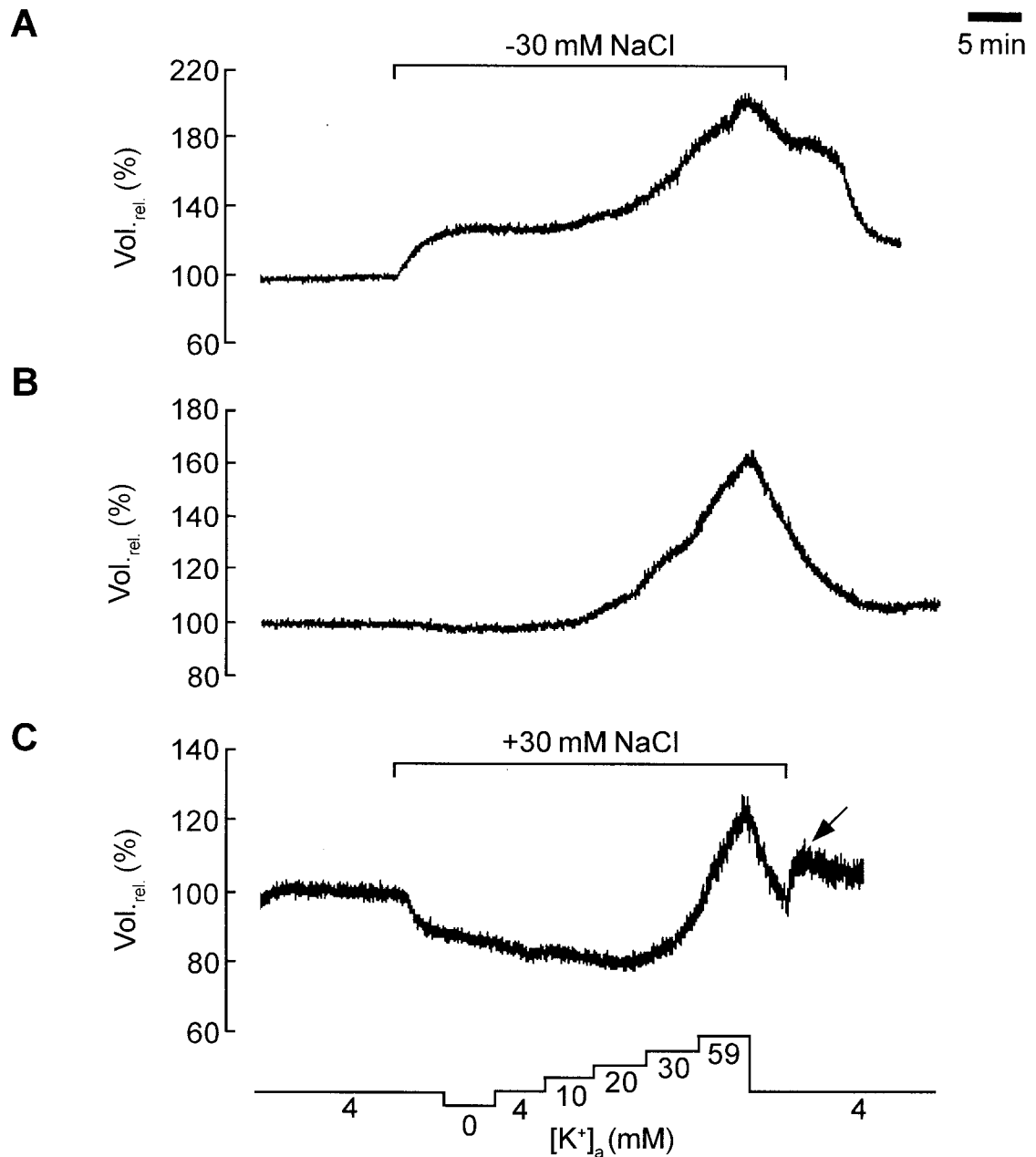


Abb. 20: K⁺-induzierte Änderungen des Zellvolumens von Retzius-Neuronen bei unterschiedlichen osmotischen Bedingungen.

- A) Beim Wechsel in die hypotone Versuchslösung stieg das Zellvolumen um ca. 20 - 30% an. Die Erhöhung von [K⁺]_a auf 10, 20, 30 und 59 mM induzierte jeweils einen zusätzlichen Anstieg des Zellvolumens. Beim Übergang auf [K⁺]_a = 4 mM nahm das Volumen nur langsam ab. Nach Wechsel in die isotone Versuchslösung kehrte das Zellvolumen nahezu auf den Ausgangswert zurück.
- B) Unter isotonen Bedingungen löste die Erhöhung von [K⁺]_a auf 10, 20, 30 und 59 mM ebenfalls jeweils eine Zunahme des Zellvolumens aus, die weitgehend reversibel war.
- C) Beim Wechsel in die hypertone Versuchslösung nahm das Zellvolumen um 15 - 20% ab. Eine K⁺-induzierte Volumenzunahme war erst bei [K⁺]_a = 20 mM zu beobachten. Die Volumenzunahme unter hypertonen Bedingungen war bei [K⁺]_a = 59 mM deutlich geringer als unter isotonen Bedingungen. Nach Übergang zu isotonen Bedingungen trat eine vorübergehende Zellschwellung auf (overshoot, Pfeil), obwohl das Ausgangsvolumen praktisch erreicht war.

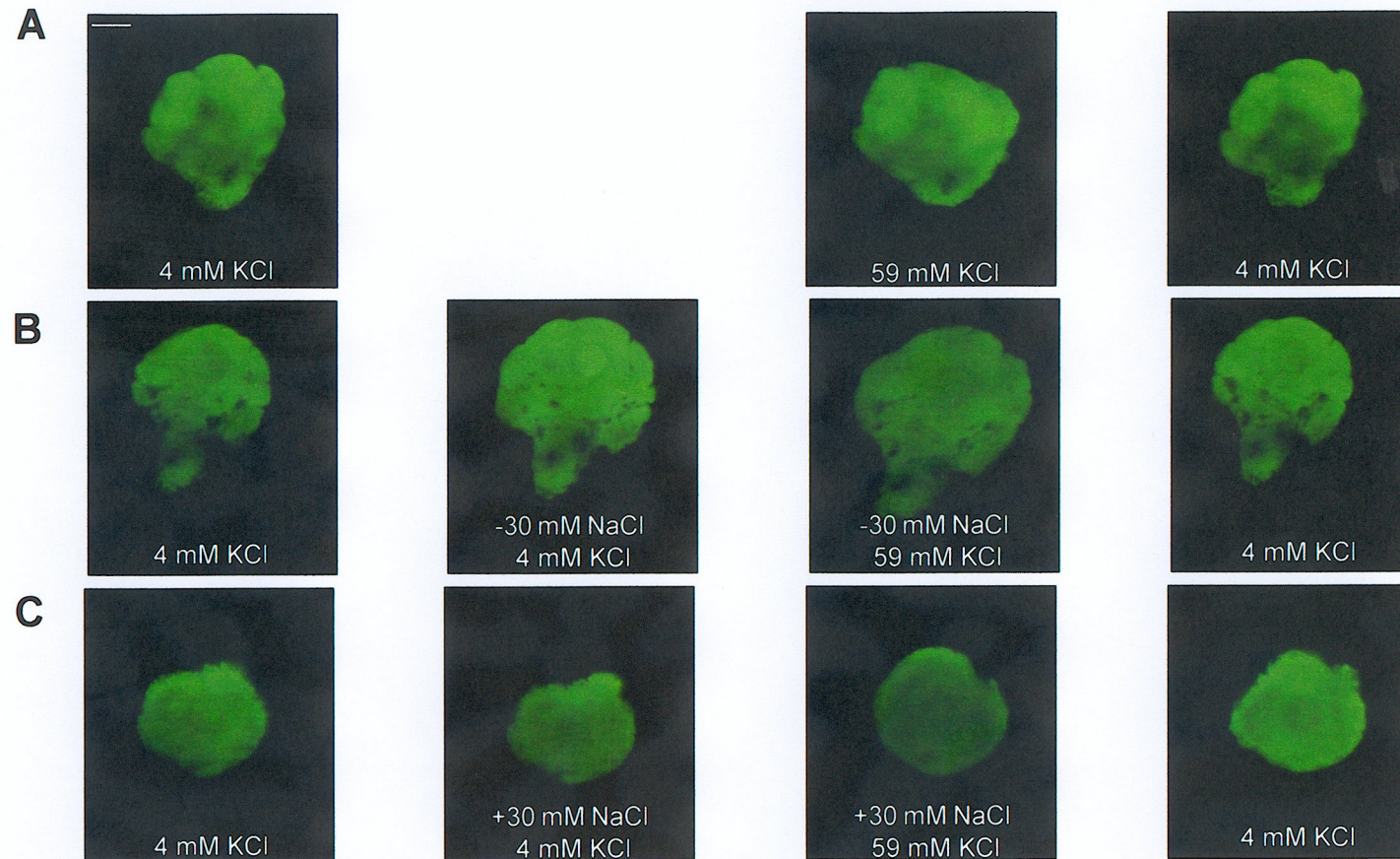


Abb. 21: Konfokale Aufnahmen von Retzius-Neuronen in Versuchslösungen mit unterschiedlicher K^+ -Konzentration und/oder Osmolarität.

A) Isotone Bedingungen: Bei Erhöhung der $[K^+]_a$ von 4 auf 59 mM nahm der Zellquerschnitt um ca. 22 % zu.

B) Hypotone Bedingungen: Die Entfernung von 30 mM NaCl induzierte eine Zunahme des Zellquerschnitts um ca. 37 %, die nach Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM auf ca. 62 % anstieg.

C) Hypertone Bedingungen: Die Zugabe von 30 mM NaCl induzierte eine Abnahme des Zellquerschnitts um ca. 18 %, die nach Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM in eine Zunahme des Zellquerschnitts (+ 17 %) überging.

Die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen induzierten Volumenänderungen waren weitgehend reversibel. Zum Zeitpunkt der Aufnahmen waren die Präparate 9 Minuten in der jeweiligen Lösung inkubiert. Der Maßstab in A entspricht 20 µm.

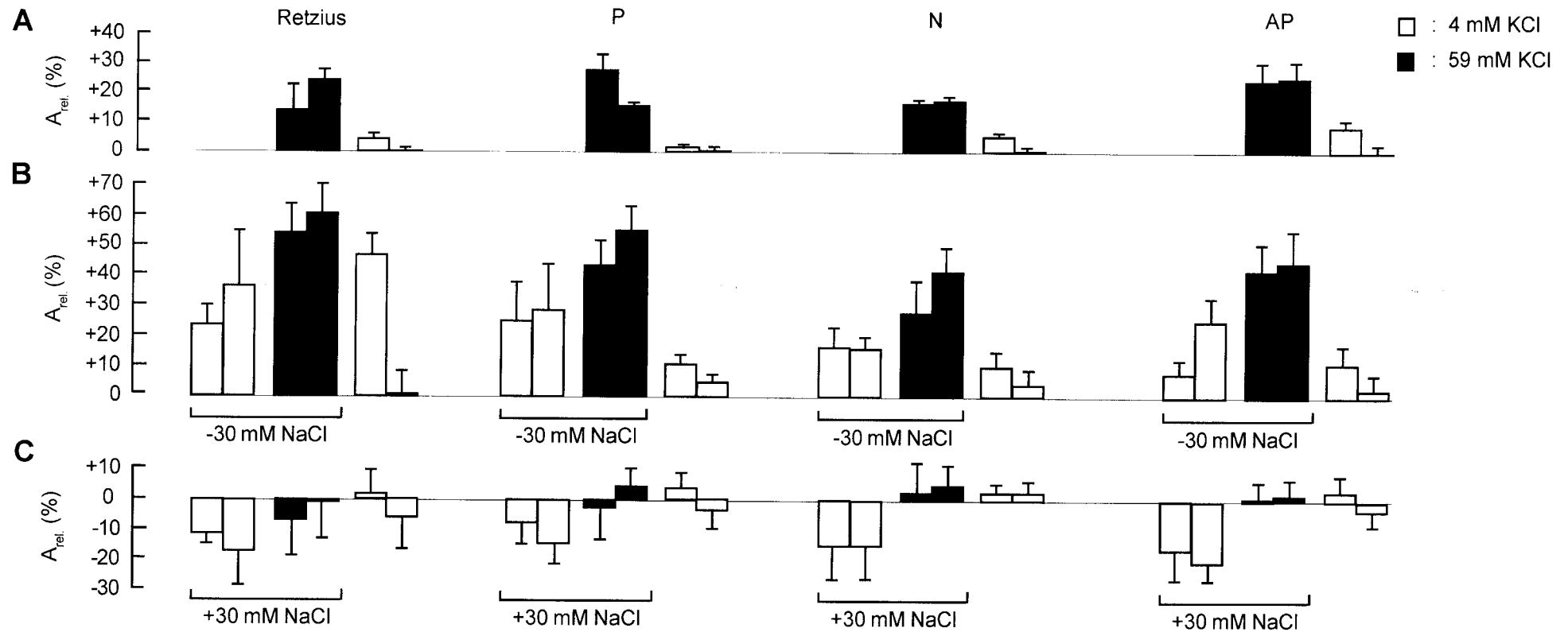


Abb. 22: K^+ -induzierte Veränderungen der Querschnittsfläche (A_{rel}) von Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen bei unterschiedlicher Badosmolarität.

Der linke Balken eines Balkenpaares stellt die Messwerte (Mittelwerte $\pm$ S.D.) 1 Minute nach Einstellung der jeweiligen Versuchsbedingungen dar und der rechte Balken 9 Minuten danach.

- A) Unter isotonen Bedingungen führte die Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM bei allen vier Neuronentypen zu einer reversiblen Vergrößerung von A_{rel} . ($n = 6 - 9$).
- B) Unter hypotonen Bedingungen nahm A_{rel} zunächst um etwa 35 % zu. Bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM nahm A_{rel} weiter zu, etwa im gleichen Maße wie unter Kontrollbedingungen. Die Veränderungen von A_{rel} waren reversibel, jedoch war die Erholung bei allen Neuronen deutlich langsamer als unter Kontrollbedingungen ($n = 5 - 8$).
- C) Unter hypertonen Bedingungen nahm A_{rel} bei allen Neuronen zunächst um fast 20 % ab. Bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM stieg A_{rel} wieder an und erreichte bei Retzius-Neuronen nach 9 Minuten den Ausgangswert. Bei P-, N und AP-Neuronen stieg A_{rel} sogar etwas über den Ausgangswert. Diese K^+ -induzierte Zunahme entsprach denen unter Kontrollbedingungen ($n = 4 - 8$).

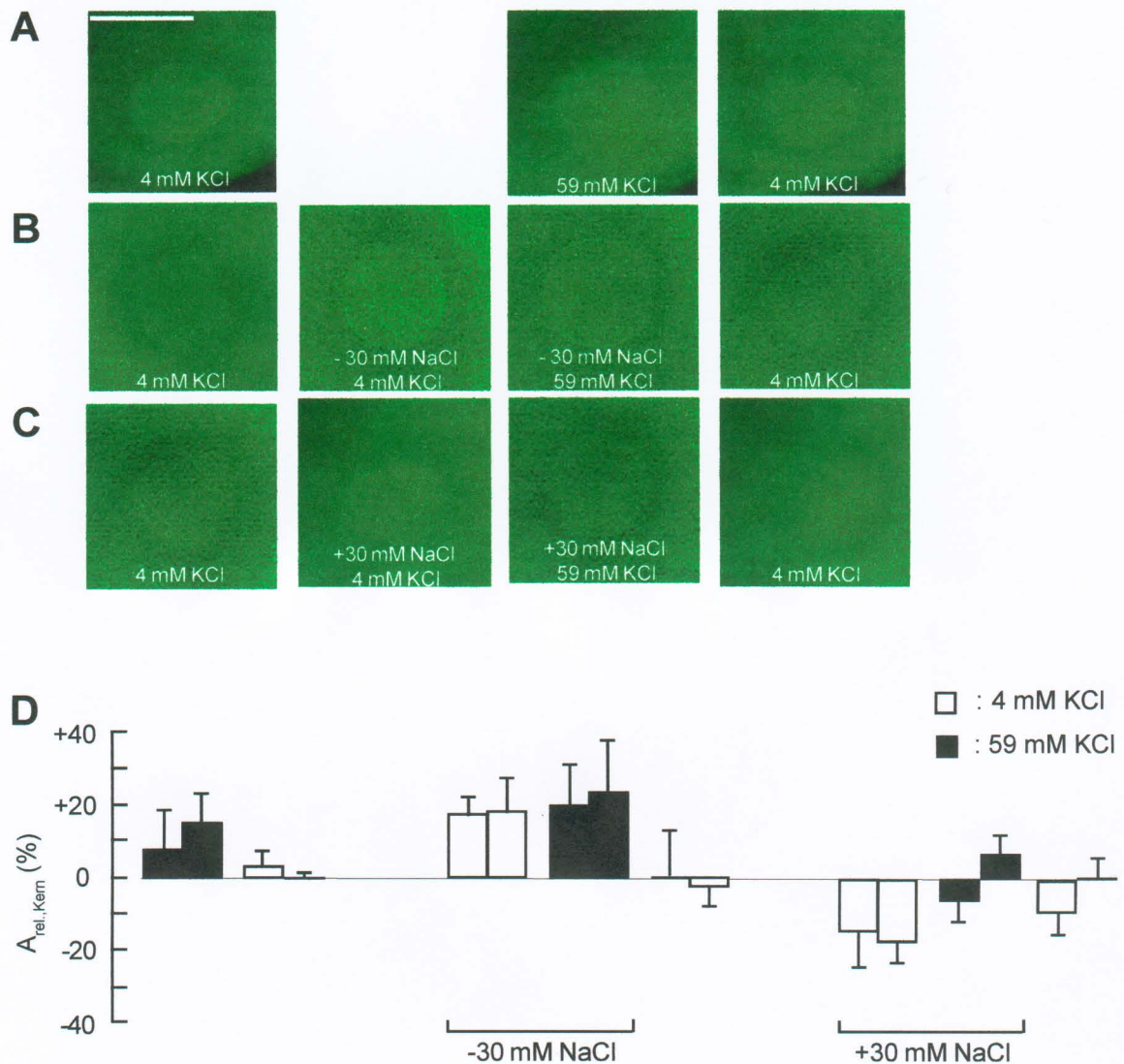


Abb. 23: K^+ -induzierte Veränderungen des Zellkernquerschnitts ($A_{rel,Kern}$) bei Retzius-Neuronen unter isotonen und anisotonen Bedingungen.

A-C) Konfokale Aufnahmen von Zellkernen von Retzius-Neuronen. Die Zellen wurden mit Oregon Green®488-BAPTA-1 iontophoretisch angefärbt. Die Bilder wurden 9 Minuten nach Applikationsbeginn der jeweiligen Versuchslösung aufgenommen.

D) Statistische Auswertung. Der linke Balken eines Balkenpaares stellt die Messwerte (Mittelwerte $\pm$ S.D.) 1 Minute nach Einstellung der jeweiligen Versuchsbedingungen dar und der rechte Balken 9 Minuten danach.

Unter isotonen Bedingungen nahm $A_{rel,Kern}$ bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM um etwa 15 % zu (linke Teilabbildung, $n = 5$).

Unter hypotonen Bedingungen nahm $A_{rel,Kern}$ um etwa 20 % zu. Bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM stieg $A_{rel,Kern}$ weiter an, jedoch weniger als unter Kontrollbedingungen (mittlere Teilabbildung, $n = 5$).

Unter hypertonen Bedingungen nahm $A_{rel,Kern}$ um ca. 20 % ab. Bei Erhöhung von $[K^+]_a$ auf 59 mM stieg $A_{rel,Kern}$ innerhalb von 9 Minuten über den Ausgangswert an (rechte Teilabbildung, $n = 4$).

Die Kalibrierlinie in A entspricht einer Länge von 8 μm .

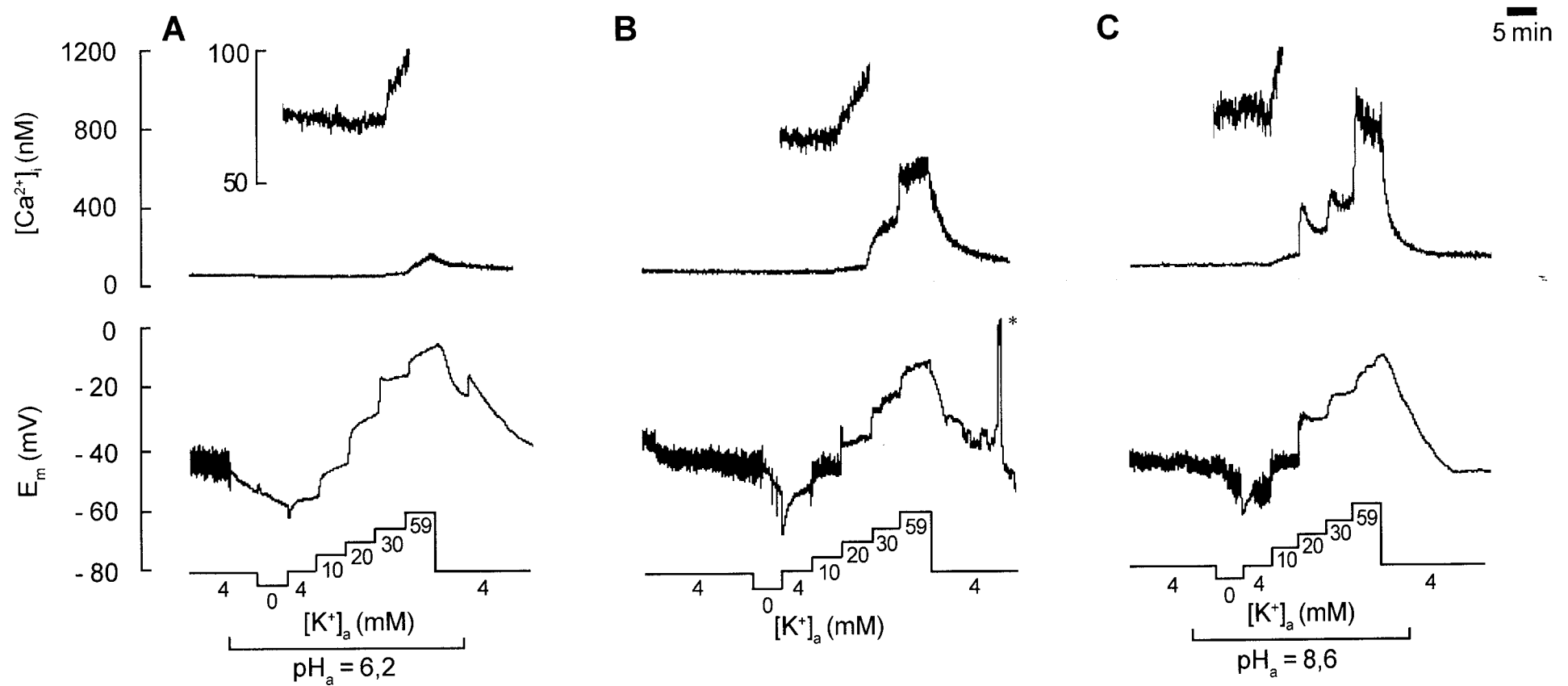


Abb. 24: Einfluss von pH_a auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m bei Retzius-Neuronen: Beispielregistrierungen

Unter Kontrollbedingungen (B, obere Spur) war ein geringer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ auf 20 mM zu beobachten. Die Schwelle für den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg wurde bei Erniedrigung von pH_a auf 6,2 (A, obere Spur) zu $[\text{K}^+]_a = 30$ mM und bei Erhöhung von pH_a auf 8,6 (C, obere Spur) zu $[\text{K}^+]_a = 10$ mM verschoben. Die Insets in den oberen Teilabbildungen zeigen die jeweilige Spur in vertikaler Spreizung, um die Schwelle des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs zu verdeutlichen. Die Wirkung von $[\text{K}^+]_a$ auf E_m blieb bei erniedrigtem bzw. erhöhtem pH_a weitgehend unverändert (A, C untere Spur). Der Stern in B kennzeichnet den Wiedereinstich der Mikroelektrode.

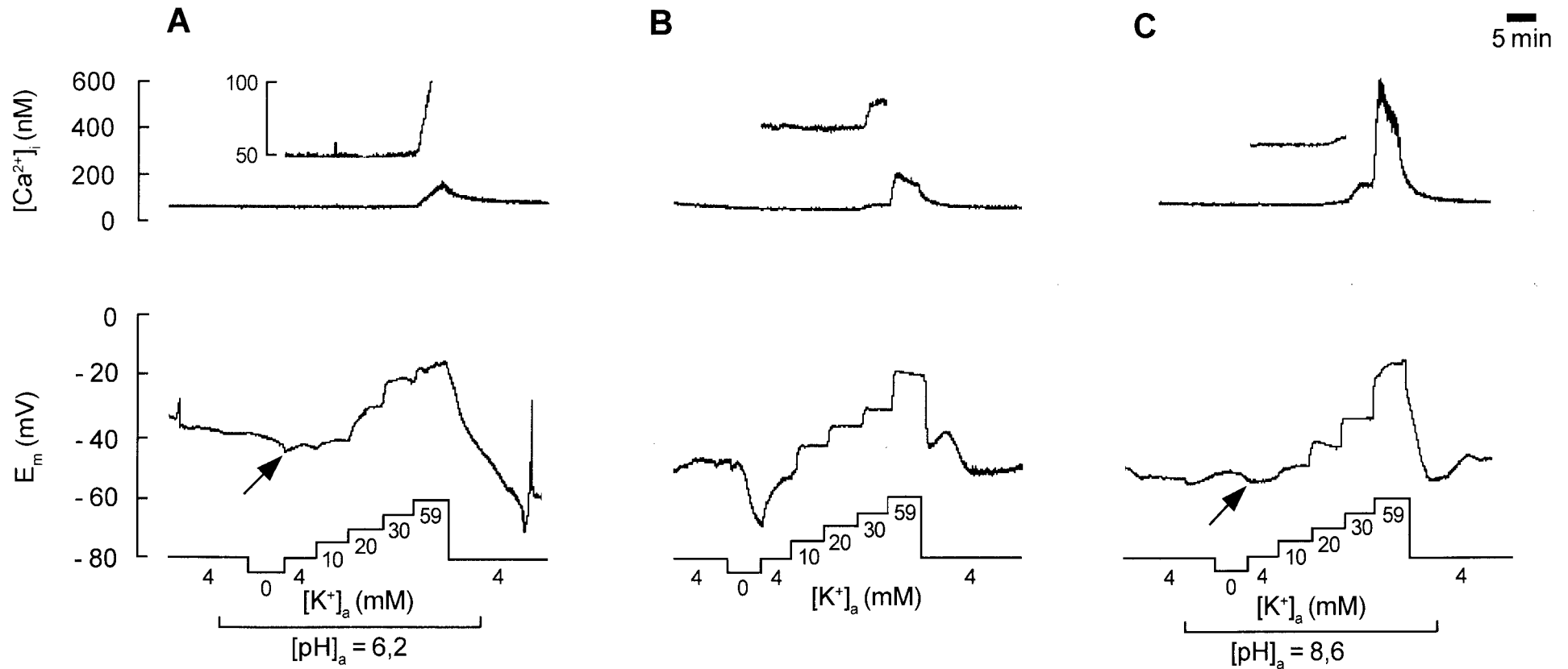


Abb. 25: Einfluss von pH_a auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m bei P-Neuronen: Beispielregistrierungen

Unter Kontrollbedingungen (B, obere Spur) war ein geringer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei Erhöhung von $[\text{K}^+]_a$ auf 30 mM zu beobachten. Die Schwelle für den K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg wurde bei Erniedrigung von pH_a auf 6,2 (A, obere Spur) auf $[\text{K}^+]_a = 59$ mM und bei Erhöhung von pH_a auf 8,6 (C, obere Spur) auf $[\text{K}^+]_a = 20$ mM verschoben. Bei $\text{pH}_a = 8,6$ war das transiente Verhalten bei $[\text{K}^+]_a = 59$ mM verstärkt (C, obere Spur; vergl. Abb. 32). Die Insets in den oberen Teilabbildungen zeigen die jeweilige Spur in vertikaler Spreizung, um die Schwelle des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs zu verdeutlichen.

Bei $\text{pH}_a = 6,2$ war E_m zwischen $[\text{K}^+]_a = 4$ und 30 mM in depolarisierende und bei $\text{pH}_a = 8,6$ in hyperpolarisierende Richtung (A, C untere Spur) verschoben. Die Membranhypervolarisation in K^+ -freier Lösung war bei Veränderung des pH_a fast vollständig unterdrückt (siehe Pfeile in A, C; untere Spuren).

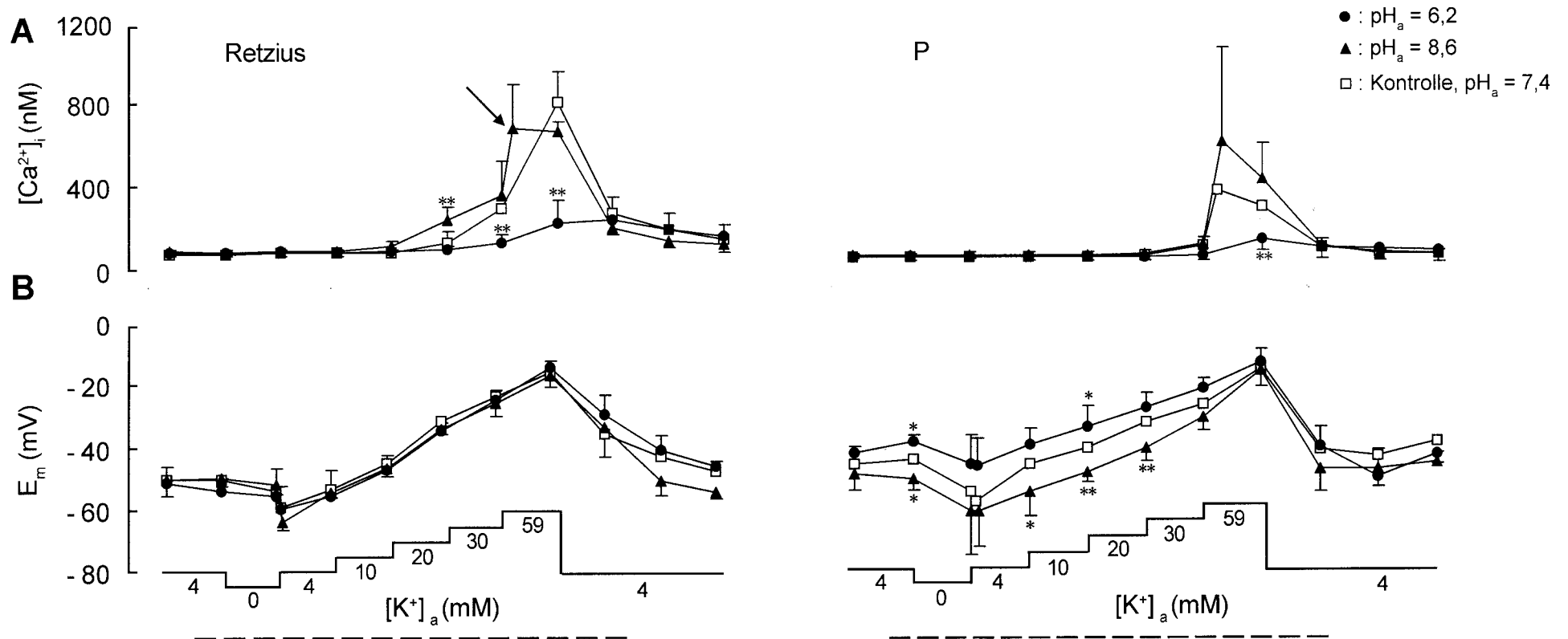


Abb. 26: Einfluss von pH_a auf die K⁺-induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ (A) und E_m (B) bei Retzius- und P-Neuronen: Zusammenfassung der Daten.

A) Bei pH_a = 6,2 war bei beiden Neuronentypen der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[K^+]_a$ = 59 mM und bei Retzius-Neuronen auch bei $[K^+]_a$ = 30 mM signifikant erniedrigt. Bei pH_a = 8,6 war der K⁺-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-Neuronen bei $[K^+]_a$ = 20 mM signifikant vergrößert und der transiente Charakter des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $[K^+]_a$ = 59 mM vergrößert (Pfeil). Bei P-Neuronen war nur der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[K^+]_a$ = 59 mM vergrößert.

B) Bei Retzius-Neuronen hatte pH_a keine Wirkung auf E_m bei den verschiedenen $[K^+]_a$. Bei P-Neuronen war E_m bei pH_a = 6,2 insgesamt in positive und bei pH_a = 8,6 in negative Richtung verschoben. Nur bei $[K^+]_a$ = 59 mM hatte pH_a keine Wirkung auf E_m .

Daten in A und B sind Mittelwerte $\pm$ S.D. aus n = 5 - 11 (Retzius) und 5 - 18 (P) Versuchen; Sterne kennzeichnen signifikante Abweichungen von den unter Kontrollbedingungen gewonnenen Daten (* = p < 0,05; ** = p < 0,01). Bezüglich der Gewinnung der Datenpunkte siehe Abb. 13. Die durchbrochene Linie kennzeichnet den Zeitraum der Veränderung von pH_a.

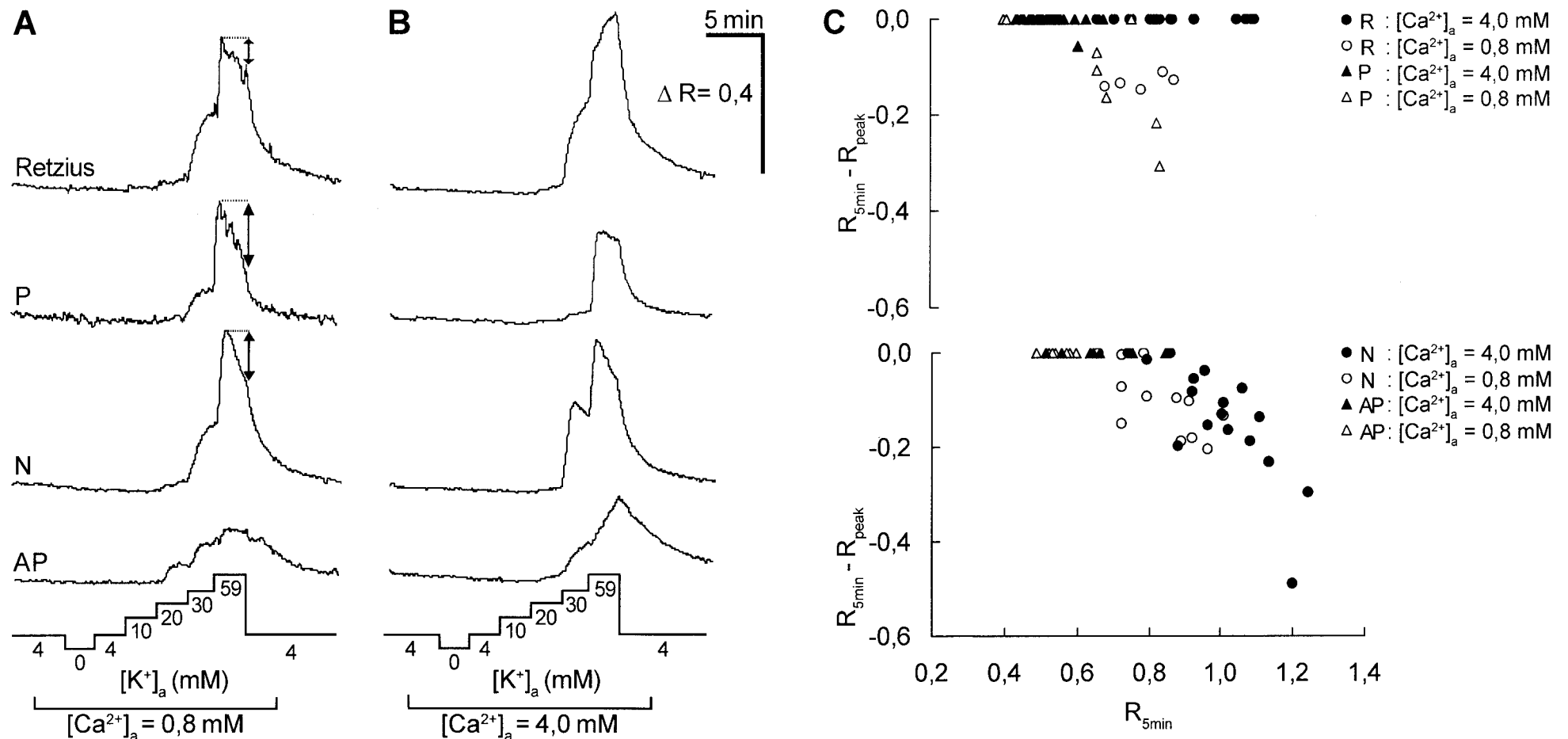


Abb. 27: Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-, P-, N- und AP-Neuronen.

- A, B) Bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ (A) waren die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei Retzius- und AP-Neuronen bei $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ verkleinert. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_a$ auf $4,0 \text{ mM}$ (B) hatte keinen Einfluss auf die K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege der untersuchten Neuronen (vergl. Abb. 8). Retzius- und P-Neuronen zeigten bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ und $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ verstärktes transientes Verhalten (vergl. Abb. 8). Die dargestellten Registrierbeispiele in A und B wurden jeweils simultan mit dem CCD-System gemessen.
- C) Die $[Ca^{2+}]_a$ -Erhöhung führte bei den untersuchten Neuronen meist zu einer Unterdrückung und die $[Ca^{2+}]_a$ -Erniedrigung zu einer Verstärkung des transienten Verhaltens.

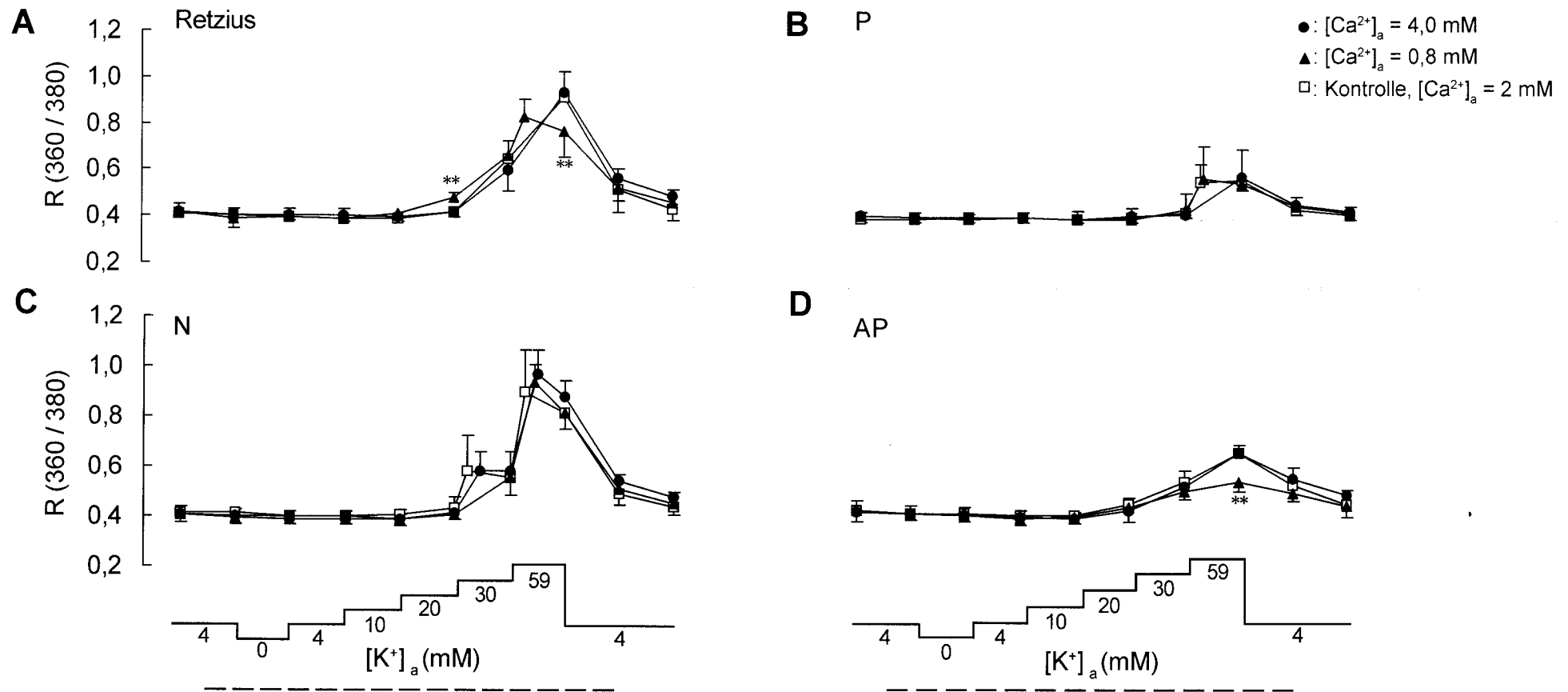


Abb. 28: Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzium-, P-, N- und AP-Neuronen: Zusammenfassung der Daten.

Bei $[Ca^{2+}]_a = 4 \text{ mM}$ war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzium-Neuronen ab $[K^+]_a = 20 \text{ mM}$ (A) und bei N-Neuronen ab $[K^+]_a = 30 \text{ mM}$ (C) leicht vermindert. Bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ war der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzium-Neuronen ab $[K^+]_a = 10 \text{ mM}$ vergrößert; nur bei $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ trat eine Reduktion auf (A). Bei N-Neuronen blieb der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ unbeeinflusst. AP-Neuronen zeigten eine hoch signifikante Verkleinerung des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $[K^+]_a = 59 \text{ mM}$ (D). Die $[Ca^{2+}]_a$ -Erniedrigung hatte bei P-Neuronen keinen Effekt auf den K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (B). Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 8 - 23$ (Retzium), $12 - 21$ (P), $9 - 12$ (N) und $6 - 9$ (AP) Messungen mit dem CCD-System; Sterne kennzeichnen signifikante Abweichungen von den unter Kontrollbedingungen erhaltenen Daten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Bezüglich der Gewinnung der Datenpunkte siehe Abb. 13. Die durchbrochene Linie kennzeichnet den Zeitraum der Veränderung von $[Ca^{2+}]_a$.

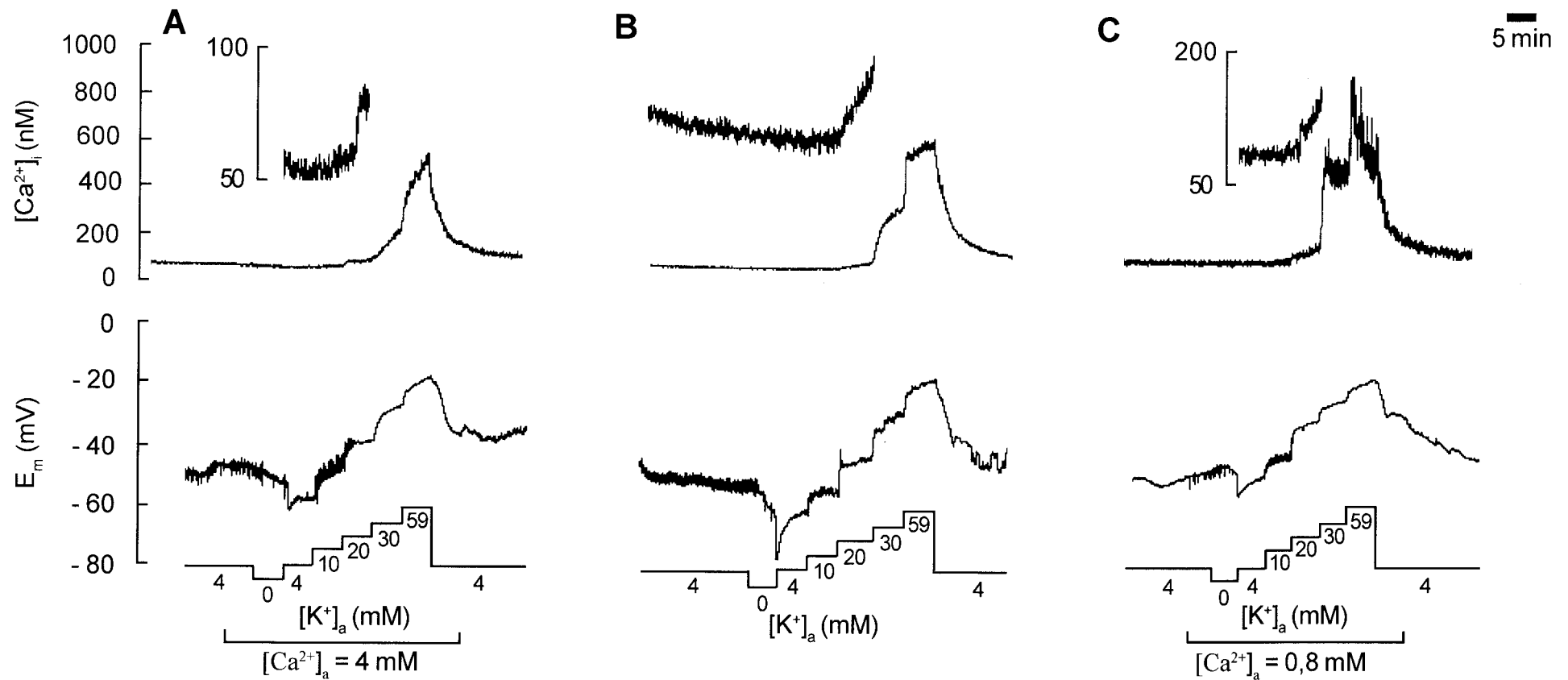


Abb. 29: Einfluss von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m bei Retzius-Neuronen: Beispielregistrierungen.

Bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 4 \text{ mM}$ war der K^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg insgesamt vermindert und bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ vergrößert (A, C, obere Spuren). Zudem waren bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ die durch hohe $[\text{K}^+]_a$ induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege meist transient (C, obere Spur). Die Schwelle des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs lag unter Kontrollbedingungen bei $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$ und wurde durch Veränderung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ nicht verschoben. Die Insets in den oberen Teilabbildungen zeigen die jeweilige Spur in vertikaler Spreizung, um die Schwelle des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs zu verdeutlichen.

Auf Ruhe- E_m und die K^+ -induzierte Membrandepolarisation hatte die Veränderung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wenig Einfluss (A - C, untere Spuren).

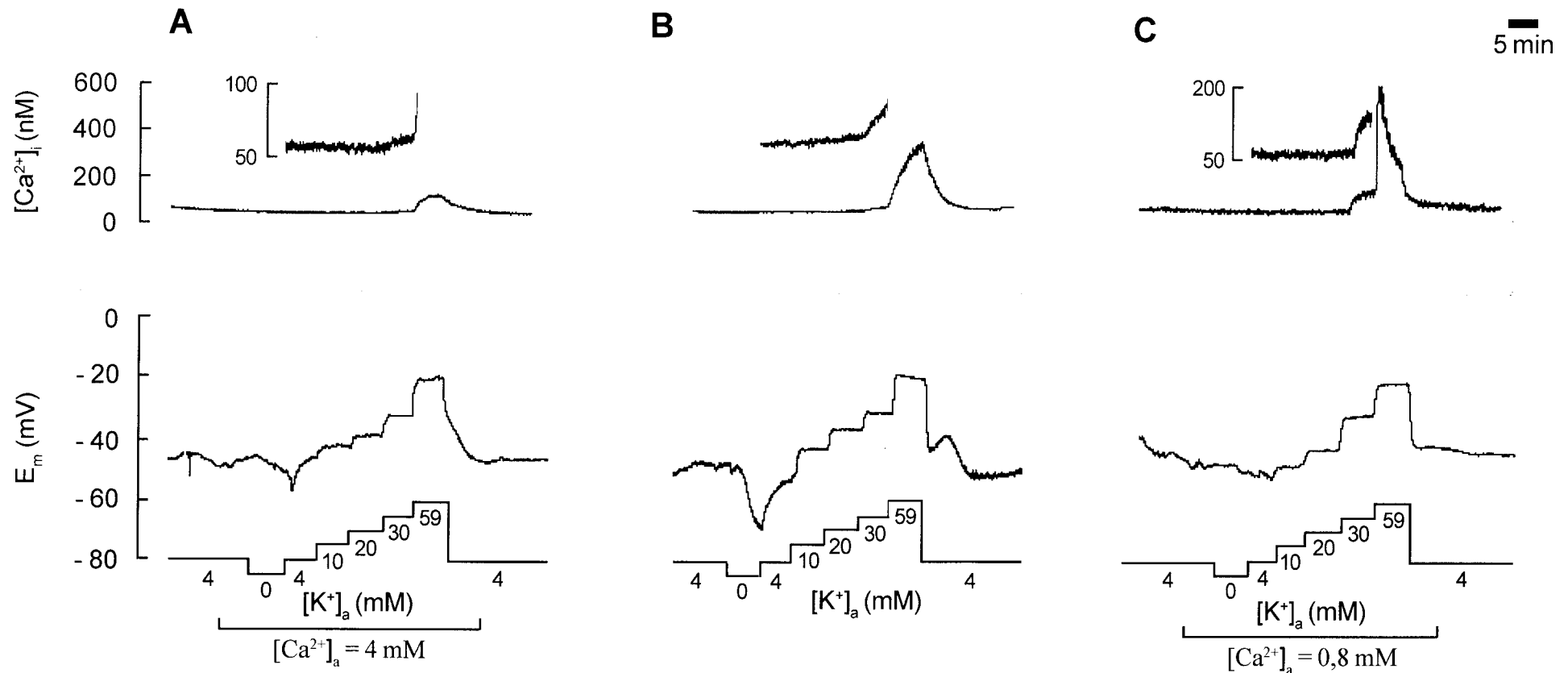


Abb. 30: Einfluss von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m bei P-Neuronen: Beispielregistrierungen.

Bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 4 \text{ mM}$ war der K^+ -induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg insgesamt vermindert und bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ vergrößert (A,C; obere Spuren). Unter $[\text{Ca}^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ (C, obere Spur), wie unter Kontrollbedingungen (B, obere Spur) lag die Schwelle des K^+ -induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs bei $[\text{K}^+]_a = 30 \text{ mM}$, bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 4 \text{ mM}$ bei $[\text{K}^+]_a = 59 \text{ mM}$ (A, obere Spur). Bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 0,8 \text{ mM}$ waren die durch $[\text{K}^+]_a = 59 \text{ mM}$ induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege meist transient (C, obere Spur). Die Insets in den oberen Teilabbildungen zeigen die jeweilige Spur in vertikaler Spreizung, um die Schwelle des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs zu verdeutlichen.

Auf das Ruhe- E_m und die K^+ -induzierte Membrandepolarisation hatte $[\text{Ca}^{2+}]_a$ keinen Einfluss (A - C, untere Spuren). Die Membranhyperpolarisationen in K^+ -freier Lösung waren jedoch verkleinert (A,C, untere Spuren).

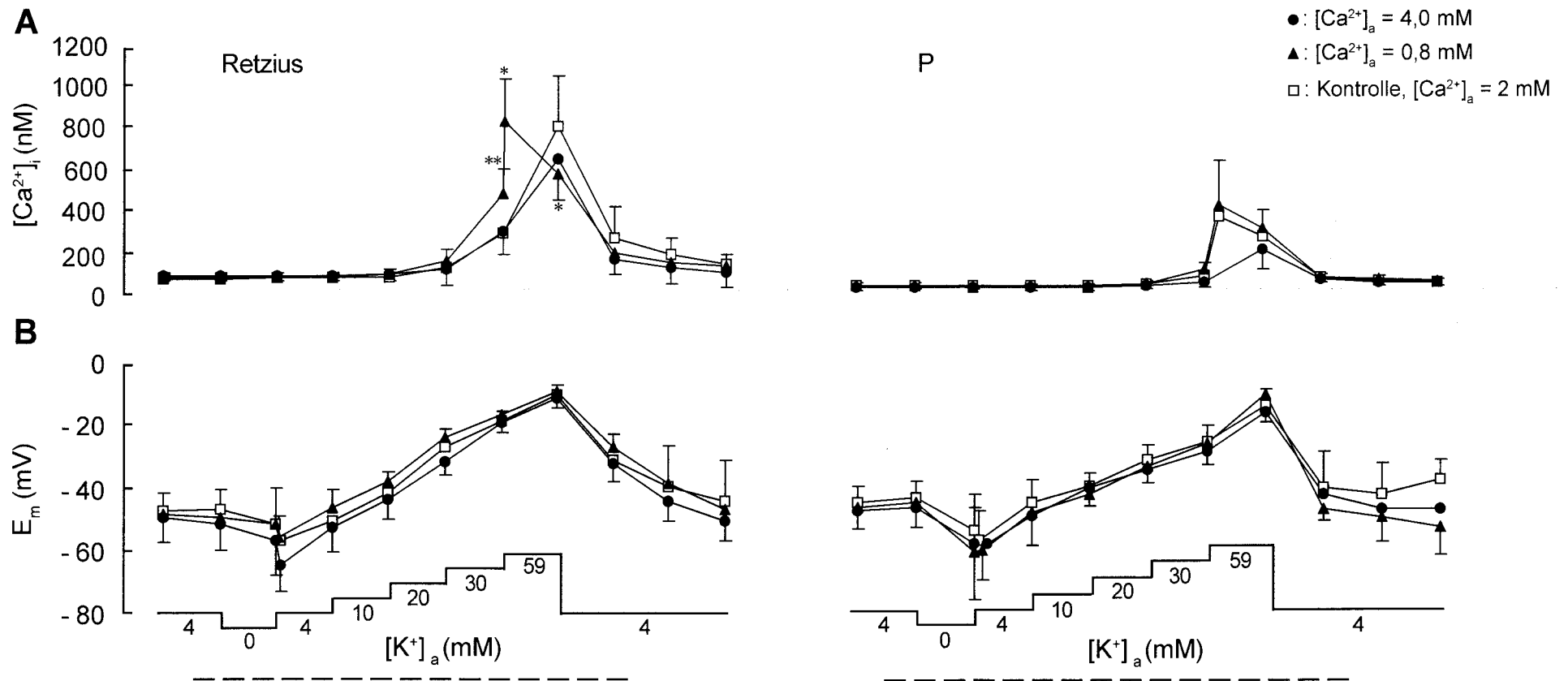


Abb. 31: Einfluss von $[Ca^{2+}]_a$ auf die K^+ -induzierten Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ (A) und E_m (B) bei Retzius- und P-Neuronen: Zusammenfassung der Daten.

Bei $[Ca^{2+}]_a = 4$ mM war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei beiden Neuronentypen insgesamt leicht vermindert. Bei P-Neuronen war zudem die Schwelle des K^+ -induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs auf $[K^+]_a = 59$ mM verschoben. Bei $[Ca^{2+}]_a = 0,8$ mM war der K^+ -induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Retzius-Neuronen bei $[K^+]_a = 20$ und 30 mM vergrößert. Bei Retzius-Neuronen waren die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei $[K^+]_a = 59$ mM stark transient, wodurch $[Ca^{2+}]_i$ am Ende der 5-minütigen Applikationsdauer signifikant kleiner war als in den Kontrollen (A). E_m und K^+ -induzierte Membrandepolarisationen wurden durch die Veränderung von $[Ca^{2+}]_a$ bei beiden Neuronentypen kaum beeinflusst.

Daten in A und B sind Mittelwerte $\pm$ S.D. aus $n = 5 - 11$ (Retzius) $5 - 18$ (P) Versuchen; Sterne kennzeichnen signifikante Abweichungen unter Kontrollbedingungen gewonnenen Daten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Bezüglich der Gewinnung der Datenpunkte siehe Abb. 13. Die durchbrochene Linie kennzeichnet den Zeitraum der Veränderung von $[Ca^{2+}]_a$.

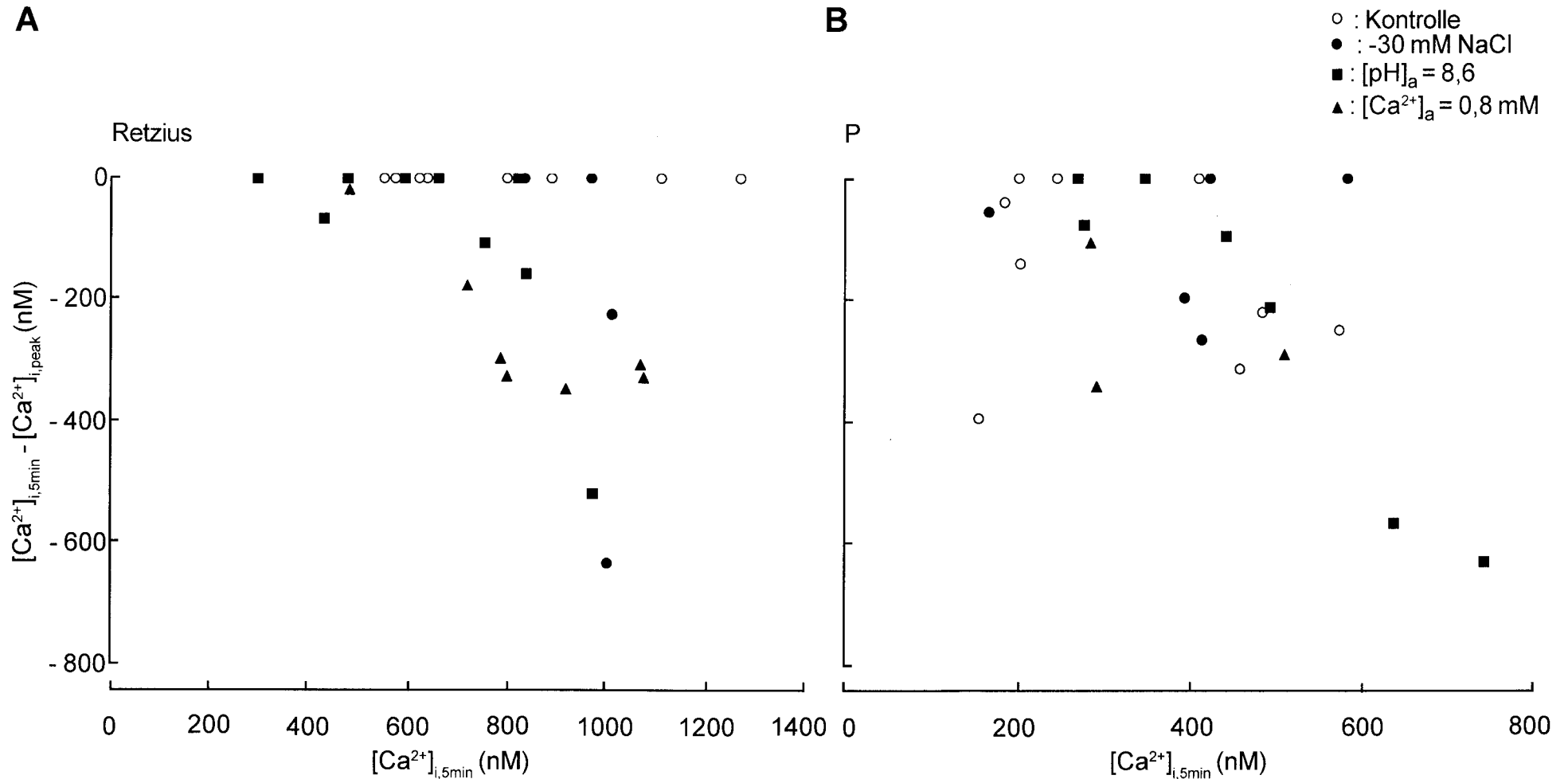


Abb. 32: Abhängigkeit des transienten Charakters von der Amplitude des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bei Retzius- (A) und P-Neuronen (B) unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden durch Erhöhung der $[K^+]_a$ von 30 auf 59 mM induziert.

Unter Kontrollbedingungen traten bei Retzius-Neuronen keine transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege auf, bei P-Neuronen dagegen häufig. Hypotone Bedingungen (-30 mM NaCl), extrazelluläre Alkalinisierung und Erniedrigung von $[Ca^{2+}]_a$ förderten bei Retzius-Neuronen das Auftreten transienten Verhaltens, hatten bei P-Neuronen jedoch nur wenig Effekt.

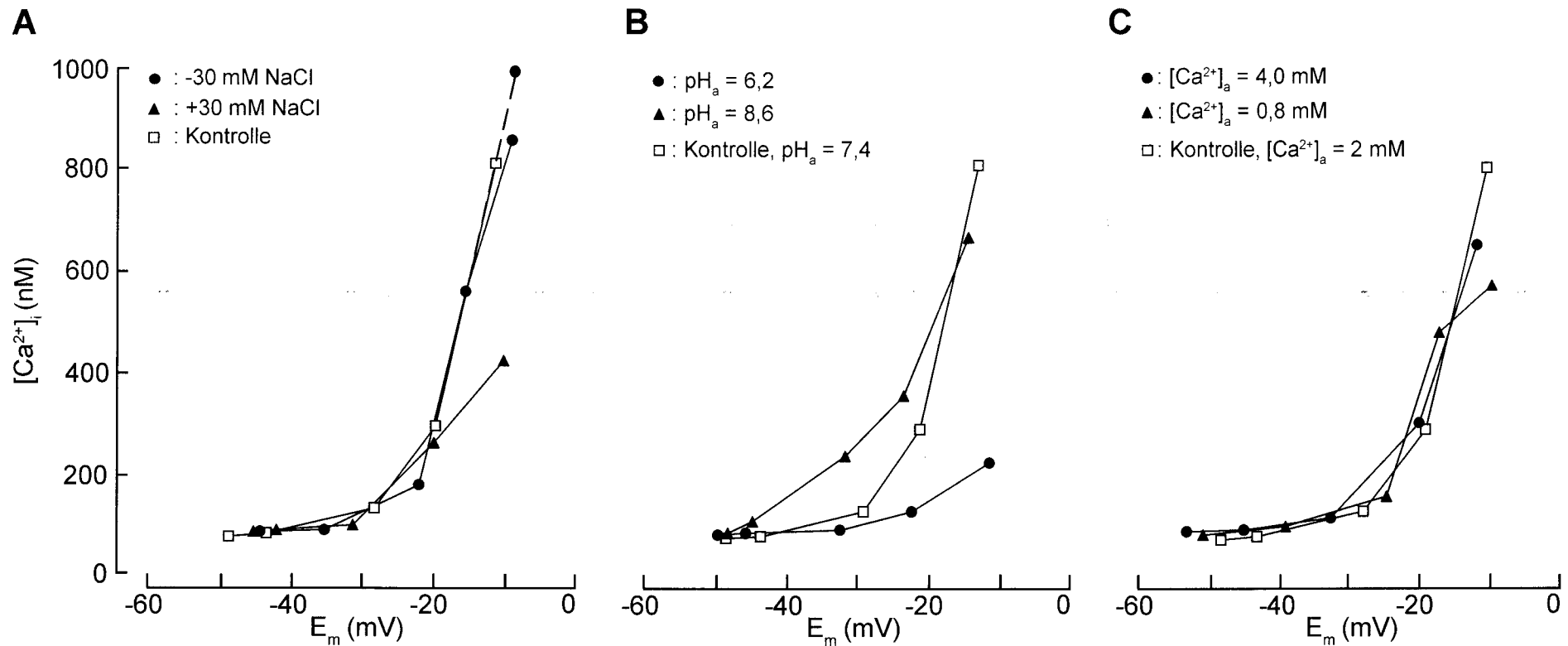


Abb. 33: Zusammenhang zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m bei Variation von Badosmolarität (A), pH_a (B) und $[\text{Ca}^{2+}]_a$ (C) bei Retzius-Neuronen.

A) Unter Kontrollbedingungen wie unter anisotonen Bedingungen lag das Schwellenpotential zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle zwischen -30 und -40 mV. Unter hypertonen Bedingungen war der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg bei gleicher Membrandepolarisation vermindert.

B) Bei $\text{pH}_a = 8,6$ lag das Schwellenpotential bei -45 mV und bei $\text{pH}_a = 6,2$ bei etwa -30 mV. Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg war bei $\text{pH}_a = 8,6$ meist vergrößert, bei $\text{pH}_a = 6,2$ durchweg vermindert.

C) Variation von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ im Bereich zwischen 0,8 und 4 mM hatten keinen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und E_m .

Den einzelnen Datenpunkten liegen Mittelwerte aus 5 - 12 E_m -Messungen und 6 - 12 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen zu Grunde. Die Standardabweichungen wurden der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet. Die durchbrochene Linie in A kennzeichnet das transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Maximum bei $[\text{K}^+]_a = 59 \text{ mM}$.

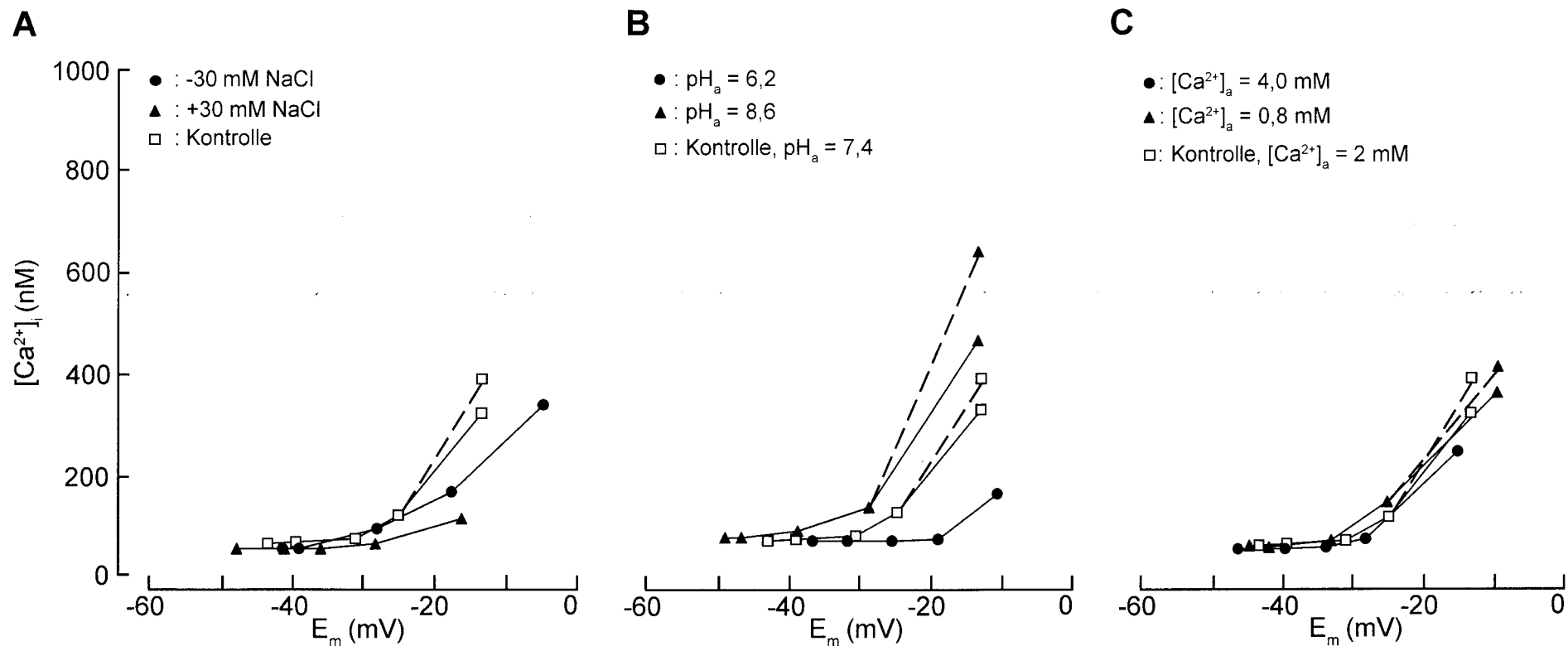


Abb. 34: Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und E_m bei Variation von Badosmolarität (A), pH_a (B) und $[Ca^{2+}]_a$ (C) bei P-Neuronen.

A) Unter Kontrollbedingungen wie unter anisotonen Bedingungen lag das Schwellenpotential zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle bei ca. -30 mV.

Unter hypertonen Bedingungen war der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei gleicher Membrandepolarisation vermindert.

B) Bei pH_a = 8,6 lag das Schwellenpotential bei -40 mV und bei pH_a = 6,2 bei etwa -20 mV. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg war bei pH_a = 8,6 meist vergrößert und bei pH_a = 6,2 durchweg vermindert.

C) Variation von $[Ca^{2+}]_a$ im Bereich zwischen 0,8 und 4 mM hatten keinen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und E_m .

Den einzelnen Datenpunkten liegen Mittelwerte aus 5 - 11 E_m-Messungen und 5 - 10 $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen zu Grunde. Die Standardabweichungen wurden der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet. Die durchbrochenen Linien in A-C kennzeichnen das transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Maximum bei $[K^+]_a$ = 59 mM.

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 18.06.2004

Verena Wende

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W.-R. Schlue danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine aufmerksame Betreuung. Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. K. Lunau für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Paul Dierkes danke ich für seine hilfreichen Anmerkungen und Ideen in allen Phasen dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. Hochstrate möchte ich für seine hilfreichen und kritischen Anmerkungen zu dieser Arbeit danken.

Dr. H.J. Wüsten, G. Klees, P. Coulon, H. Hagener, C. Reck und M. Schürmann danke ich für Anregungen während dieser Arbeit.

S. Durry, C. Roderigo, G. Abel und H. Trautewig danke ich für die Präparation sowie Pflege der Versuchstiere und für die Möglichkeit des reibungslosen Arbeitens.

Frau H. Horn danke ich für die Unterstützung in den fotografischen Arbeiten sowie für die vielen künstlerischen Anregungen.

Des weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders danken möchte ich:

Migu, Mirjam & Gerare, Ruth, Tanja, Hajo, Claudia, Ruth, Angelika, Karin, Markus, Manuela, Annette, Olli, Christina, Andy, Oliver, Anja, Krissi, Isa, und Franziska für ihre abwechslungs- und erlebnisreiche Begleitung sowie Freundschaft und Aufmunterungen.

Meinen Eltern für Unterstützung in wirklich jeder Lebenslage.