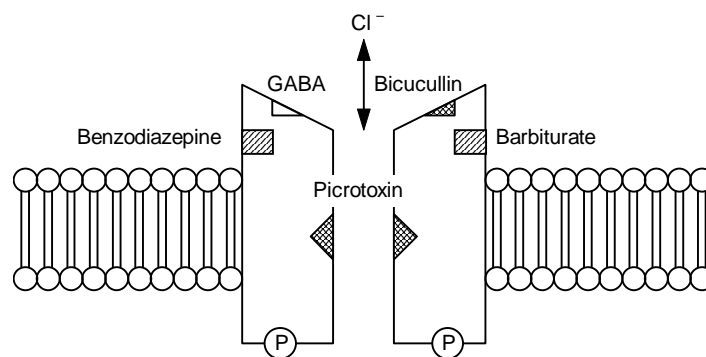


GABA- und Glycin-aktivierte Membranströme in kultivierten Nervenzellen des embryonalen Hühnchens



Diplomarbeit

der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

vorgelegt von

Andreas Bulling

April 1996

Titelblatt: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptor-Komplexes mit seinen verschiedenen Bindungs- und Modulationsstellen.

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1995 bis März 1996 am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen in Reutlingen (NMI) unter Anleitung von Herrn Dr. K.J. Föhr und Herrn Prof. Dr. W. Finger angefertigt.

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Pfullingen,

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Eigenschaften des GABA _A -Rezeptors	4
1.2 Das Tectum opticum des embryonalen Hühnchens	6
1.3 Zielsetzung	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Anlegen von Primärkulturen aus dem Tectum opticum	8
2.2 Meßtechnische Voraussetzungen	10
2.2.1 Patch-clamp-Messungen in der Whole-cell-Konfiguration	11
2.2.2 Vorbereitung und Ablauf der Messungen	14
2.2.3 Perfusionssystem für Testsubstanzen	15
2.4 Datenauswertung	17
2.4.1 Dosis-Wirkungs-Kurven	17
2.4.2 Hemmstoffe	18
3 Ergebnisse	20
3.1 Kulturen des Tectum opticum	20
3.2 Elektrophysiologische Grundparameter	22
3.3 Transmitterinduzierte Membranströme	27
3.4 GABA-induzierte Membranströme	28
3.4.1 Experimentelle Rahmenbedingungen	28
3.4.2 Umkehrpotential	31
3.4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung	33
3.4.4 Wirkung von Antagonisten	35
3.4.5 Modulatorische Wirkungen von Ethanol, Pentobarbital und PMA	38
3.5 Glycininduzierte Ströme	43
3.6 Kainatinduzierte postsynaptische Ströme	48
4. Diskussion	54
4.1 Elektrophysiologische Grundparameter	54
4.2 GABA- und glycininduzierte Membranströme	55
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	62

Abkürzungen

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
ATP	Adenosintriphosphat
EC	extrazellulär-
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEPES	N-2-Hydroxypiperazin-N'-Ethansulfonsäure
HBSS	Hanks's balanced salt solution
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
sPSS	spontane postsynaptische Ströme
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Die integrativen Leistungen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind das Ergebnis eines komplexen wechselseitigen Gefüges von erregenden und hemmenden Prozessen. Die grundlegenden und höheren ZNS-Funktionen können nur korrekt ablaufen, wenn dieses aufeinander abgestimmte Gleichgewicht nicht gestört wird. Beim Menschen äußern sich Fehlfunktionen z.B. in Krankheiten wie Parkinson, Schizophrenie, Schlaganfall, Chorea Huntington oder Epilepsie. In vielen Fällen liegt ihre Ursache in kleinen Störungen der Einzelelemente des ZNS, die jedoch in der Summe gravierende Auswirkungen haben können. Dies betrifft vor allem die Ruhe- und Aktivitätseigenschaften der Nervenzellen, die den Informationsaustausch zwischen ihnen beeinflussen. Aber auch die Funktion der Gliazellen muß gewährleistet sein, da sie z.B. maßgeblich an der Erhaltung des extrazellulären Milieus beteiligt sind. Inwieweit Gliazellen an der Informationsverarbeitung im Nervensystem beteiligt sind, ist unbekannt.

Während die Weiterleitung von Information (in Form der Aktionspotentialfrequenz) vor allem von den elektrischen Eigenschaften der betreffenden Nervenzelle und der ionalen Zusammensetzung des Extrazellulärmediums bestimmt wird, kann die Informationsübertragung zwischen den Zellen durch eine große Zahl von Substanzen direkt moduliert werden. Die Flexibilität wird an Kontaktstellen zwischen den Zellen (Synapsen) erreicht, die mit Hilfe chemischer Überträgerstoffe (Transmitter) und dafür spezialisierten Rezeptoren eine Schnittstelle zwischen elektrischer und chemischer Informationsvermittlung bilden. Die dabei ablaufenden Prozesse können z.B. das direkte Öffnen von Ionenkanälen oder die Auslösung intrazellulärer chemischer Signalketten (second-messenger-Systeme) sein. Mögliche Wirkstoffe beeinflussen die Funktion der Rezeptoren und ihre Interaktion mit Transmittern auf vielfältige Weise. Für das Verständnis der ZNS-Funktionen und ihrer Störungen ist also eine genaue Kenntnis der Vorgänge auf Rezeptorebene notwendig.

Die beiden wichtigsten Transmitter, denen eine hemmende Funktion im ZNS zugeordnet wird, sind die Aminosäuren γ -Amino-Buttersäure (GABA) und Glycin. Fast alle Zellen des ZNS der Vertebraten besitzen Rezeptoren für GABA (Kaila, 1994). Bei Säugetieren sind je nach Gehirnregion 20-50% der Synapsen GABAerg (Young & Chu, 1990). GABA-Rezeptoren (Fraser, et al., 1995; Biedermann et al., 1996), eventuell auch Glycinrezeptoren (Pastor et al., 1995) kommen jedoch ebenfalls bei Gliazellen vor. Höhere Vertebraten besitzen Glycinrezeptoren vorwiegend in posterioren Bereichen der Neurachse (Hirnstamm, Rückenmark), während GABA auf den Gehirnbereich konzentriert ist (Betz & Becker, 1988).

Pharmakologisch lassen sich drei Typen von GABA-Rezeptoren unterscheiden; sie werden mit GABA_A, GABA_B und GABA_C bezeichnet (Johnston, 1986). GABA_A-, GABA_C- und

Glycinrezeptoren führen über die direkte Öffnung von Ionenkanälen zu einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Chloridionen, sind also ionotrop. Dadurch wird das Membranpotential stärker vom Gleichgewichtspotential für Chlorid bestimmt, was sich in einer verminderten Erregbarkeit bzw. in einer Hyperpolarisation der Zelle äußert. Für GABA_B-Rezeptoren wurden ionotrope und metabotrope Mechanismen gefunden (Bormann, 1988). Ihre Aktivierung kann zu einer Erhöhung der Kalium- oder zu einer Verminderung der Calciumleitfähigkeit führen. Durch eine GABA_B-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) hat GABA die Möglichkeit, einen Einfluß auf intrazelluläre Prozesse zu nehmen. Umgekehrt wurde eine Modulation der GABA- und glycininduzierten Membranströme durch Substanzen gefunden, die vermutlich den Phosphorylierungszustand der Rezeptoren regulieren (Feigenspan & Bormann, 1994; Schönrock & Bormann, 1995; Song & Huang, 1990).

Die Unterscheidung der verschiedenen Rezeptortypen kann pharmakologisch mit Hilfe einer selektiven Aktivierung durch rezeptorspezifische Agonisten oder einer Blockierung durch spezifische Antagonisten vorgenommen werden. Strychnin gilt als spezifischer Hemmer der glycininduzierten Membranströme (Young & Snyder, 1973; Choi & Fischbach, 1981). Bicucullin hemmt selektiv die Funktion der GABA_A-Rezeptoren, was sie von GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren abgrenzt (Bormann, 1988). Letztere können unterschieden werden durch die selektive GABA_B-Aktivierung mit Hilfe von Baclofen (Feigenspan et al., 1993; Bormann & Feigenspan, 1995), neben der Tatsache, daß GABA_B-Rezeptoren keine Chloridströme vermitteln.

In den letzten Jahren sind viele molekularbiologische Arbeiten zur Strukturaufklärung von Membranrezeptoren durchgeführt worden. Es hat sich gezeigt, daß die Komplexe der GABA_A-, Glycin- und nikotinischen Acetylcholinrezeptoren zu einer gemeinsamen Familie von ligandenaktivierten Ionenkanälen gehören (Sieghart, 1995; Smith & Olsen, 1995). Sie besitzen homologe Aminosäuresequenzen, die auf ähnliche Strukturen und Funktionen hinweisen. Dazu zählt der Aufbau aus fünf Untereinheiten, die jeweils vier Transmembranregionen beinhalten. Je eine dieser Regionen ist am Aufbau der Ionenkanalpore beteiligt (MacDonald & Olsen, 1994). Bei der Klonierung des GABA-Rezeptors wurden fünf verschiedene Untereinheiten gefunden, die sich in mindestens 15 Subtypen aufgliedern: 6 α , 3 β , 3 γ , 1 δ und 2 ρ . Zusammen mit der Möglichkeit des alternativen Splicens ergibt sich daraus eine große strukturelle Vielfalt, die eine ebenso große funktionelle Vielfalt nach sich ziehen dürfte. Von den tausenden theoretischen Kombinationsmöglichkeiten sind im ZNS vermutlich nur wenige realisiert (Sieghart, 1995). Durch künstliche Expression (z.B. in *Xenopus*-Oocyten) wurden verschiedene Kombinationen von Untereinheiten untersucht, um

Ähnlichkeiten mit natürlichen Kanälen herauszufinden (Verdoorn et al., 1990). Demnach dürften natürliche GABA_A-Rezeptoren aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit bestehen (alternativ: 2 α , 1 β , 2 γ). Kanäle mit ρ -Untereinheiten ähneln in ihren Eigenschaften den GABA_C-Rezeptoren. Weitere Rekombinations- und Mutationsexperimente geben Hinweise auf die für die pharmakologischen Eigenschaften wichtigen Aminosäuresequenzen (Zaman et al., 1992; Korpi et al., 1993; Gurley et al., 1995). Tab. 1 zeigt die Verteilung der wichtigsten GABA_A-Rezeptor Subtypen im Gehirn der Ratte (nach McKernan & Whiting, 1996).

Tab. 1: Verteilung der wichtigsten GABA_A-Rezeptor Subtypen im Rattengehirn.

Subtyp	Häufigkeit	Vorkommen
$\alpha 1\beta 2\gamma 2$	43 %	meiste Areale; Interneurone im Hippocampus, Cortex und cerebrale Purkinjezellen
$\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$	18 %	Motoneurone im Rückenmark; Pyramidenzellen im Hippocampus
$\alpha 3\beta n\gamma 2/\gamma 3$	17 %	cholinerge / monoaminerge Neurone (Regulation des ACh- und Monoaminumsatz)
$\alpha 2\beta n\gamma 1$	8 %	Bergmann-Glia; Kerne des limbischen Systems; Pankreas
$\alpha 5\beta 3\gamma 2/\gamma 3$	4 %	Pyramidenzellen im Hippocampus
$\alpha 6\beta \gamma 2$	2 %	Körnerzellen im Cerebellum
$\alpha 6\beta \delta$	2 %	Körnerzellen im Cerebellum
$\alpha 4\beta \delta$	3 %	Thalamus; Gyrus dentatus des Hippocampus
andere	3 %	gesamtes Gehirn

Neben der Transmitterfunktion scheint GABA bzw. der GABA_A-Rezeptor auch bei der Stimulierung oder Hemmung des Neuritenwachstums eine Rolle zu spielen (Michler, 1990). In neonatalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte wurden große GABA-induzierte Depolarisationen gefunden, die vermutlich durch einen veränderten Chloridgradienten zustande kommen (Cherubini et al., 1991). Möglicherweise haben sie eine Funktion bei der Genese inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen, wenn während der frühen Entwicklung noch keine erregenden Einflüsse vorhanden sind, um die klassische Synapsenverstärkung durch Depolarisationen zu induzieren (Hebb-Mechanismus). Weiterhin stellt GABA offenbar eine Verbindung zwischen dem endokrinen und neuronalen System dar: Einerseits sind verschiedene endokrine Zellen GABAerg innerviert (Kaila, 1994), andererseits gibt es Steroidhormone, die auf die GABAerge Transmission modulierend einwirken (Twyman & MacDonald, 1992).

auch erklären, warum bei Bindungsstudien oft eine um mindestens eine Größenordnung höhere GABA-Affinität gefunden wird, als bei funktionellen Experimenten (Silvilotti & Nistri, 1991).

Bicucullin und Picrotoxin hemmen die durch GABA induzierten Effekte. Während Bicucullin einen kompetitiven Wirkungsmechanismus zeigt, ist Picrotoxin ein nichtkompetitiver Blocker, der vermutlich die Pore des Ionenkanals „verstopft“. Dies ergibt sich aus Experimenten, die zeigen, daß für das Eintreten und für das Abklingen der blockierenden Wirkung GABA oder GABA_A-Agonisten notwendig sind (MacDonald & Olsen, 1994; Inoue & Akaike, 1988). Picrotoxin ist eine Mischung von Picrotin und der eigentlich aktiven Komponente Picrotoxinin (Yoon et al., 1993).

Benzodiazepine wie Diazepam oder Flunitrazepam führen zu einer Verstärkung des GABA-induzierten Membranstroms. Dies wird durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle erreicht; Öffnungsdauer und Leitfähigkeit bleiben unverändert (Study & Barker, 1981; MacDonald & Olsen, 1994). Es existiert eine Bindungsstelle für Benzodiazepine, die von jener für GABA verschieden ist. Eine Eigenwirkung dieser Substanzen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die alleinige Applikation von Barbituraten in höheren Konzentrationen (> 50 µM) führt dagegen zu einer direkten Öffnung von GABA_A-Rezeptor-Kanälen. Dies tritt u.a. auch bei einigen Steroiden auf; die Eigenwirkung dieser Substanzen kann durch Bicucullin gehemmt werden. In geringeren Konzentrationen führen Barbiturate zu einer Verstärkung des GABA-Stroms, die durch eine Verlängerung der mittleren Kanalöffnungsdauer verursacht wird (Study & Barker, 1981; MacDonald & Olsen, 1994).

Die Wirkung von Ethanol auf das Nervensystem ist vielfältig. Möglicherweise gibt es eine unspezifische Wirkung, die sich z.B. in der Beeinflussung der Membranfluidität äußert (Suzdak et al., 1986). In neuerer Zeit wird jedoch davon ausgegangen, daß Ethanol eher direkt mit verschiedenen Membranrezeptoren interagiert (Wafford & Whiting, 1992). Der Effekt auf GABA_A-Rezeptoren ist nicht eindeutig. Einige Autoren finden eine Potenzierung des GABA-induzierten Chlorideinstroms (Suzdak et al., 1986; Reynolds et al., 1992), die eventuell vom Phosphorylierungszustand abhängig ist (Wafford & Whiting, 1992). In anderen Fällen gab es eine solche Potenzierung nicht (Ticku, 1990).

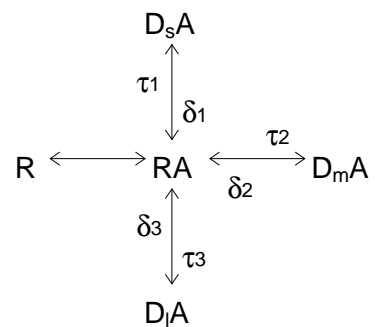
Ein Überblick über weitere Substanzen, die mit dem GABA_A-Rezeptor-Komplex interagieren, findet sich in (Sieghart, 1995).

Bei einer andauernden Applikation von GABA nimmt der induzierte Membranstrom beständig ab (Oh & Dichter, 1992). Dies wird als Stromdesensitivierung bezeichnet und

kann zwei Gründe haben: Eine intrazelluläre Akkumulation von Chloridionen (Segal & Barker, 1984), oder eine echte Rezeptordesensitivierung, bei der sich die Leitfähigkeit des Rezeptors verringert (Numann & Wong, 1984). Sie sollte deutlich von dem *phänomenologischen* Begriff „Stromdesensitivierung“ getrennt werden.

Bei Experimenten, in denen nur eine Zeitkonstante der Stromdesensitivierung (τ_D) gefunden wurde, verringerte sich diese mit zunehmender GABA-Konzentration und negativerem Haltepotential (Oh & Dichter, 1992; Mierlak & Farb, 1988). Es gibt jedoch mindestens 2 Phasen der Desensitivierung, wie durch die Verwendung von schnellen Techniken der Substanzapplikation festgestellt werden konnte (Cash & Subbarao, 1987; Celentano & Wong, 1994). Dies weist auf mehrere Desensitivierungszustände des GABA_A-Rezeptors hin, die sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ausbilden. In diesem Fall waren die τ_D -Werte von der GABA-Konzentration unabhängig. Ein kinetisches Modell für diese multiplen Desensitivierungszustände könnte folgendermaßen aussehen:

Dabei bedeuten R = Rezeptor, A = Agonist, D_s, D_m, D_l = desensitiverter Rezeptor der schnellen, mittleren und langsamen Komponente. Mit τ sind die Zeitkonstanten des Übergangs in den desensitiveren Zustand bezeichnet, mit δ die Zeitkonstanten des umgekehrten Prozesses.



Neben einer kurzfristigen, reversiblen Reduktion der Stromamplitude gibt es auch eine längerfristige, irreversible Abnahme der GABA-Ströme („run-down“). Sie wird mit der Phosphorylierung der GABA_A-Rezeptoren (vgl. Abb. 1) in Verbindung gebracht (Stelzer et al., 1988). Ströme, die durch eine hohe GABA-Konzentration induziert wurden und eine ausgeprägte Desensitivierung aufwiesen, zeigten bei wiederholter Applikation im Verlauf von einigen Minuten eine deutliche Reduktion ihrer Amplitude. Bei geringer GABA-Konzentration konnte weder ein solcher „run-down“ noch eine Desensitivierung festgestellt werden (Gyenes et al., 1988).

1.2 Das Tectum opticum des embryonalen Hühnchens

Das Hühnchen ist ein klassisches Modellsystem der Embryologie. Aufgrund der hervorstechenden Struktur des Tectum opticum war dieses schon seit dem 19. Jahrhundert Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, so daß über seine morphologischen Eigenschaften bereits einiges bekannt ist. Dagegen gibt nur wenige elektrophysiologische Untersuchungen am Tectum opticum.

Die Entwicklung des Tectum kann in drei sich überlappende Phasen eingeteilt werden: Zellproliferation, Migration und endgültige Differenzierung (Mey & Thanos, 1992). Zwischen

dem 6. und 12. Entwicklungstag (E6-E12) bildet sich die Schichtung des Tectum durch Zellmigration vom Neuroepithel zur pialen Oberfläche aus.

Die retinotectale Projektion der Nervenfasern entwickelt sich hauptsächlich zwischen E18 und P0; erste synaptische Verbindungen im Tectum entstehen bereits am Tag E14. Da das Tectum die Hauptstelle der optischen Verarbeitung bei Vögeln darstellt, wird hier eine topologisch organisierte Karte des Gesichtsfeldes angelegt.

Die tectalen Neurone lassen sich in drei Hauptklassen einteilen: Multipolare oder Ganglienzellen, piriforme Zellen (radial strukturiert) und horizontal orientierte Zellen. Diese Typen kommen in den unterschiedlichen horizontalen Schichten mit verschiedener Häufigkeit vor.

1.3 Zielsetzung

Durch ihre große Verbreitung und variable Funktion spielen GABA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Regulation und Modulation der ZNS-Aktivität. Die Beeinflussbarkeit durch eine Vielzahl von Substanzen eröffnet Wege, Fehlfunktionen von externer Seite her zu korrigieren. Die intensive Erforschung dieses Transmittersystems seit drei Jahrzehnten hat viele Erkenntnisse auf diesem Gebiet erbracht.

Über die strukturelle Entwicklung des optischen Systems beim Hühnchen ist durch embryologische Untersuchungen viel bekannt geworden. Es sind bisher jedoch nur wenige elektrophysiologische Messungen am Tectum opticum, der zentralen visuellen Verarbeitungsstation bei Vögeln, durchgeführt worden. In einer vorausgehenden Arbeit am NMI wurde das erregende Transmittersystem am Beispiel des NMDA-Rezeptors untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, Rezeptoren für die hemmenden Transmitter GABA und Glycin im Tectum opticum embryonaler Hühnchen nachzuweisen und gegebenenfalls ihre Eigenschaften mit elektrophysiologischen Methoden zu charakterisieren. Aufgrund der großen strukturellen Kombinationsmöglichkeiten für GABA-Rezeptoren durfte eine entsprechende Variabilität beim Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Modellsystemen erwartet werden. Um die Ziele zu erreichen, mußten Verfahren etabliert werden, die eine computergestützte Auswertung der pharmakologischen Meßdaten erlaubten.

2. Material und Methoden

Zur Durchführung dieser Arbeit wurde regelmäßig eine Primärkultur von Nervenzellen aus dem Tectum opticum des embryonalen Hühnchens angelegt. Die Zellen verschiedener Altersstadien wurden mit Hilfe der Patch-clamp-Technik in der Whole-cell-Konfiguration untersucht. Dabei wurden zunächst grundlegende elektrophysiologische Eigenschaften bestimmt und dann das GABAerge Rezeptorsystem näher charakterisiert. Die Unterscheidung von Glia- und Nervenzellen wurde anhand elektrophysiologischer Parameter vorgenommen, eine spezielle zellbiologische Methode wurde dafür nicht verwendet.

2.1 Anlegen von Primärkulturen aus dem Tectum opticum

Zur Kultivierung der Zellen aus dem Tectum opticum wurden Techniken verwendet, die eine Kultivierungsdauer bis zu vier Wochen erlaubten (Schirm, 1993; Schlosshauer & Dütting, 1991).

Material

Geräte:

Zentrifuge	Hettich: Universal 2S, Tuttlingen
Zellzähler Casy I	Schärfe System, Reutlingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Eierbrutschrank	Ehret, Emmendingen

Chemikalien:

DNase	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
Fötale Kälberserum	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
Medium F12	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
Glutamin	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
HBSS-Puffer	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
Hühnerserum	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
Laminin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin (10.000 U / 100 µg / ml)	Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1
Poly-D-Lysin (1 mg / ml)	Boehringer Mannheim

Sonstiges:

Bruteier Hisex	Weiss, Kirchberg / Iller
Deckgläser Ø 12 mm	Greiner, Nürtingen

Petrischalen Ø 60 mm

Greiner, Nürtingen

Kulturmedium:

Medium F12

+10 % Fötale Kälberserum

+2 % Hühnerserum

+2 mM Glutamin

+Penicillin (100U) / Streptomycin (100 µg / ml)

Vorbereitung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf Deckgläsern (Ø 12 mm), was für die späteren Versuche eine einfache und flexible Handhabung erlaubte. Um eine Anheftung der Zellen zu ermöglichen, mußten die Deckgläser folgendermaßen vorbereitet werden:

Reinigung

Die Deckgläser wurden kurz in Aceton getaucht, abgeflammt und dreimal durch die Flamme gezogen, um ihre Oberfläche zu entfetten und zu reinigen. Je 5 Deckgläser wurden zusammen in eine Petrischale (Ø 12 mm) gebracht.

Poly-D-Lysin- / Laminin-Beschichtung

Die Deckgläser wurden mit je 50 µl Poly-D-Lysin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) überdeckt und eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde durch gleichzeitiges Spülen und Absaugen mit ca. 1 ml Aqua bidest gewaschen und eine Stunde luftgetrocknet.

Danach wurden die Deckgläser mit je 50 µl Laminin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bedeckt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Präparation

Die befruchteten Eier wurden von der Firma Weiss bezogen und bei 8 °C gelagert. Die Bebrütung erfolgte in einem Eierbrutschrank der Firma Ehret (Emmendingen) bei 37 °C, wobei die Eier automatisch 8 mal pro Tag gewendet wurden. Zum Anlegen einer Primärkultur wurden Eier nach dem 7. und 8. Brutttag verwendet.

Vorbereitung des Embryos

Zur Präparation wurde das Ei mit dem stumpfen Ende nach oben in einen Eierbecher gestellt und mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Schale wurde mit einer Pinzette geöffnet und der Embryo in HBSS-Puffer überführt. Daraufhin wurden Kopf- und Rumpfteil getrennt. Das Tectum opticum war normalerweise deutlich als Wölbung hinter dem Vorderhirn zu erkennen und konnte mit einer Pinzette leicht abgetrennt werden. Anschließend mußten die

Hirnhäute (unter dem Binokular) entfernt werden.

Zellvereinzelung

Das gesamte Tectum wurde zur enzymatischen Andauung in 2 ml Trypsin ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) aufgenommen und zunächst 15 min bei Raumtemperatur, anschließend 15 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Tectum dreimal mit kaltem HBSS-Puffer gewaschen. Das in seiner Form immer noch erhaltene Tectum wurde nach dem Absetzen in 2 ml Kulturmedium und $100 \text{ }\mu\text{l}$ DNase ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) aufgenommen und 5 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufsaugen in eine Pipettenspitze mechanisch vereinzelt.

Zählung / Aussaat

Von dieser Zellsuspension wurden $1,5 \text{ ml}$ auf $8,5 \text{ ml}$ Kulturmedium überschichtet und 3 min bei $1200 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden automatisch gezählt (Fa. Schärfe System / Casy I) und mit einer Dichte von 100.000 bis 150.000 Zellen pro Deckglas (113 mm^2) in $50 \text{ }\mu\text{l}$ Kulturmedium ausgesät. Nach drei Stunden im Brutschrank wurden die Petrischalen mit 6 ml Kulturmedium geflutet.

Kultivierung

Je sechs Petrischalen einer Präparation wurden im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ } \%$ CO_2 und $96 \text{ } \%$ relativer Luftfeuchtigkeit bis zu 28 Tage kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Kulturmedium zu $50 \text{ } \%$ ausgetauscht.

2.2 Meßtechnische Voraussetzungen

Die Patch-clamp-Technik ermöglicht es, bei kleinen Zellen ($\varnothing < 20 \text{ }\mu\text{m}$) Ionenströme durch ihre Membranen zu messen. Mit einer konventionellen Ableittechnik würden solche Zellen bei einer Penetration stark verletzt werden, und das Signal / Rausch-Verhältnis wäre aufgrund der zur Penetration notwendigen hochohmigen Elektrode stark eingeschränkt.

Inzwischen gibt es eine ganze Anzahl von Ableitkonfigurationen, die sich von der Patch-clamp-Technik herleiten (Penner, 1995). Die Voraussetzung für sämtliche Konfigurationen ist, daß zwischen der auf die Zelle aufgesetzten Glaspipette und der Zellmembran ein im Gigaohm-Bereich liegender Abdichtwiderstand („G Ω -Seal“) zustande kommt. Die dazu notwendige Technik wurde Anfang der 80er Jahre beschrieben (Hamill et al., 1981).

2.2.1 Patch-clamp-Messungen in der Whole-cell-Konfiguration

Spannungsklemme

In der Whole-cell-Konfiguration wird das durch die Glaspipette eingegrenzte Membranareal zerstört und so der elektrische Kontakt zum Zellinneren hergestellt.

Zur Messung der Membranströme muß die Membranspannung der Zelle auf einen definierten Wert, das Haltepotential, festgelegt werden. Der zur Einhaltung dieser Spannung notwendige Kompensationsstrom wird von der Meßapparatur geliefert (Spannungsklemme, „voltage-clamp“). Er gibt invers die Summe der Ströme durch sämtliche geöffneten Ionenkanäle in der Zellmembran wieder und wird als eigentlicher Meßstrom verstärkt und weiterverarbeitet (Abb. 2).

Membranströme können z.B. durch eine Änderung des Haltepotentials ausgelöst werden, wobei sich spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen. Eine andere Möglichkeit ist die Applikation von Substanzen, die an spezifische Rezeptoren der Zellmembran binden und dabei einen Strom durch ligandengesteuerte Kanäle induzieren. Die Qualität einer Spannungsklemme hängt stark von der Form der untersuchten Zelle ab. Besitzt sie weit verzweigte Ausläufer, kann das Haltepotential nicht an allen Membranarealen gleich gut eingehalten werden.

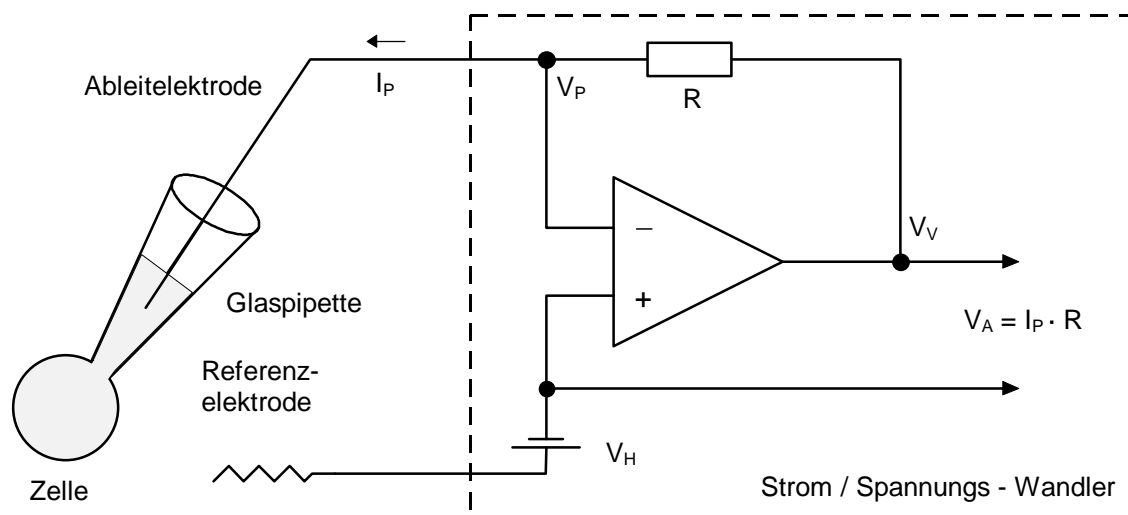


Abb. 2: Vereinfachtes Ersatzschaltbild einer Spannungsklemme. Fließt über die Zelle (und die Pipette) ein Strom I_P , so tritt eine Differenz zwischen dem Haltepotential V_H und dem Pipettenpotential V_P auf, die an den Eingängen des Verstärkers anliegt. Dadurch wird das Potential V_V am Verstärkerausgang geregelt, der Verstärker fungiert als spannungsgesteuerte Spannungsquelle. V_V fällt über den Meßwiderstand R auf V_P ab, um I_P nachzuliefern. Aus der Differenzspannung $V_A = V_V - V_H$ läßt sich dann indirekt der Pipettenstrom I_P berechnen.

Elektrische Parameter

Bei der Durchführung von Patch-clamp-Experimenten müssen einige elektrische Parameter beachtet werden (Abb. 3). Der Abdichtwiderstand R_{Seal} sollte mehrere $G\Omega$ betragen. Der Zugriffswiderstand zur Zelle R_{Ser} muß möglichst klein sein, um einen geringen Abfall des Signals an dieser Stelle zu gewährleisten. R_{Ser} beträgt ca. das Doppelte des Pipettenwiderstands in freier Badlösung.

Um Membranströme bei einer schnellen Änderung des Membranpotentials messen zu können, müssen die hierbei auftretenden kapazitiven Ströme, die den Verstärker in die Sättigung treiben würden, kompensiert werden. Die wichtigsten Quellen solcher Ströme sind die Pipettenkapazität C_{Pip} und die Membrankapazität c_m . Der Abgleich der Größen R_{Ser} , C_{Pip} und c_m kann direkt am EPC-7 Verstärker vorgenommen werden.

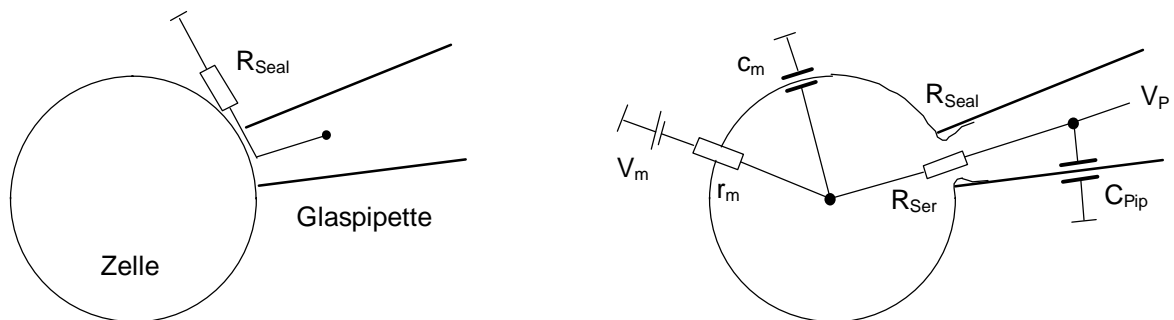


Abb. 3: Elektrische Parameter, die bei Patch-clamp-Messungen in der Whole-cell-Konfiguration beachtet werden müssen: (Seal-) Abdichtwiderstand R_{Seal} , (Serien-) Zugriffswiderstand R_{Ser} , (Membran-) Eingangswiderstand r_m , Membranpotential V_m , Pipettenpotential V_p , Membrankapazität c_m und Pipettenkapazität C_{Pip} .

Fehlerpotentiale

An der Grenze zwischen Lösungen unterschiedlicher Ionenzusammensetzung tritt ein „liquid-junction“-Potential auf (Barry, 1994; Ng & Barry, 1995). Da die intrazelluläre Lösung in einer Patch-Pipette normalerweise von der Badlösung verschieden ist, führt dies ebenfalls zu einem solchen Fehlerpotential. Bei der Korrektur muß berücksichtigt werden, daß es nur bei der Annäherung an eine Zelle auftritt und nach der Bildung eines Seals, und damit auch in der Whole-cell-Konfiguration, wegfällt. Das Potential konnte für die verwendeten Standardlösungen näherungsweise berechnet werden und betrug ca. +4 mV. Ein mögliches Donnan-Potential im Verlauf einer Ableitung wurde nicht korrigiert.

Material

Geräte:

Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen
Verstärker EPC-7	List, Darmstadt
Oszilloskop 1602	Gould, Seligenstadt
Analogfilter	npi, Tamm
Mikromanipulatoren	Luigs & Neumann, Ratingen
Piezoelement	Luigs & Neumann, Ratingen
Überdruckpumpen	Lorenz, Göttingen
Doppelkolbenpumpe	Adams & List Assoc., New York
Patch-clamp-Steuerung TIDA 5.74	Battelle, Frankfurt
DMZ Universal Puller	Zeitz, Augsburg
Glaskapillaren GC150-10	Science Products, Frankfurt
Monitor PVM 122 CE	Sony, München
7-Kanal-Perfusionsnadel	NMI, Reutlingen
Magnetventile	Sirai, Italien

Chemikalien:

Bicucullin ((-)-Bicucullin Methchlorid)	RBI (Biotrend, Köln)
Dimethyldichlorosilan	Sigma, Deisenhofen
GABA (γ -Amino-Buttersäure)	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Kainat	Sigma, Deisenhofen
Methylenchlorid	Sigma, Deisenhofen
Mg-ATP	Sigma, Deisenhofen
Pentobarbital	Sigma, Deisenhofen
Picrotoxin	RBI (Biotrend, Köln)
Strychnin Hydrochlorid	RBI (Biotrend, Köln)

Datenaufnahme und -verarbeitung:

Tida für Windows 2.63	Battelle, Frankfurt
Sigmaplot 2.0	Jandel Corp.
Excel 5.0	Microsoft Corp.
DataCheck	Eigene Programmierung mit:
Borland Pascal 7.0	Borland International, Inc.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen (Konzentrationen in mM·l⁻¹; pH 7,4):

Standardbadpuffer

140 NaCl, 10 Glucose, 3 KCl, 1 CaCl₂, 10 HEPES

Badpuffer mit reduziertem Chloridgehalt

30 NaCl, 110 Na-Propionat, 3 KCl, 1 CaCl₂, 10 HEPES

Standardpipettenlösung

140 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂

Pipettenlösung bei Messung des Chlorid-Umkehrpotentials

100 CsCl, 20 TEA-Cl, 10 HEPES, 5 MgCl₂, 0,5 EGTA

2.2.2 Vorbereitung und Ablauf der Messungen

Badkammer

Für die Experimente wurde jeweils ein Deckglas mit unterschiedlich lange kultivierten Tectumneuronen in eine Badkammer aus Plexiglas (Ø 35 mm) überführt. Frische Badlösung wurde permanent mit einer Rate von 2 ml · min⁻¹ zugeführt; mit Hilfe einer Überlaufabsaugung wurde das Badvolumen bei ca. 1,8 ml gehalten. Daraus ergibt sich für das Auswaschen einer Substanz eine Halbwertszeit von mindestens 45 s. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ableitelektroden

Zur Herstellung der Pipetten wurden filamentfreie Kapillaren aus Borosilikatglas (Ø außen / innen = 1,5 / 1,05 mm) auf einem DMZ- Universalpuller in einem dreistufigen Prozeß ausgezogen. Die Befüllung der Spitze mit intrazellulärer Lösung erfolgte zunächst von vorne durch Anlegen eines Unterdrucks, dann von hinten über einen Microloader. Anschließend wurde die Pipettenspitze in Dimethyldichlorosilan getaucht (2 % in Methylenchlorid), um die Bildung eines Gigaseals zu erleichtern.

Über einen Silberdraht, der bei 1 - 1,5 V in einer 1 M KCl-Lösung chloriert wurde, wurde die Elektrolytlösung in den Pipetten mit den nachfolgenden Wandler- und Verstärkerschaltkreisen verbunden. Als Referenzelektrode diente ein direkt in den Badpuffer eingetauchter chlorierter Silberdraht. Bei den Messungen wird der in den Lösungen durch Chloridionen getragene Strom in einen Elektronenstrom umgewandelt, gemäß der Gleichung: $\text{Cl}^- + \text{Ag} \longleftrightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$.

Die Osmolarität der intra- und extrazellulären Lösungen wurde mit einem Osmometer kontrolliert (310 mosm), um ein Anschwellen oder Schrumpfen der Zellen verhindern zu können.

Herstellung der Whole-cell-Konfiguration

Die Pipette wurde über einen Teflonhalter direkt am Vorverstärker befestigt, der auf einem piezoelektrischen Mikromanipulator montiert war. Um eine Verunreinigung der Pipettenspitze zu vermeiden, wurde vor dem Eintauchen in die Badlösung ein Überdruck von ca. 7 cm H₂O angelegt. Sie wurde durch Grobtriebe manuell in die Nähe der Zelle gebracht und anschließend piezoelektrisch an die Zelloberfläche herangeführt (beide Manipulatoren 3-achsig). Der Pipettenwiderstand betrug in freier Badlösung 1 bis 3 MΩ. Kurz vor dem Aufsetzen auf die Membran erhöhte sich der Pipettenwiderstand um 20-50 %, dies wurde durch fortlaufend an der Pipette angelegte negative Rechteckspannungen von 2 mV Amplitude sichtbar gemacht und am Oszilloskop mitverfolgt. Hierauf wurde der Überdruck langsam durch einen Saugdruck von 5 bis 10 cm H₂O ersetzt, was in über 90 % der Fälle zu einem Abdichtwiderstand $R_{\text{Seal}} > 5 \text{ G}\Omega$ führte. Nach Erreichen dieser als „cell-attached“ bezeichneten Konfiguration wurde zunächst ein Haltepotential von -70 mV eingestellt und dann durch wiederholte starke Saugstöße das unter der Pipettenspitze liegende Membranareal zerstört.

Meßdatenaufnahme

Die Meßdaten wurden durch einen Analog / Digital-Wandler mit einer Auflösung von 16 Bit (4096 Punkte im Meßbereich) digitalisiert und vom gleichen Computer aufgezeichnet, der auch die Steuerung der Substanzzugabe übernahm. Die Digitalisierungsrate betrug bei den Messungen der ligandenaktivierten Whole-cell-Ströme 400 Hz. Bei den depolarisierenden Spannungssprüngen zur Identifizierung der Nervenzellen und bei den Messungen des Membranpotentials betrug sie 20 kHz.

Bei sämtlichen Messungen wurde zwischen Verstärker und dem Analog / Digital-Wandler des aufnehmenden Computers ein Analogfilter (8-Pol Bessel, Abfall 48 dB / Oktave) geschaltet.

2.2.3 Perfusionssystem für Testsubstanzen

Die Testsubstanzen wurden über eine am NMI entwickelte computergesteuerte 7-Kanal-Perfusionsnadel (Stahl, 1995) an die jeweils zu messende Zelle herangeführt (Abb. 4). Sie wurde mit Hilfe von Mikromanipulatoren in einem Abstand von ca. 100 µm vor der untersuchten Zelle positioniert. Eine Absaugnadel zur schnellen Entfernung der Testsubstanzen befand sich 200-300 µm hinter der Zelle. Zwischen diesem Zu- und Ablauf bildete sich ein eng umgrenzter Fließkegel, dessen Ausdehnung durch den Zusatz von Farbstoffen kontrolliert werden konnte. Dies wurde jedoch nur zu Beginn der Untersuchungen gemacht, da die räumliche Konfiguration des Zu- und Ablaufs bei jedem

Experiment gleich eingestellt wurde und damit auch der Fließkegel praktisch immer die gleiche Form hatte. Durch diese Anordnung konnte eine weiträumige Kontamination der Badkammer mit Testlösungen verhindert und eine Zellcharge über einen längeren Zeitraum verwendet werden.

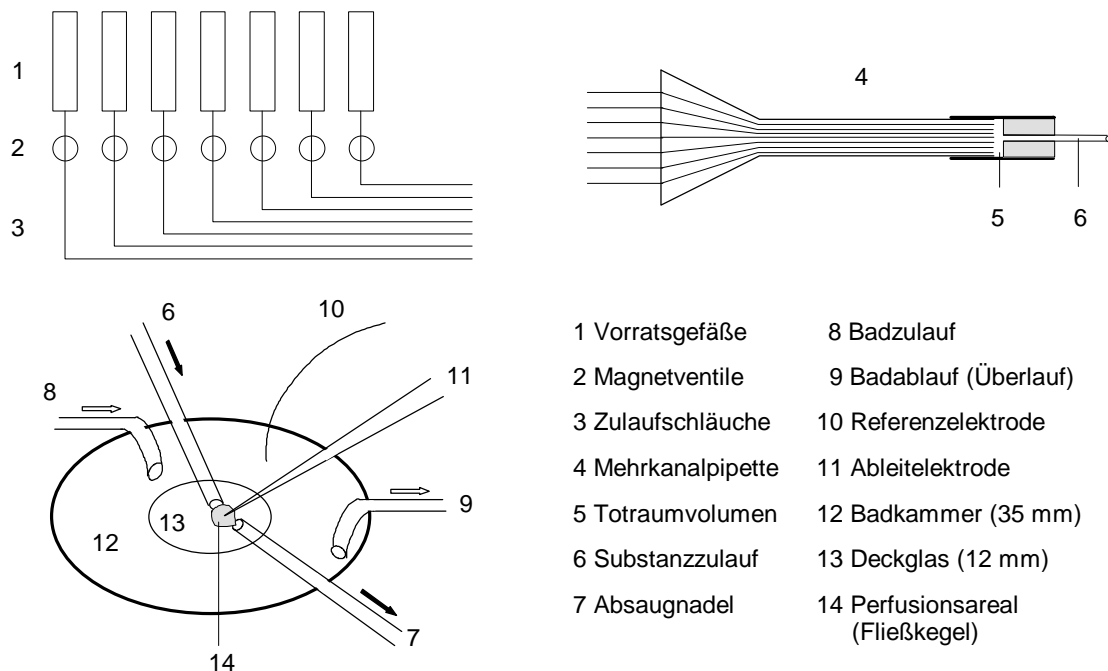


Abb. 4: Schema der Meßkonfiguration und des Perfusionsystems für Testsubstanzen.

Die Substanztauschzeiten dieses Systems wurden über Änderungen des „liquid-junction“-Potentials bei variabler Ionenzusammensetzung der Perfusionslösung getestet und lagen bei 1-5 ms. Die „optimierte Perfusion“ (Stahl, 1995) mit Austauschzeiten unter 1 ms wurde nicht eingesetzt, da einerseits ein zusätzlicher Kanal für die Absaugung benötigt worden wäre und andererseits die konventionell erreichte Anflutungsgeschwindigkeit für die geplanten Messungen ausreichend war. Dies konnte durch einen Vergleich der Zellmembranströme gezeigt werden, die von unterschiedlichen Substanzen ausgelöst wurden. Als Vergleichskriterium dienten vor allem die unter Standardbedingungen durch AMPA und Kainat induzierten Ströme.

Die Substanzzugabe erfolgte zunächst über Schwerkraft und wurde durch Magnetventile gesteuert. Diese konnten über ein Reizprogramm innerhalb des Meßdatenaufnahmeprogramms zu genau definierten Zeiten betätigt werden. Später war es möglich, auf die Vorratsgefäße der Substanzen einen Druck von bis zu 100 cm H₂O zu geben, um ein konstantes Anfluten zu gewährleisten.

2.4 Datenauswertung

2.4.1 Dosis-Wirkungs-Kurven

Die Abhängigkeit der Amplitude des Membranstroms von der Agonisten- (z.B. GABA, Glycin) bzw. Antagonistenkonzentration wurde mit Hilfe von Dosis-Wirkungs-Kurven untersucht. Hierzu werden bei unterschiedlichen Konzentrationen die Amplituden der induzierten Ströme bestimmt und die Werte durch eine logistische Funktion der folgenden Form angenähert:

$$I = I_{\text{Max}} \cdot \frac{[A]^n}{EC_{50}^n + [A]^n} \quad (1)$$

I_{Max} bezeichnet den maximal induzierbaren Strom, $[A]$ die verwendete Agonisten- bzw. Antagonistenkonzentration und n den Hillkoeffizienten als Maß der Kurvensteigung. EC_{50} ist bei einer Agonisten-Dosis-Wirkungs-Kurve die Konzentration, bei der 50 % des maximalen Stromes erreicht wird (Abb. 5). Um die Messungen von Zellen mit verschiedenen absoluten Amplituden vergleichen zu können, werden die Ströme I und I_{Max} auf den bei einer sättigenden Konzentration gemessenen maximalen Strom normiert (bei GABA $\geq 200 \mu\text{M}$, bei Glycin $\geq 400 \mu\text{M}$). Zur Bestimmung der gesuchten Parameter I_{Max} , EC_{50} und n stand das Programm SigmaPlot zur Verfügung. Bei der Dosis-Wirkungs-Kurve eines Antagonisten, die auch als Hemmkurve bezeichnet und bei einer konstanten Agonistenkonzentration gemessen wird, kann entsprechend dem Parameter EC_{50} in Gl. (1) ein IC_{50} -Wert ermittelt werden. Die Steigung n der Kurve ist in diesem Fall negativ.

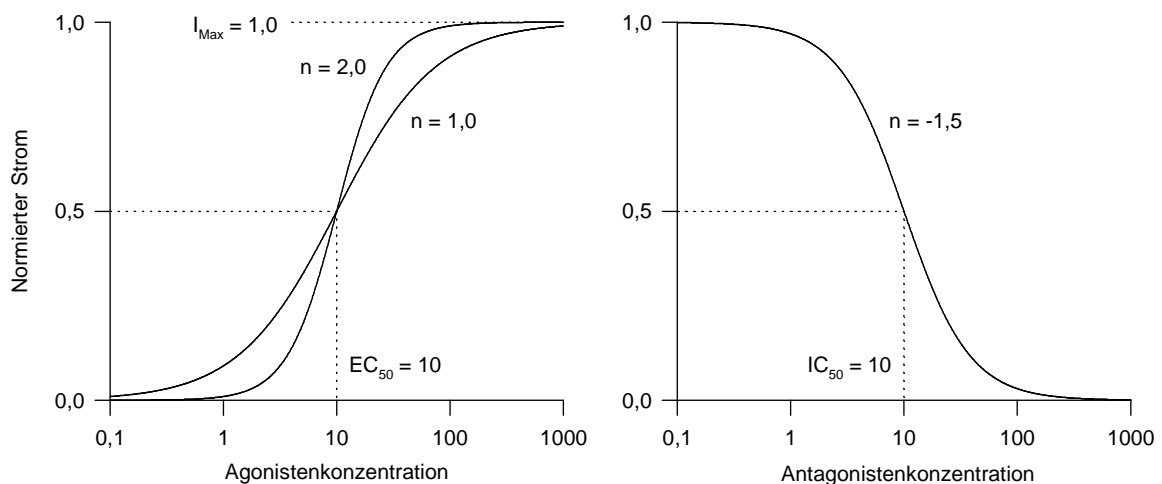


Abb. 5: Veranschaulichung der verschiedenen Parameter von Dosis-Wirkungs-Kurven: obere Asymptote I_{Max} , Steigung n , halbmaximal effektive Konzentrationen EC_{50} bzw. IC_{50} . Die Hemmkurve bezieht sich auf einen Strom, der durch eine konstante Agonistenkonzentration hervorgerufen wird.

Verschiedene Agonisten bzw. Antagonisten binden an einen Rezeptor mit unterschiedlicher Affinität; ein Maß dafür sind die Affinitätskonstanten K_d bzw. K_i . Bei einer Agonistenkonzentration von K_d bzw. einer Antagonistenkonzentration von K_i ist die Hälfte der Rezeptoren durch die betreffende Substanz gebunden. Wenn dabei auch die halbmaximale Reaktion der Zelle beobachtet werden kann, ist der K_d -Wert (K_i) mit dem EC_{50} -Wert (IC_{50}) identisch, was nicht immer der Fall sein muß.

Können jedoch K_d und EC_{50} gleichgesetzt werden, ergibt sich K_d sofort aus der Bestimmung einer einfachen Agonisten-Dosis-Wirkungs-Kurve. K_i kann nicht auf eine ähnliche Weise direkt aus dem IC_{50} -Wert bestimmt werden, da die Antagonistenwirkung nur in Zusammenhang mit dem Agonisten untersucht werden kann. Der IC_{50} -Wert ist - im Gegensatz zu K_i - von der verwendeten Agonistenkonzentration abhängig.

2.4.2 Hemmstoffe

Die umfassendste Methode zur Untersuchung einer Antagonistenwirkung stellt die Schild-Analyse dar. Dabei werden mehrere Dosis-Wirkungs-Kurven des Agonisten bei unterschiedlichen Antagonistenkonzentrationen $[B]$ bestimmt. Die EC_{50} -Werte der nach rechts verschobenen Kurven werden auf den EC_{50} -Wert der Agonisten-Dosis-Wirkungs-Kurve ohne Antagonisteneinfluß bezogen; dieser Verhältniswert wird als *dose ratio* (DR) bezeichnet (Abb. 6).

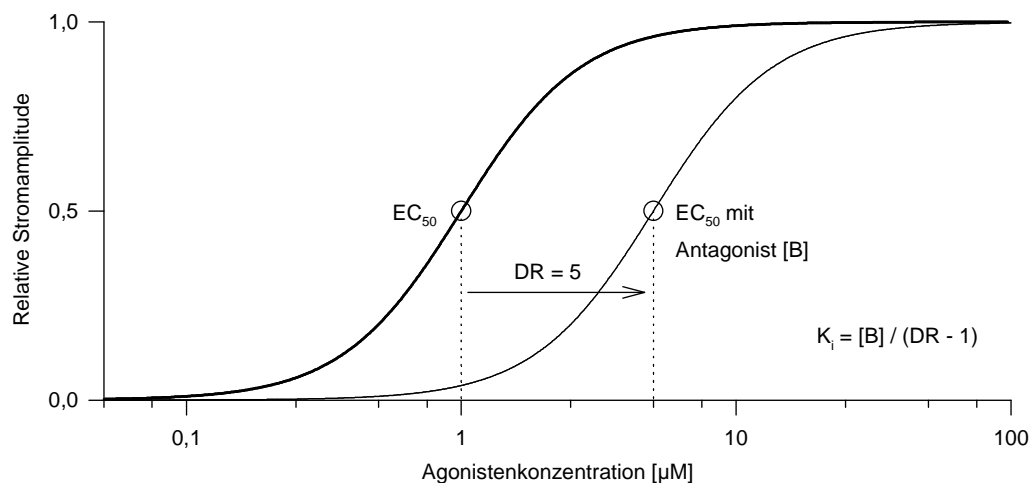


Abb. 6: Der Wert der „dose-ratio“ (DR) wird bestimmt, indem der EC_{50} -Wert der Dosis-Wirkungs-Kurve mit dem Antagonisten (normale Linie) durch den EC_{50} -Wert der unbeeinflussten Dosis-Wirkungs-Kurve (fette Linie) geteilt wird. Die Affinitätskonstante K_i kann aus der Antagonistenkonzentration $[B]$ und dem DR-Wert berechnet werden.

Der K_i -Wert ist jene Konzentration, bei der eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve um $DR = 2$ nach rechts stattfindet, d.h., der EC_{50} -Wert steigt auf das Doppelte. Dies kommt auch in der Gaddum-Schild-Gleichung zum Ausdruck:

$$K_i = \frac{[B]}{DR - 1}. \quad (2)$$

Eine Darstellung der DR-Werte in Abhängigkeit der Antagonistenkonzentration $[B]$ (Schild-Plot) erlaubt sowohl eine Aussage über den Wirkungsmechanismus (kompetitiv / nicht-kompetitiv) als auch die Bestimmung von K_i , was nur bei kompetitiven Antagonisten sinnvoll ist.

Eine andere Untersuchungsmöglichkeit besteht darin, die Dosis-Wirkungs-Kurve des Antagonisten (Hemmkurve, Abb. 5) bei einer festgelegten Agonistenkonzentration zu bestimmen. Dabei werden die Amplituden bei einer gleichzeitigen Applikation des Agonisten / Antagonisten auf ein Kontrollexperiment ohne Antagonisten bezogen. Diese Methode findet in solchen Fällen Anwendung, in denen aus technischen oder zeitlichen Gründen, oder z.B. durch begrenzte Verfügbarkeit der Substanzen, der verhältnismäßig hohe meßtechnische Aufwand der Schild-Analyse nicht betrieben werden kann.

Dennoch kann in Fällen, in denen ein kompetitiver Mechanismus vorausgesetzt werden darf, aus solchen Experimenten der K_i -Wert ermittelt werden. Dazu wurde bisher häufig eine Formel der Form

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[A]}{K_d}\right)} \quad (3)$$

verwendet, die ursprünglich für Enzymbindungsstudien entwickelt wurde (Cheng & Prusoff, 1973). Hier bezeichnet $[A]$ die bei der Hemmkurve konstant gehaltene Agonistenkonzentration. In jüngerer Zeit wurde gezeigt, daß bei funktionellen Experimenten K_d durch EC_{50} zu ersetzen ist (Craig, 1993) und weiterhin der K_i -Wert auch von der Steigung der Agonisten-Dosis-Wirkungs-Kurve, also vom Hillkoeffizienten abhängt. Es ergibt sich aus diesen Überlegungen (Leff & Dougall, 1993):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(2 + \left(\frac{[A]}{EC_{50}}\right)^n\right)^{\frac{1}{n}} - 1}. \quad (4)$$

Diese modifizierte Cheng-Prusoff-Formel wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Neben ihr gibt es noch weitere Methoden zur Analyse von Hemmkurven (Lazareno & Birdsall, 1993).

3. Ergebnisse

3.1 Kulturen des Tectum opticum

Das Tectum opticum des embryonalen Hühnchens lässt sich vergleichsweise einfach und mit geringem Zeitaufwand präparieren. Es ist in den frühen Entwicklungsphasen neben Augen- und Schnabelanlagen eine herausragende, leicht zugängliche Struktur (Abb. 7).

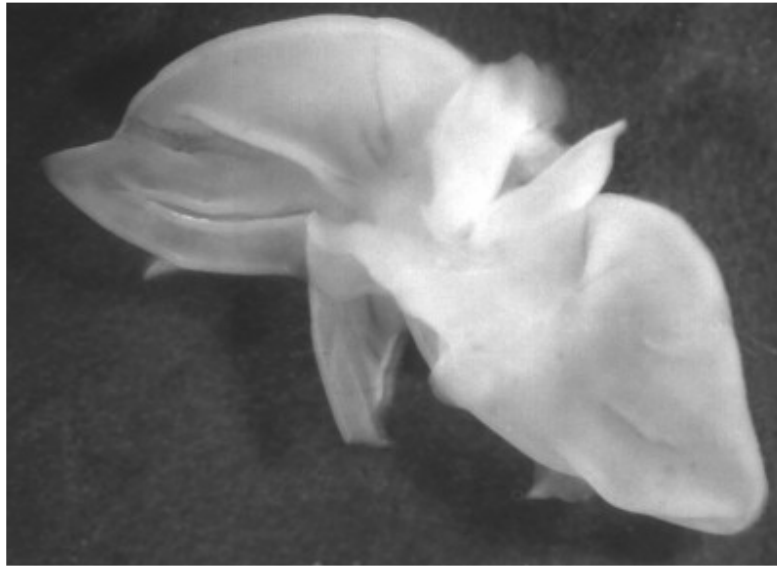


Abb. 7: Präpariertes Tectum opticum eines embryonalen Hühnchens (E7) nach Entfernung der Hirnhäute (Vergr. 10-fach).

Für die Untersuchungen wurden Embryonen vom 7. und 8. Entwicklungstag (E7, E8) präpariert. In diesem Stadium ist einerseits die eine Kultivierung erschwerende Zelldifferenzierung noch nicht weit fortgeschritten, andererseits sind die Zellteilungen weitgehend abgeschlossen. Die Präparationen ergaben durchschnittlich $12 \cdot 10^6$ Zellen mit einem mittleren Durchmesser von $9,0 \mu\text{m}$ (Abb. 8).

Beim Anlegen und bei der Weiterführung der Zellkulturen konnte auf bereits früher gewonnene Erkenntnisse zurückgegriffen werden (Schirm, 1993). Dies betraf vor allem die Punkte Deckglasbeschichtung, Zellvereinzelnung und Aussaatdichte. Dadurch ergab sich eine gleichbleibende Qualität der Kulturen, was ein kontinuierliches Arbeiten ermöglichte. Pro Woche erfolgte eine Präparation; da die Zellen für ca. 4 Wochen kultiviert wurden, waren somit immer vier unterschiedliche Entwicklungsstufen verfügbar.

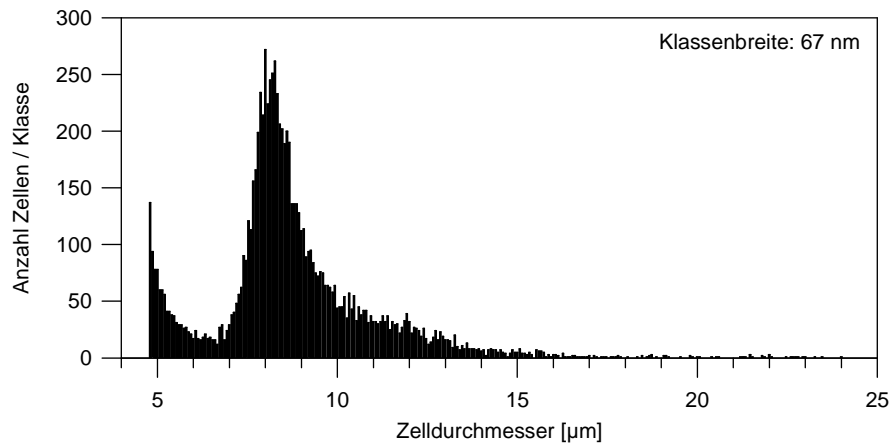


Abb. 8: Beispiel des Ergebnisses einer automatischen Zellzählung nach der Präparation eines Tectum opticum (E8). Die Verteilung der Zellgröße hat hier bei ca 8 µm ein Maximum.

Für die späteren Messungen war es notwendig, daß die Zellen sich nicht in Klumpen ansammelten, sondern vereinzelt waren, und daß sie gut am Untergrund anhafteten. Innerhalb der ersten drei Kultivierungstage erfüllten sie zwar den ersten Punkt, aber sie hafteten noch ungenügend. Dies erschwerte die Perfusion der Zellen mit Testsubstanzen, da sie mit einem verringerten Druck erfolgen mußte. Teilweise wurde das Problem dadurch vermindert, daß die Zellen durch ihre Verzweigungen mechanisch miteinander verbunden waren (Abb. 9).

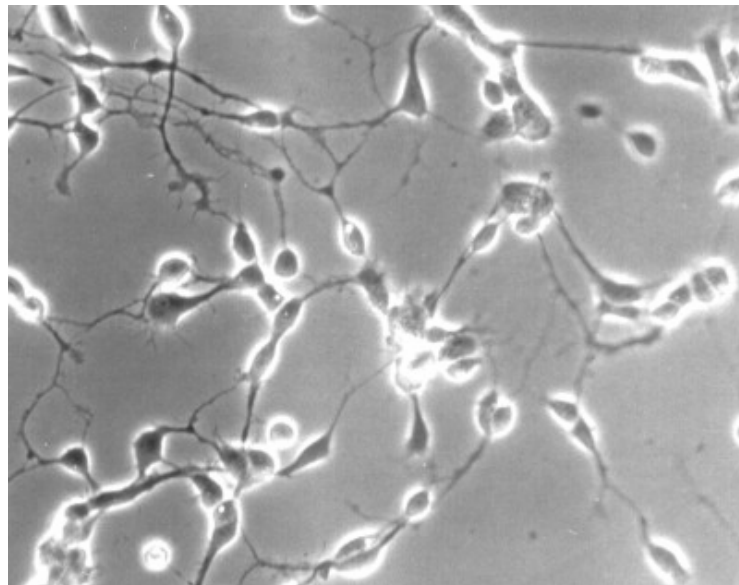


Abb. 9: Dissoziierte Zellen des Tectum opticum bilden bereits nach 2 Kultivierungstagen eine Vielzahl von Ausläufern aus (Vergr. 666-fach).

Nach ca. 6 Tagen in Kultur nahm der Anteil der Gliazellen stark zu, gleichzeitig ging die Zahl der Neurone zurück. Ein Teil der Neurone bildete dann größere klumpenförmige Ansammlungen, mit vielfältigen Fortsätzen untereinander und zu den übrigen isolierten Neuronen. Die Gliazellen bildeten in diesem Stadium einen dichten Rasen, auf dem diese Neurone sehr gut hafteten (Abb. 10). Ein Nachteil war hierbei jedoch, daß sich dieser Rasen gelegentlich vom Rand des Deckglases her ablöste.

Die für die Untersuchungen verwendeten Neurone konnten in drei morphologische Klassen unterteilt werden: Zellen mit zwei gegenüberliegenden Ausläufern (typisch bipolar), deutlich dreieckig geformte mit drei Ausläufern, sowie unregelmäßig geformte Zellen mit drei und mehr Ausläufern.

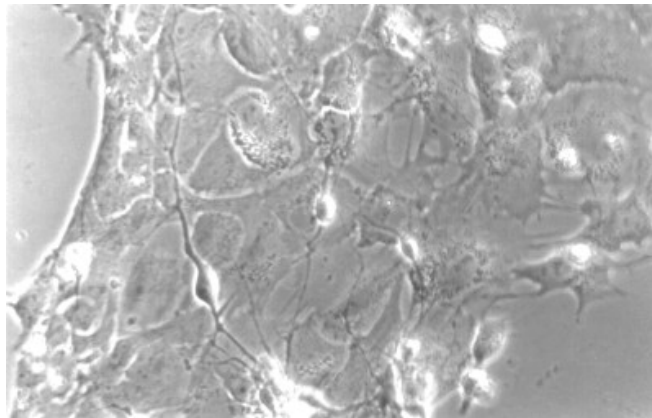


Abb. 10: Dissoziierte Zellen des Tectum opticum nach 14 Kultivierungstagen (Vergr. 666-fach). Deutlich zu erkennen ist der Rasen aus Gliazellen.

3.2 Elektrophysiologische Grundparameter

Identifizierung von Neuronen

Insgesamt konnten während dieser Arbeit ca. 1.500 Messungen an 350 Zellen durchgeführt werden. War es möglich, eine Zelle in eine der drei morphologischen Klassen einzuordnen, handelte es sich normalerweise auch um ein Neuron. An diesen Zellen konnten, ausgehend von einem Membranpotential von -130 mV, mit Hilfe depolarisierender Spannungssprünge, transiente Einwärtsströme ausgelöst werden (Abb. 11). Diese Ströme sind für die Kanäle des schnell inaktivierenden Natriumsystems charakteristisch. Ebenso sind für Neurone die lang anhaltenden Auswärtsströme typisch, die den Na^+ -Strömen folgen und von K^+ -Ionen getragen werden (Abb. 11). Eine eindeutige Identifizierung eines Neurons war jedoch erst durch den Nachweis der Erregbarkeit, also die Auslösung von Aktionspotentialen möglich (Abb. 12), da nach neueren Untersuchungen auch Gliazellen schnell inaktivierende Na^+ -Kanäle besitzen.

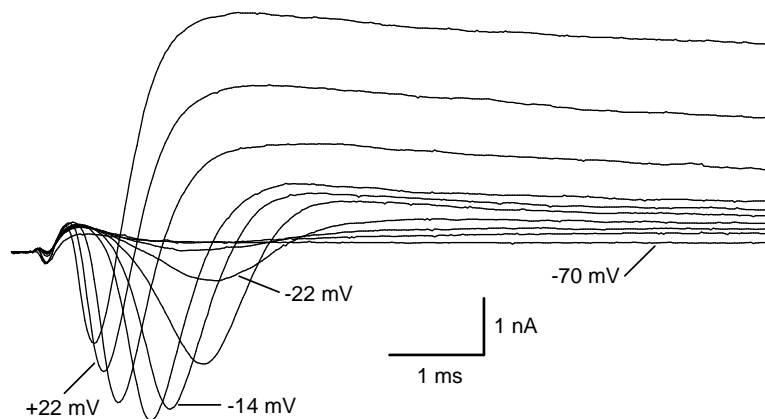


Abb. 11: Verlauf der Membranströme bei Sprüngen auf zunehmend positivere Haltepotentiale (-70, -30, -26, -22, -18, -14, -10, +6, +22 und +38 mV), ausgehend von einem Haltepotential von -130 mV. Die kleinen Ströme zu Beginn der Spannungssprünge (bis ca. 500 μ s) sind kapazitive Artefakte. Die transienten Einwärtsströme werden gefolgt von lang anhaltenden Auswärtsströmen.

Aufgrund der bei den Tectumzellen vorhandenen Zellausläufer gab es bei der Messung der Natriumströme teilweise Probleme mit der räumlichen Kontrolle der Klemmspannung. Durch eine große Ausdehnung der Zelle kann an den Membranteilen, die weit vom Soma entfernt sind, das Haltepotential bei Spannungssprüngen nicht schnell genug auf den neuen Wert eingestellt werden (Space-clamp-Problem). Dies führte in Extremfällen zu einer vollen Aktivierung des Na^+ -Stroms nach einer Änderung der Sprungspannung von nur +4 mV; bei kugelförmigen Zellen hingegen überdeckte dieser Spannungsbereich ca. 35 mV. Dies zeigte sich bei Messungen (im Zusammenhang mit anderen Fragestellungen) von akut isolierten Herzmuskelzellen des embryonalen Hühnchens bzw. retinalen Ganglienzellen der postnatalen Ratte. Die Signale der in der vorliegenden Arbeit untersuchten liganden-aktivierten Ströme von Tectumneuronen spielten sich auf einer langsamen Zeitskala ab, so daß Space-clamp-Probleme vernachlässigt werden konnten.

Das direkt nach Erreichen der Whole-cell-Konfiguration gemessene Membranpotential der Zellen (Eintrittspotential) betrug $E_M = -56,5 \pm 6,2$ mV ($n = 22$). Dieses Potential entspricht in erster Näherung dem Ruhemembranpotential der Zellen. Eine Veränderung von E_M mit dem Kulturalter konnte nicht nachgewiesen werden.

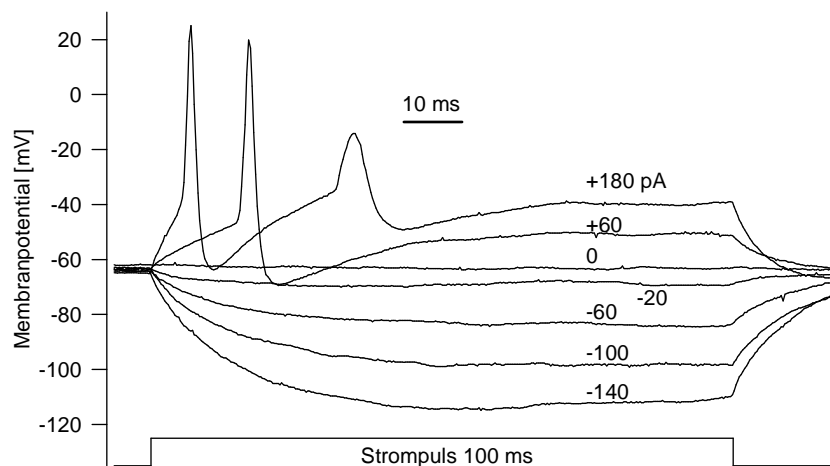


Abb. 12: Verlauf des Membranpotentials nach Injektion unterschiedlich großer Strompulse. Aus den Hyperpolarisationen kann durch Anpassung einer Exponentialfunktion die Membranzeitkonstante τ ermittelt werden.

Aktionspotentiale

Die meisten Zellen des Tectum opticum, denen für 100 ms ein depolarisierender Strom injiziert wurde, bildeten ein Aktionspotential aus (Abb. 12). In wenigen Fällen konnten bis zu drei weitere beobachtet werden, allerdings hatten sie dann eine geringere Amplitude und verlangsamte Kinetik. Die Ausnahme bildete eine Zelle, die bei langandauernder Strominjektion eine kontinuierliche Aktionspotentialfolge generierte. Die Frequenz war dabei linear vom applizierten Strom abhängig, allerdings konnte nur ein Bereich zwischen +28 pA (\rightarrow 22,6 Hz) und +40 pA (\rightarrow 30,8 Hz) abgedeckt werden. Die Zelle erzeugte bei der Dauerinjektion in vier getrennten Experimenten durchschnittlich 49 aufeinanderfolgende Aktionspotentiale, danach brach die Aktivität jeweils zusammen.

Das Ergebnis der Auswertung von 31 Aktionspotentialen verschiedener Zellen zeigt Tab. 2. Eine Abhängigkeit der Parameter Amplitude, Dauer, Anstiegs- und Abfallszeit vom Kulturalter wurde durch einen Vergleich von zwei Altersgruppen (bis 4 Tage bzw. älter als 4 Tage) geprüft. Die Dauer der Aktionspotentiale (gemessen auf dem Niveau der halbmaximalen Amplitude) war bei den älteren Zellen signifikant geringer, die Abfallgeschwindigkeit größer als bei den jüngeren Zellen. Hier besteht möglicherweise ein Zusammenhang zur Verminderung des spezifischen Membranwiderstands und der Membranzeitkonstanten während der Kultivierungsdauer (s. nächster Abschnitt). Es wäre auch denkbar, daß die spannungsaktivierten Na^+ -Kanäle erst mit fortgeschrittenem Alter voll entwickelt sind und auf diese Weise die Kinetik der Aktionspotentiale verändert wird.

Tab. 2: Untersuchte Parameter der Aktionspotentiale im Vergleich zweier Altersgruppen.

	<i>Kultur bis 4 Tage</i> (n = 6)		<i>Kultur älter 4 Tage</i> (n = 25)		
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
<i>Amplitude (Max.-Min.) [mV]</i>	65,6	11,8	79,2	15,7	
<i>Dauer (halbmax. Amplitude) [ms]</i>	2,50	0,59	1,76	0,48	*
<i>Anstiegsgeschwindigkeit [$V \cdot s^{-1}$]</i>	53,0	16,7	87,7	38,0	
<i>Abfallsgeschwindigkeit [$V \cdot s^{-1}$]</i>	-31,8	14,8	-57,7	28,8	***

*: signifikanter Unterschied mit $\alpha = 0,05$; ***: mit $\alpha = 0,01$ (t-Test)

Bei Zellen, deren Membranpotential sich als besonders stabil erwies, konnten die Refraktärphasen der Erregung bestimmt werden (Abb. 13). Die absolute Refraktärzeit, innerhalb der keine aktive Änderung des Membranpotentials zu beobachten war, dauerte ca. 8 ms. Die volle Amplitude der Aktionspotentiale wurde nach 20-25 ms wieder erreicht. Bei ungefähr 25 % der untersuchten Zellen trat nach der Auslösung von Aktionspotentialen eine Nachhyperpolarisation auf (vgl. Abb. 13).

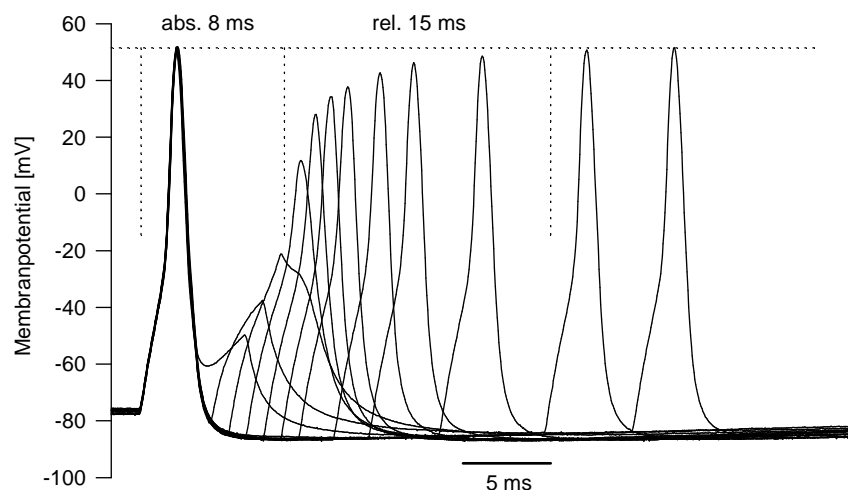


Abb. 13: Bestimmung der absoluten und relativen Refraktärzeiten (8 bzw. 15 ms); Stimulus: 2 Strompulse (+40 pA für 3 ms) mit wachsendem Zeitabstand. Bei dieser Zelle traten starke Nachhyperpolarisationen auf.

Entwicklungsabhängige Änderung des Membranwiderstands

Der spezifische Membranwiderstand R_M wurde im Verlauf der Kultivierungszeit wiederholt bestimmt. Dies geschah indirekt über die Messung der Membranzeitkonstanten τ unter

Verwendung der für RC-Glieder geltenden Beziehung

$$\tau = R_M \cdot C_M, \quad (4),$$

wobei als spezifische Membrankapazität $C_M = 1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ angenommen wurde (Hille, 1992). Aus der Anpassung einer monoexponentialen Funktion an den Membranpotentialverlauf bei hyperpolarisierender Strominjektionen konnte τ ermittelt werden (Abb. 12). R_M ergab sich dann durch Bildung des Quotienten τ / C_M . In der zeitlichen Entwicklung zeigte sich, daß R_M von ca. $100 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ am 2. Kulturtag auf Werte um $30 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ ab dem 6. Tag abfiel (Abb. 14). Zur statistischen Überprüfung wurden Zellen mit einem Alter von bis zu 4 bzw. mehr als 4 Tagen verglichen; es besteht ein signifikanter Unterschied in R_M bzw. τ ($\alpha < 0,01$, t-Test). Dies führt möglicherweise zu den erwähnten Unterschieden in der Aktionspotentialkinetik.

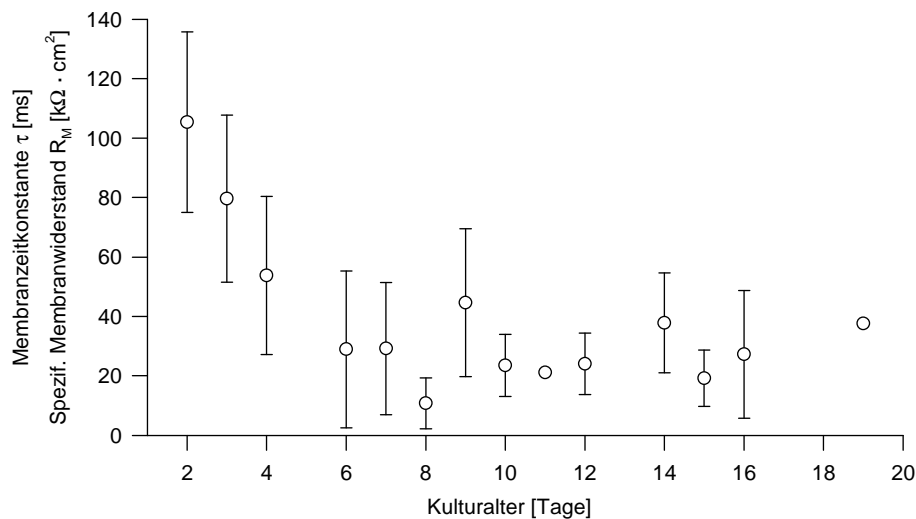


Abb. 14: Abnahme der Membranzeitkonstanten τ bzw. des spezifischen Membranwiderstands R_M mit zunehmendem Kulturalter.

An elf Zellen wurde zusätzlich eine direkte Bestimmung von R_M durchgeführt, um den Literaturwert für C_M zu überprüfen. Dazu mußten die Membrangesamtfläche und der Eingangswiderstand r_m der Zelle ermittelt werden; r_m ergab sich über das Ohm'sche Gesetz aus den Potentialplateaus bei der Strominjektion (Abb. 12), wobei nur die Hyperpolarisationen berücksichtigt wurden, um keine spannungsgesteuerten Ionenkanäle zu aktivieren. Dies war bei den meisten Messungen offenbar gewährleistet; nur in einem Fall war andeutungsweise eine Potentialspitze bei hyperpolarisierenden Strompulsen zu beobachten, der möglicherweise durch „inward-rectifier“-Kaliumkanäle induziert wurde. Die Zelloberfläche wurde aus dem Zelldurchmesser abgeschätzt, der durch eine Skalierung im Strahlengang des Mikroskops bestimmt wurde; dies war allerdings nur mit einer

Genauigkeit von ca. 10 % möglich. Durch Multiplikation der Oberfläche mit r_m ergab sich R_M , und mit (4) und dem bekannten τ schließlich $C_M = 2,5 \pm 1,2 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 11$, \emptyset -Alter = 8,5 d). Dieser Wert war vermutlich deshalb so hoch, weil die Zellausläufer bei der Bestimmung der Zelloberfläche nicht berücksichtigt werden konnten und diese dann zu klein ausfiel (Fernandez et al., 1984). Eventuell ändert sich C_M auch mit dem Kultivierungsalter. Dann wäre wegen (4) die Änderung von τ nicht allein auf eine Änderung von R_M zurückzuführen.

3.3 Transmitterinduzierte Membranströme

Erregende Transmitter

Es wurde schon früher gezeigt, daß die Zellen des Tectum opticum im embryonalen Hühnchen NMDA-gesteuerte Ionenkanäle besitzen (Schirm, 1993; Föhr et al., 1995). Während der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, daß als weitere Agonisten des erregenden Transmittersystems Kainat und AMPA in Frage kommen. Sie lösten bei einem Haltepotential von -70 mV Einwärtsströme aus, wobei sich diese hinsichtlich Amplitude und Desensitivierungsverhalten deutlich unterschieden (Abb. 15). Es ist bei den Darstellungen von Membranströmen zu beachten, daß der Einstrom positiver (Netto-) Ladung in die Zelle stets abwärts dargestellt wird. Das Vorzeichen dieser Ströme ist negativ.

Während der Perfusion nahmen die Stromfluktuationen zu, was auf das Öffnen und Schließen der beteiligten Ionenkanäle zurückzuführen ist. Die Varianz der Stromfluktuationen ist dabei proportional zur Leitfähigkeit der Einzelkanäle (Dudel et al., 1980).

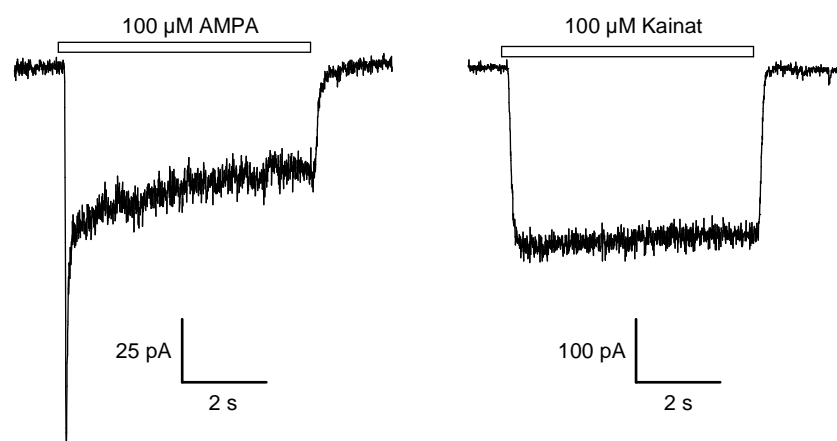


Abb. 15: Whole-cell-Ströme, die durch 100 μM AMPA bzw. Kainat ausgelöst wurden (Skalierung!). Der Balken gibt die Zeit der Applikation an. Die Zellreaktion ist aufgrund der Totzeit des Perfusionssystems um ca. 100 ms verzögert.

Kainat löste Membranströme aus, die selbst bei hohen Konzentrationen des Agonisten

praktisch keine Stromdesensitivierung zeigten. AMPA-induzierte Ströme bestanden hingegen aus einer transienten Stromkomponente und einem langsamer desensitivierenden Plateaustrom.

Die Zeit, in der die Ströme nach Beginn der Agonistenapplikation von 10 % auf 90 % ihrer Amplitude anstiegen, betrug bei Kainat 107 ms und bei AMPA 22 ms ($n = 10$, jeweils sättigende Konzentrationen). Die entsprechenden Abfallszeiten betragen 88 ms bzw. 125 ms. Diese Werte wurden bei optimal eingestellter Perfusion gemessen. Lagen die Anstiegszeiten der AMPA-Ströme über 50 ms, war die Amplitude des transienten Stromes deutlich reduziert.

Die Messungen der Anstiegs- und Abfallszeiten mit AMPA und Kainat dienten somit dem Leistungsfähigkeitsnachweis des Perfusionssystems und wurden später mit den GABA- und Glycinmessungen verglichen.

Hemmende Transmitter

GABA bzw. Glycin aktivierten Membranströme bei über 95 % der untersuchten Zellen des Tectum opticum (> 3 Tage). Bei jüngeren Zellen (< 3 Tage) war der Anteil der glycinempfindlichen Zellen auf ca. 30 % reduziert. Die Ströme zeigten keine schnelle Transiente wie bei AMPA, bei hohen Konzentrationen war jedoch eine deutliche Stromdesensitivierung zu beobachten. Hierin ähnelten sich GABA- und Glycin-induzierte Ströme, letztere waren aber variabler, vor allem was den Anstieg und Abfall der Ströme betraf. In der vorliegenden Studie wurden diese Ströme genauer analysiert und ihre Beeinflußbarkeit durch hemmende oder modulatorisch wirksame Substanzen getestet. Die folgenden Abschnitte berichten über die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

3.4 GABA-induzierte Membranströme

3.4.1 Experimentelle Rahmenbedingungen

Bevor die Wirkung verschiedener Substanzen an den GABA-Strömen untersucht werden konnte, mußten zunächst Rahmenbedingungen gefunden werden, unter denen die Applikation gleicher Substanzkonzentrationen im selben Experiment reproduzierbare Membranströme auslöste. Dies betraf einerseits den technischen Aspekt (Perfusionsgeschwindigkeit und Variabilität der Zulaufkanäle), andererseits waren die durch Zelleigenschaften (Stromdesensitivierung) vorgegebenen Grenzen zu beachten.

Perfusionssystem

Die Messung von GABA- bzw. kainatinduzierten Membranströmen an derselben Zelle ermöglichte es, die Qualität des Perfusionssystems abzuschätzen. Waren die Anstiegszeiten für Kainatströme klein (optimal eingestellte Perfusion), lag die mittlere Anstiegs- bzw. Abfallszeit der GABA-Ströme bei 195 / 640 ms (6,25 μM GABA, $n = 4$) und 90 / 420 ms (100 μM GABA, $n = 4$). Trotz der vergleichsweise schnellen Anstiegszeiten konnten für GABA keine schnellen transienten Ströme gefunden werden, so wie für AMPA (Abb. 15), oder wie es anhand von Outside-out-Messungen für GABA nachgewiesen wurde (Celentano & Wong, 1994). Allerdings traten gelegentlich ca. 2-3 ms dauernde Transienten während der Anstiegsphase des Membranstroms auf; bei Messungen des Membranpotentials zeigte sich, daß dies Aktionspotentiale waren, die durch die Perfusion ausgelöst wurden.

Neben einer Prüfung der Perfusionsgeschwindigkeit wurde auch die Reproduzierbarkeit der Messungen mit verschiedenen Kanälen des Perfusionssystems untersucht. Dazu wurden alle Testkanäle mit identischen GABA-Konzentrationen befüllt und die Amplituden der induzierten Ströme registriert (Abb. 16). Eine systematische Veränderung der Amplituden während der Versuchsdauer, bedingt durch eine mögliche Änderung des physiologischen Zustands der Zelle, wurde durch die Anpassung einer linearen Funktion an die Amplituden berücksichtigt. Die prozentuale Abweichung der Stromamplituden zu dieser Trendlinie wurde bestimmt; sie betrug durchschnittlich 2,3 % ($n = 36$, 6 Versuche). Ein möglicher Einfluß der Kanalreihenfolge wurde durch die Variation derselben ausgeschlossen. Eine Versuchsreihe ohne zusätzliche Druckbeaufschlagung der Vorratsgefäße ergab eine Abweichung von 3,3 %.

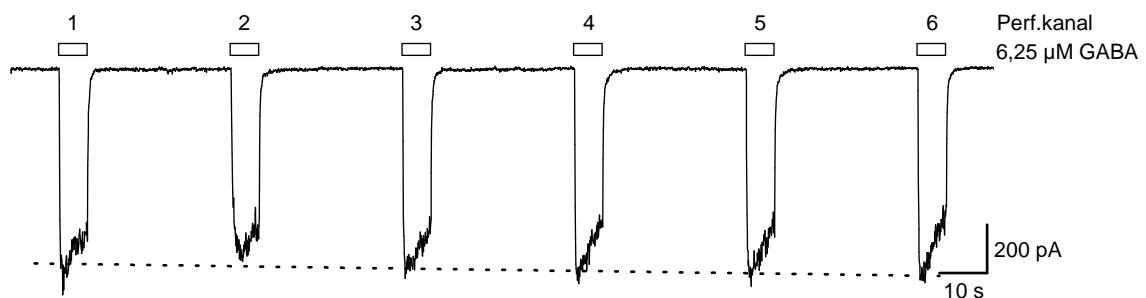


Abb. 16: Test der verschiedenen Perfusionskanäle (1 bis 6) mit identischen GABA-Konzentrationen. Die lineare Regression durch alle 6 Stromamplituden (gestrichelt) dient zur Korrektur von eventuellen systematischen Änderungen des Zellzustands.

Desensitivierung der Membranströme

Bei Konzentrationen von 6,25 μM und mehr zeigte sich bereits eine deutliche Desensitivierung der GABA-aktivierten Membranströme (Abb. 16; Abb. 18). Dem Stromverlauf während einer Applikation konnte meist eine Exponentialfunktion mit einer einzigen Zeitkonstanten τ_D angepaßt werden. Den Zusammenhang zwischen der GABA-Konzentration und τ_D zeigt Abb. 17.

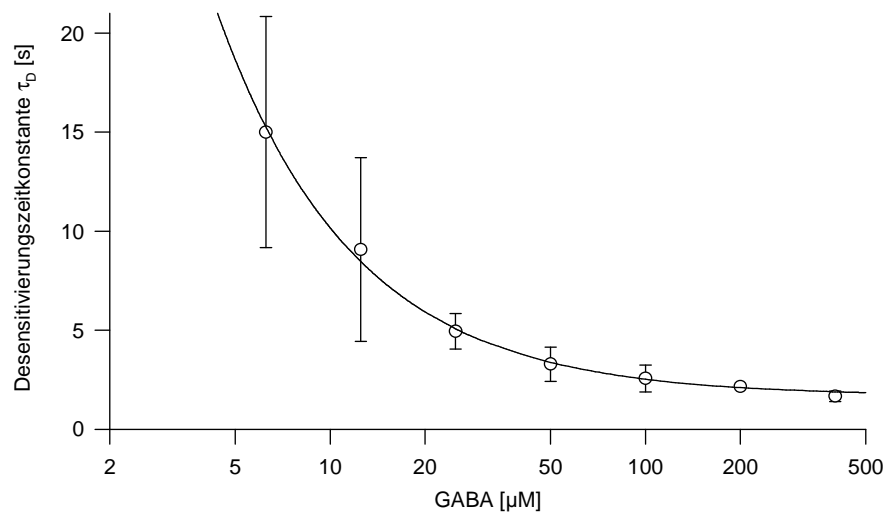


Abb. 17: Zwischen der Desensitivierungszeitkonstanten τ_D und der GABA-Konzentration besteht ein hyperbolischer Zusammenhang.

Es konnte ein hyperbolischer Zusammenhang der folgenden Form gefunden werden:

$$\tau_D = \frac{84,88 \mu\text{Ms}}{[\text{GABA}]} + 1,67\text{s} \quad (5)$$

Bei Erhöhung der GABA-Konzentration von 6,25 μM auf 200 μM verminderte sich τ_D von 15 s auf 2 s. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 400 μM trat in wenigen Fällen eine weitere Zeitkonstante von ca. 0,5 s hinzu ($n = 4$).

Eine wiederholte GABA-Applikation in kurzen Zeitabständen führte, insbesondere bei Konzentrationen von 12,5 μM und mehr, zu einer stetigen Abnahme der erreichten Stromamplituden. Dies war offensichtlich durch die Überlagerung der bei jeder weiteren Applikation hinzukommenden, lang anhaltenden Stromdesensitivierung begründet. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde die minimale Zeit abgeschätzt, die zwischen zwei Applikationen gewartet werden mußte, um Ströme gleicher Amplitude zu erhalten (Abb. 18).

Für eine GABA-Konzentration von 6,25 μM lag diese Zeit bei ca. 30 s, mit höheren Konzentrationen mußte länger gewartet werden. Die Kenntnis dieser minimalen Wartezeit

war für Experimente wichtig, in denen die Wirkung hemmender Substanzen auf den GABA-Strom untersucht werden sollte.

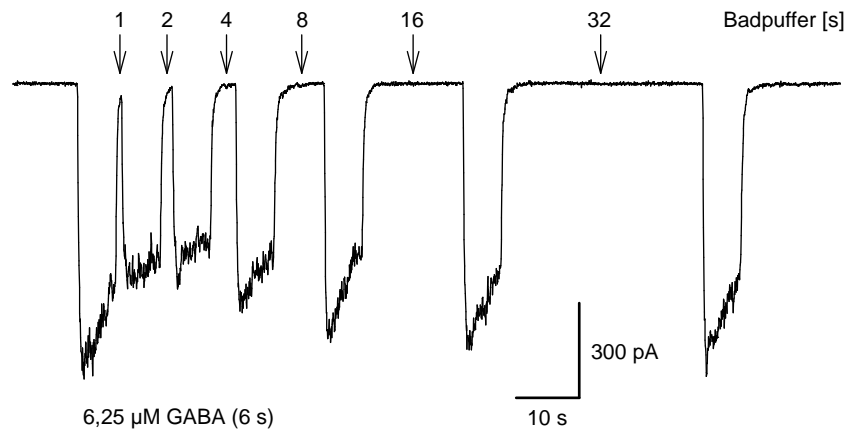


Abb. 18: Bestimmung der minimalen Wartezeit zwischen zwei GABA-Applikationen, um einen additiven Effekt durch Stromdesensitivierung zu vermeiden. Die Zeit zwischen zwei Applikationen wurde jeweils verdoppelt.

3.4.2 Umkehrpotential

Bei bisher untersuchten GABA-gesteuerten Ionenkanälen wird der Membranstrom hauptsächlich durch Chloridionen getragen. Dies dient der Stabilisierung des Membranpotentials auf einem hyperpolarisierenden Niveau. Um herauszufinden, ob auch bei den hier untersuchten GABA-Strömen hauptsächlich Chloridionen beteiligt sind, wurde das Umkehrpotential dieser Ströme bei zwei verschiedenen extrazellulären (EC) Chlorid-Konzentrationen ($[Cl^-]_a$) bestimmt. In der standardgemäß verwendeten EC-Lösung war $[Cl^-]_a = 145$ mM. In einer zweiten, ansonsten identischen Lösung, war $[Cl^-]_a$ auf 35 mM reduziert, zusätzlich enthielt sie 110 mM Propionat. Dieses ist durch Chloridkanäle sehr schlecht permeabel. Zuerst wurde in den Experimenten die standardgemäße intrazelluläre (IC) Lösung verwendet. Es zeigte sich aber, daß unter den gegebenen Meßbedingungen spannungsgesteuerte (K^+ -) Kanäle aktiviert wurden. Dadurch traten starke Auswärtsströme auf, die eine Bestimmung des Umkehrpotentials unmöglich machten und sich zudem negativ auf die Stabilität der Zellen auswirkten. Durch die Verwendung einer Cs^+ - und TEA-haltigen Lösung konnten diese Ströme jedoch weitgehend blockiert werden. Die IC-Lösung enthielt 130 mM Cl^- -Ionen ($[Cl^-]_i$). Gemäß der Nernst'schen Gleichung für Chlorid

$$E_{Cl} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{[Cl^-]_a}{[Cl^-]_i} \right) \quad (6)$$

ergibt sich mit der Standard-EC-Lösung ein Cl^- -Umkehrpotential von $E_{Cl} = -2,8$ mV, für die

EC-Lösung mit reduziertem Cl^- ergibt sich $E_{\text{Cl}} = +33,1 \text{ mV}$ ($R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$; $F = 9,649\cdot 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$; $T = 293 \text{ K}$; $z = -1$).

Zur experimentellen Bestimmung des Umkehrpotentials der GABA-Ströme (E_G) war es notwendig, den GABA-Membranstrom bei unterschiedlichen Haltepotentialen zu messen. Dies geschah durch Anlegen eines rampenförmigen Spannungsverlaufs von -100 bis $+50 \text{ mV}$, die Geschwindigkeit betrug dabei $+30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Zunächst wurde eine Kontrollmessung durchgeführt, während der nur Badpuffer perfundiert wurde. Danach wurde zusätzlich GABA in einer Konzentration von $6,25 \mu\text{M}$ perfundiert und nach 5 s mit der Spannungsrampe begonnen. Von dem dabei gemessenen Stromverlauf wurde der Strom der Kontrollmessung abgezogen, um eventuell vorhandene spannungsaktivierte Ströme zu eliminieren (Abb. 19).

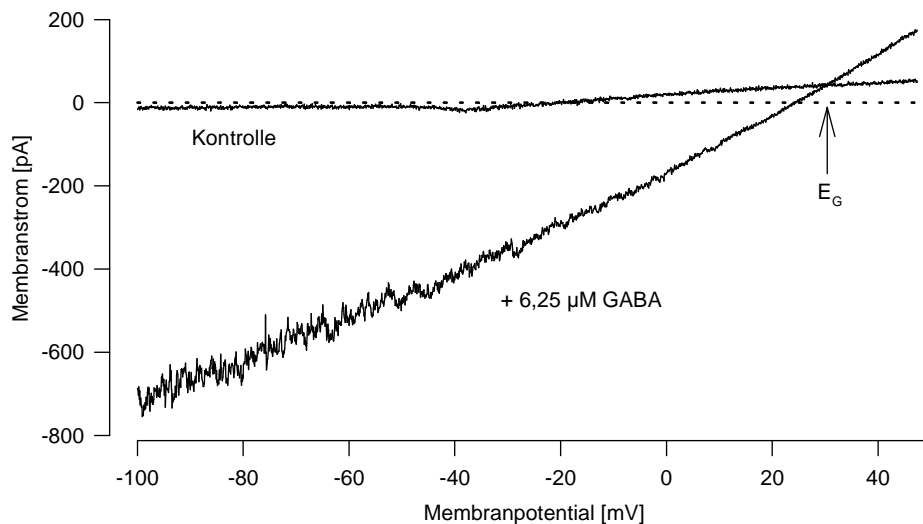


Abb. 19: Bestimmung des Umkehrpotentials für GABA-Ströme (E_G) durch den Stromverlauf bei Spannungsrampen. Der unter GABA-Einfluss gemessene Strom wird um den Strom korrigiert, der allein durch die Rampe ausgelöst wurde (Kontrolle). Der Schnittpunkt beider Kurven legt E_G fest.

Aus diesem Differenzstrom wurde E_G durch lineare Regression im Potentialbereich des Nulldurchgangs ($\pm 20 \text{ mV}$) bestimmt. Die Messungen mit unterschiedlichen Cl^- -Konzentrationen der Badlösung wurden an verschiedenen Zellchargen durchgeführt, d.h. alle E_G -Werte stammen von verschiedenen Zellen.

Der Mittelwert für das Umkehrpotential bei der Standard-Chloridkonzentration (145 mM) betrug $E_G = +1,3 \pm 4,0 \text{ mV}$ ($n = 12$), bei reduziertem Chlorid (35 mM) $E_G = +33,6 \pm 2,0 \text{ mV}$ ($n = 7$). Die Reduktion von $[\text{Cl}]_a$ bewirkte also eine deutliche Verschiebung des Umkehrpotentials für GABA-Ströme zu positiven Werten hin (Abb. 20). E_G lag jeweils sehr nahe am

theoretisch errechneten Wert für E_{Cl} (Gl. 6).

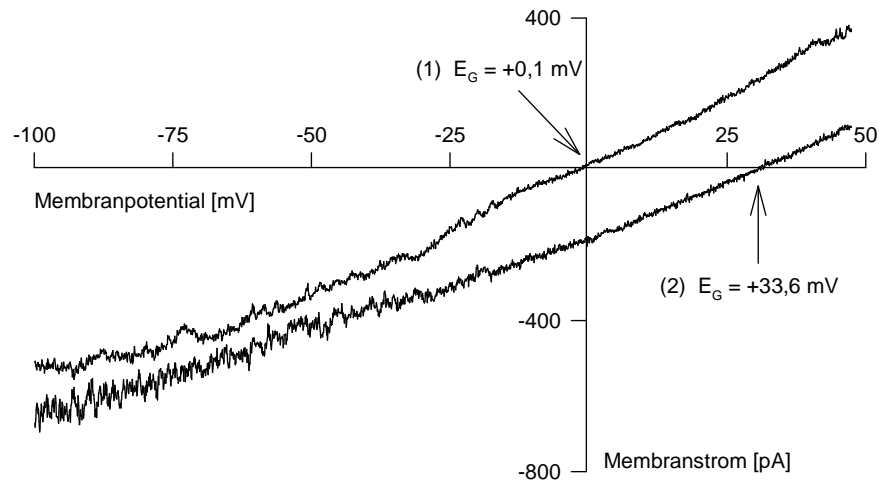


Abb. 20: Verschiebung des Umkehrpotentials durch Änderung der extrazellulären Cl^- -Konzentration. (1) $[Cl^-]_a = 145$ mM, (2) $[Cl^-]_a = 35$ mM. $[Cl^-]_i$ in (1) und (2): 130 mM. E_G entspricht in beiden Fällen dem Nernstpotential für Chloridionen.

3.4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Für spätere Experimente, in denen die Beeinflussung der GABA-induzierten Ströme durch verschiedene Substanzen untersucht werden sollte, war es zunächst notwendig, die Abhängigkeit der unbeeinflussten Ströme von der GABA-Konzentration zu ermitteln. Die Stromamplituden späterer Kontrollmessungen sollten nicht im Sättigungsbereich liegen, damit eine eventuelle Zunahme oder Abnahme der Ströme durch Testsubstanzen mit genügender Genauigkeit festgestellt werden konnte. Weiterhin sollte bei den Strömen eine möglichst geringe Desensitivierung auftreten, um die Auswertung zu vereinfachen.

Das Mehrkanal-Perfusionssystem ermöglichte es, in kurzer Zeit sechs verschiedene Konzentrationen zu testen. Abb. 21 zeigt das Beispiel einer solchen Meßreihe.

Um einen größeren Konzentrationsbereich abzudecken, wurden Experimente mit weiteren Konzentrationswerten durchgeführt. Eine Auswertung der Stromamplituden (Spitzenstrom zu Beginn einer Applikation), ist in Tab. 3 zusammengefaßt. Für diese Messungen wurden 11 Zellen mit einem Alter von 3 bis 20 Tagen verwendet. Drei weitere Zellen mit extrem abweichenden Absolutwerten wurden nicht berücksichtigt. Die relativen Werte konnten von allen 14 Zellen ausgewertet werden.

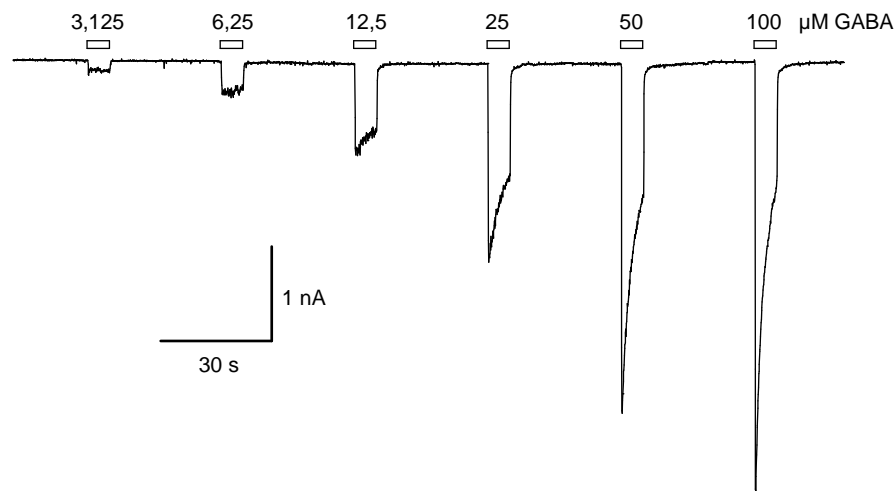


Abb. 21: Durch ansteigende GABA-Konzentrationen ausgelöste Membranströme. Neben der Amplitude vergrößert sich auch die Desensitivierung der Ströme.

Tab. 3: Mittelwerte der absoluten Stromamplituden bei verschiedenen GABA-Konzentrationen.

GABA [μM]	Mittlere Stromamplitude [pA]	SD	n
1,56	-46	28	7
3,13	-140	91	4
6,25	-348	204	11
12,5	-928	428	11
25	-1836	810	11
50	-3382	1131	6
100	-3422	1352	9
400	-2823	1212	7

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurden die Daten der Ströme wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben weiterverarbeitet. In Abb. 22 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Die wichtigsten Parameter der Näherungskurve sind die Konzentration, bei der der halbmaximale Strom gemessen wird ($\text{EC}_{50} = 22,4 \mu\text{M}$) und der Hillkoeffizient ($n = 1,68$) als Steigungsmaß.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die meisten weiteren Experimente mit einer GABA-Konzentration von $6,25 \mu\text{M}$ durchgeführt, da die Ströme bei dieser Konzentration eine geringe Desensitivierung zeigten und bei geeigneter Verstärkung dennoch gut zu erfassen waren.

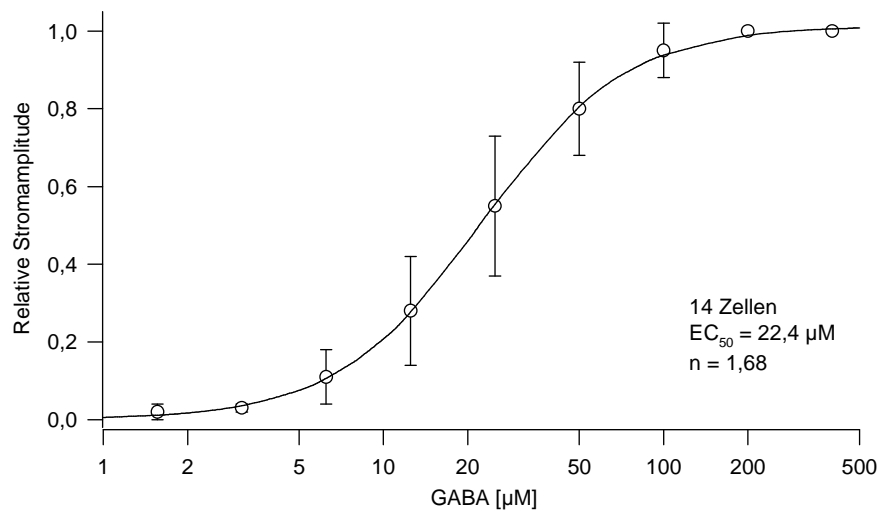


Abb. 22: Dosis-Wirkungs-Kurve der GABA-induzierten Membranströme.

Es wurden auch Dosis-Wirkungs-Kurven für GABA in verschiedenen Kulturalterstadien erstellt. Die Ergebnisse sind zum direkten Vergleich mit Glycin in Abschnitt 3.5 dargestellt.

3.4.4 Wirkung von Antagonisten

An GABA- und glycininduzierten Membranströmen wurde die Wirkung von Picrotoxin, Bicucullin und Strychnin untersucht. Bicucullin und Picrotoxin gelten als spezifische Antagonisten der GABA-Wirkung, wohingegen Strychnin als spezifischer Antagonist der Glycin-Wirkung beschrieben wird. Aus zeitlichen Gründen wurde keine Schild-Analyse durchgeführt, sondern für jeden dieser Stoffe eine Hemmkurve erstellt. Ein Beispiel für die dazu durchgeführten Experimente zeigt Abb. 23. Zunächst wurde mit GABA allein eine Kontrollmessung durchgeführt, auf deren Stromamplitude die Wirkung der nachfolgend getesteten Antagonistenkonzentration in Gegenwart von GABA bezogen wurde. Die anschließende zweite Kontrollmessung zeigte, inwieweit die Erholung der GABA-Ströme vorangeschritten war. Durch wiederholte GABA-Applikationen konnte der Erholungsprozess zeitlich mitverfolgt werden (im Fall einer länger anhaltenden Hemmung, z.B. bei Picrotoxin). Ein weiteres Experiment wurde erst durchgeführt, nachdem die GABA-Stromamplitude ihr ursprüngliches Niveau wieder erreicht hatte bzw. konstant blieb. Die Strychnin- und Bicucullinwirkung auf GABA-induzierte Ströme war fast vollständig reversibel. Dies zeigen Abb. 23 und Abb. 24. Die hohe Reversibilität der Bicucullinwirkung wird in Abb. 24 durch ein Zwischenschalten des Antagonisten während einer anhaltenden GABA-Applikation demonstriert.

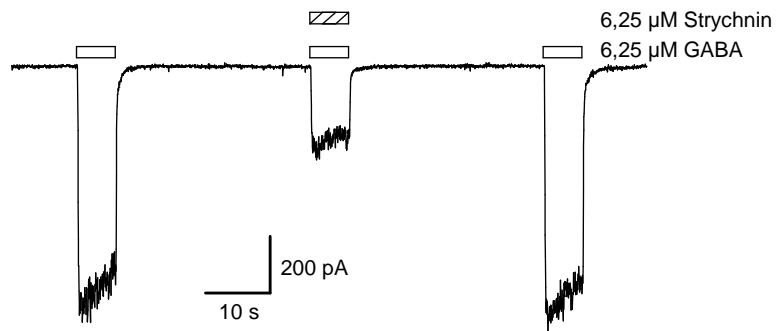


Abb. 23: Reversible Hemmung von GABA-induzierten Strömen durch Strychnin.

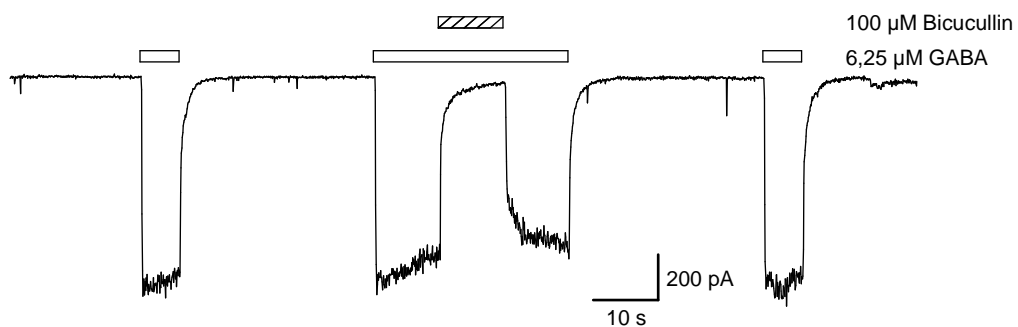


Abb. 24: Reversible Hemmung von GABA-induzierten Strömen durch Bicucullin.

Erstaunlich war, daß Strychnin als spezifischer Glycinantagonist bereits in geringen Konzentrationen eine Wirkung auf GABA-induzierte Ströme zeigte. Sie lagen in der gleichen Größenordnung wie ähnlich wirkende Bicucullinkonzentrationen. Abb. 25 zeigt die aus den Experimenten gewonnene Hemmkurve der Bicucullinwirkung auf GABA-induzierte Ströme. Es wurden die Messungen von 4 Zellen verwendet.

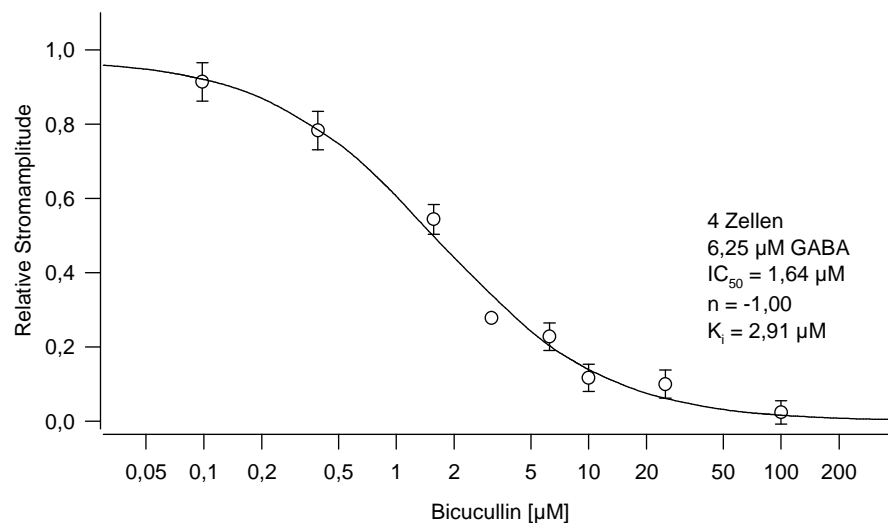


Abb. 25: Hemmkurve der Bicucullin-Wirkung an GABA-induzierten Membranströmen.

Weitere Darstellungen und die für verschiedene Substanzkombinationen ermittelten Parameter sind in Abschnitt 3.5 zusammengefaßt.

Während die Hemmwirkung von Strychnin und Bicucullin schnell eintrat und den Membranstrom insgesamt verringerte, zeigte sie sich bei Picrotoxin verzögert. Dies war bei 6,25 μM und 25 μM GABA der Fall (Abb. 26a und b). Außerdem war die Picrotoxinwirkung auch bei der zweiten Kontrollmessung noch vorhanden; erst bei einer dritten Kontrollmessung, ca. 60 s nach der Picrotoxinapplikation, erholte sich die Stromamplitude weitgehend (Abb. 26b). Wurde Picrotoxin in einer Präinkubationsphase ohne GABA appliziert, änderte dies den Stromverlauf bei der nachfolgenden GABA / Picrotoxin-Applikation nicht (Abb. 26c). Der durch die verzögerte Hemmwirkung von Picrotoxin verursachte Peak-Strom zu Beginn der Applikation konnte auf diese Weise nicht blockiert werden.

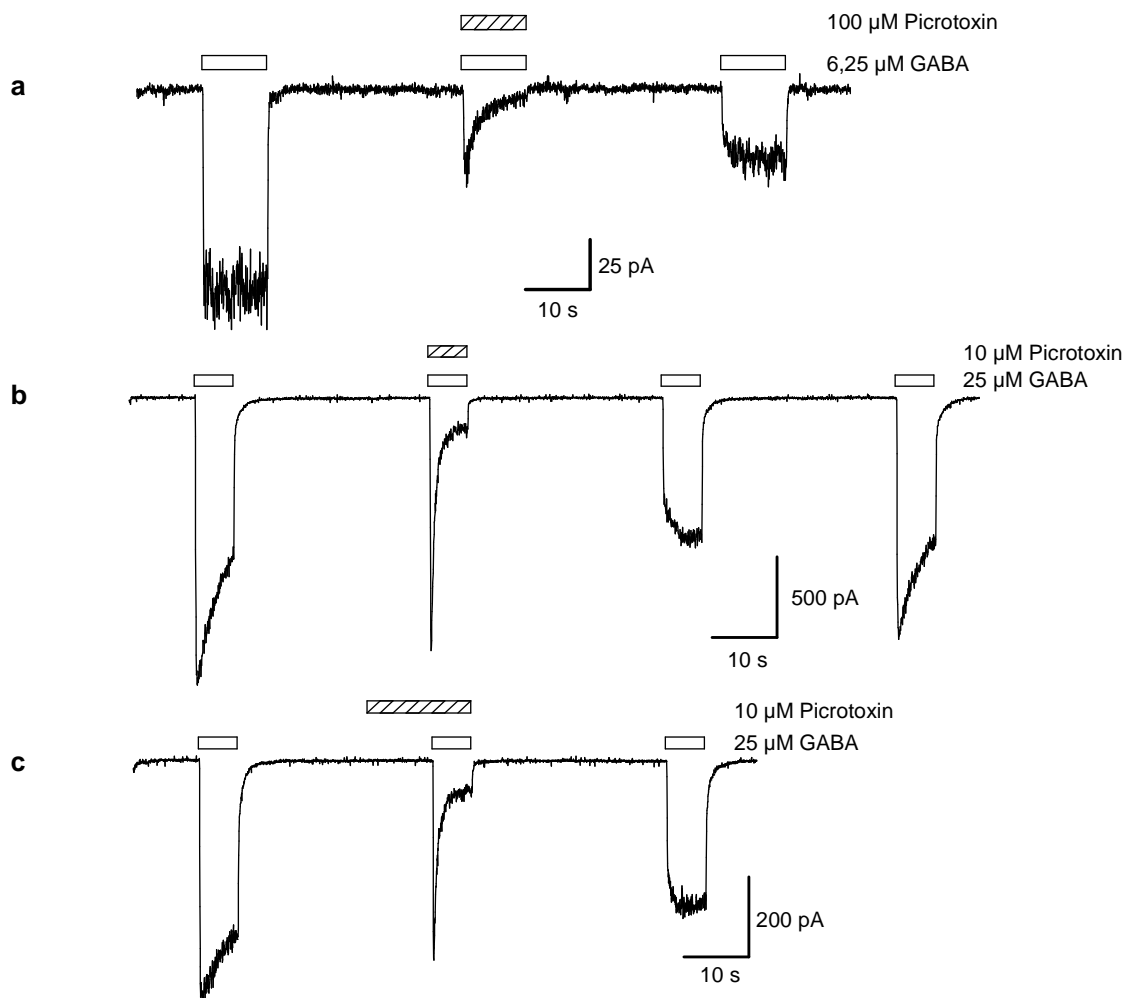


Abb. 26: **a:** Verzögerte Hemmwirkung von Picrotoxin auf GABA-Ströme; **b:** wie **a**, jedoch mit höherer GABA-Konzentration, eine Erholung der Stromamplituden wird nach 60 s erreicht; **c:** die Präinkubation von Picrotoxin beeinflusst den Peak-Strom durch GABA / Picrotoxin nicht.

3.4.5 Modulatorische Wirkungen von Ethanol, Pentobarbital und PMA

GABA-induzierte Membranströme können durch Substanzen moduliert werden, die entweder einen direkten Einfluß auf den Rezeptor zeigen, oder ihre Wirkung über biochemische Mechanismen innerhalb der Zelle entfalten („second messenger“). Als Vertreter der ersten Gruppe wurden Ethanol und Pentobarbital untersucht. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC) und wirkt somit intrazellulär; ein Einfluß auf GABA_A- Membranströme wird vermutet (Sieghart, 1995; Bormann, 1988). Die Ergebnisse der PMA-Experimente werden zusammen mit jenen für Glycin in Abschnitt 3.5 beschrieben.

Ethanol

Ethanol allein zeigte bei einer Konzentration von 35 mM kaum eine Wirkung auf den Ruhemembranstrom. Bei einer Ethanolkonzentration von 226 mM hingegen konnten Ströme von bis zu -100 pA beobachtet werden.

Das experimentelle Vorgehen bei der Untersuchung der Ethanol- und Pentobarbitalwirkungen auf GABA-Ströme war ähnlich wie bei den Messungen der Antagonistenwirkungen. Es wurden drei aufeinanderfolgende GABA-Ströme induziert, wobei beim mittleren zusätzlich die zu testende Substanz appliziert wurde. In Abb. 27 ist die Wirkung von Ethanol auf GABA-Ströme gezeigt.

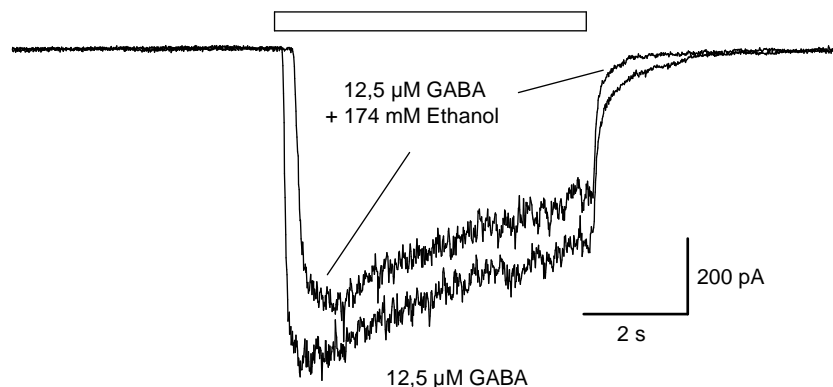


Abb. 27: Ethanolwirkung (174 mM) auf die Amplitude GABA-induzierter Ströme und ihren zeitlichen Abfall bei Applikationsende. Zur besseren Übersicht ist nur der erste GABA-Kontrollstrom dargestellt. Die Versetzung der Ströme zu Beginn ist zufällig.

Die Zeit des Stromabfalls nach Beendigung der GABA-Applikation wurde quantifiziert als die Zeit, in der der Strom auf 10 % seines Wertes bei Applikationsende (= 100 %) gefallen war. Sowohl Abfallszeit als auch Amplitude des GABA-Stromes wurden durch Ethanol

(174 mM) signifikant vermindert, mit $\alpha = 4 \cdot 10^{-5}$ bzw. $\alpha = 0,012$, $n = 10$ (Abb. 28). Die Abfallszeit verringerte sich im Mittel von 1,09 s (Kontrolle) auf 0,41 s, die Amplituden auf 90 % der Kontrolle.

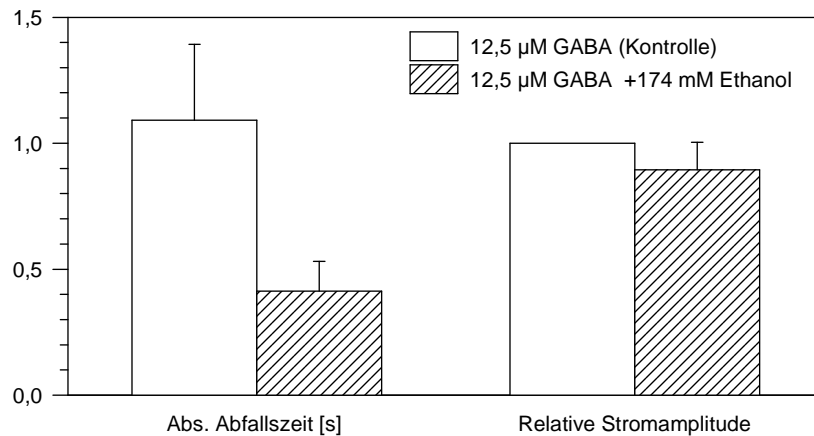


Abb. 28: Ethanol (174 mM) reduziert Abfallszeit und Amplitude der GABA-Ströme signifikant.

Eigenwirkung von Pentobarbital

Für hohe Konzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) wird eine Eigenwirkung von Pentobarbital beschrieben (Sieghart, 1995; Bormann 1988). Dies ließ sich auch bei den Zellen des Tectum opticum zeigen (Abb. 29). Pentobarbital löste einwärtsgerichtete Membranströme aus, mit einem langsamen Anstieg auf ein Plateau, dem eine sprunghafte Erhöhung des Stroms bei Applikationsende folgte. Eine Konzentrationserhöhung des zur Lösung von Pentobarbital benötigten Ethanols von 35 auf 226 mM änderte den absoluten Plateau- bzw. Peakstrom nicht signifikant ($\alpha = 0,29$ bzw. $0,089$, $n = 4$), wohl aber das Verhältnis Peak zu Plateau ($\alpha = 0,0042$). Gleichzeitig verlangsamte sich die Zeit des Stromabfalls nach Wegnahme von Pentobarbital / Ethanol deutlich, im Gegensatz zum Effekt von Ethanol auf das Abklingen der GABA-Ströme.

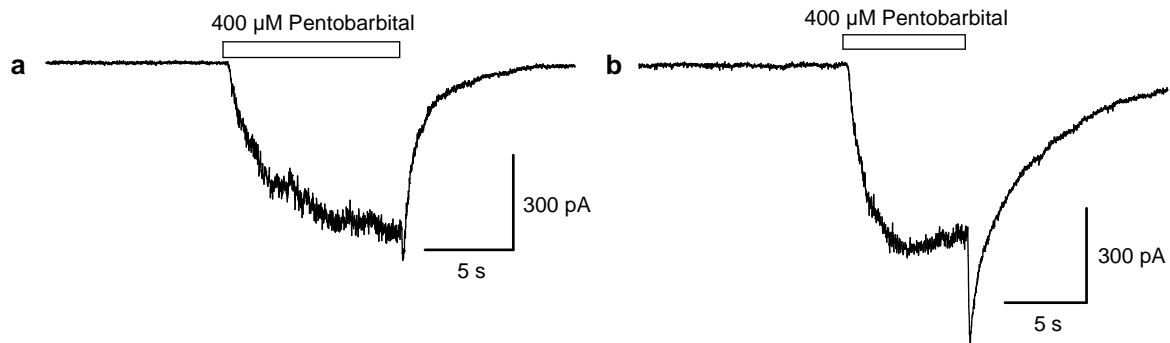


Abb. 29: Eigenwirkung von Pentobarbital ($400 \mu\text{M}$) bei Ethanolkonzentrationen von 35 (a) und 226 mM (b). Der bei Applikationsende auftretende Peak-Strom und die Verzögerung des Stromabfalls nehmen mit der Ethanolkonzentration zu. Die Messungen stammen von zwei verschiedenen Zellen.

Es war möglich, die Eigenwirkung von Pentobarbital durch Bicucullin ($100 \mu\text{M}$) und Picrotoxin ($200 \mu\text{M}$) teilweise bzw. vollständig zu blockieren (Abb. 30). Dies läßt vermuten, daß es sich bei diesen Strömen um Cl^- -Ströme durch GABA_A -Kanäle handelt. Pentobarbital hat hier also eine agonistische Wirkung. Am Ende der Experimente in Abb. 30b trat ähnlich wie in Abb. 29b ein Peak-Strom mit verzögertem Stromabfall auf. Beim Einspülen der GABA-Antagonisten brach der Membranstrom jedoch sehr schnell zusammen, ohne daß ein beachtenswerter Peak-Strom in Erscheinung trat. Peak-Strom und der Strom während des verzögerten Abfalls wurden also vermutlich ebenfalls durch GABA_A -Kanäle vermittelt.

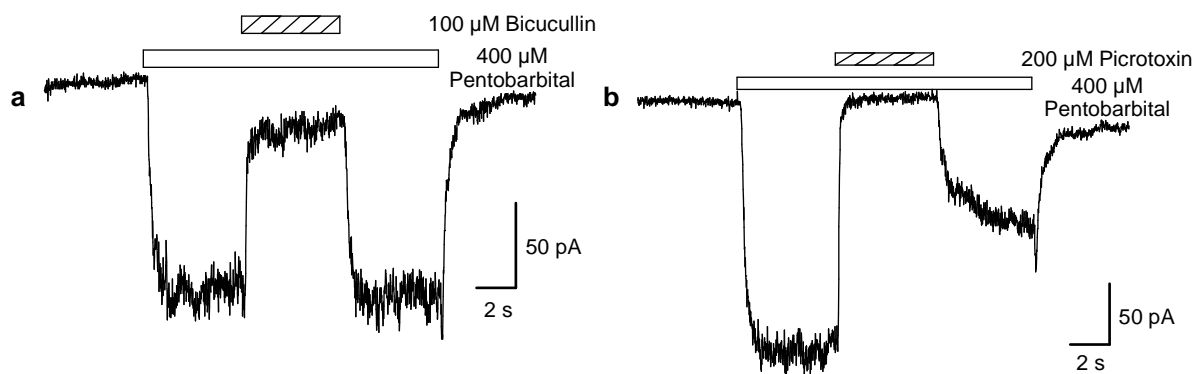


Abb. 30: Hemmung der Eigenwirkung von Pentobarbital durch Bicucullin (a) und Picrotoxin (b). Ethanolanteil: 35 mM.

Für die Ausbildung des Peak-Stroms nach Wegnahme der hohen Ethanolkonzentration (226 mM, Abb. 29b) ist folgende Erklärung denkbar: Es handelt sich offenbar um eine plötzliche Steigerung des GABA-agonistischen Effekts; möglicherweise enfällt bei Appli-

kationsende ein antagonistischer Effekt von Ethanol auf die Pentobarbital-Eigenwirkung, so daß sich kurzfristig eine größere Stromamplitude ausbilden kann. Wie bei den GABA-Stromamplituden scheint es durch die hohe Ethanolkonzentration eine Hemmung des Pentobarbital-aktivierten Cl⁻-Stroms (Plateauphase) zu geben. Der Peak-Strom entspreche dann in etwa der Differenz zwischen ungehemmter und gehemmter Pentobarbital-Eigenwirkung zum Zeitpunkt der Ethanol / Pentobarbital-Wegnahme. Der Effekt von Ethanol auf das Abklingen der Pentobarbital-Eigenwirkung ist bei dieser Überlegung ausgeklammert.

Wirkung von Pentobarbital auf GABA-Ströme

Die Bindung von Barbituraten an GABA_A-Rezeptoren bewirkt eine Verlängerung der mittleren Kanalöffnungszeiten (Sieghart, 1995). Dies führt bei gleicher GABA-Konzentration zu größeren Membranströmen.

Diese Stromzunahme konnte auch bei den Zellen des Tectum opticum bestätigt werden (Abb. 31), nur müssen die Ergebnisse vor dem Hintergrund der gefundenen Ethanolwirkung und Eigenwirkung von Pentobarbital vorsichtig interpretiert werden.

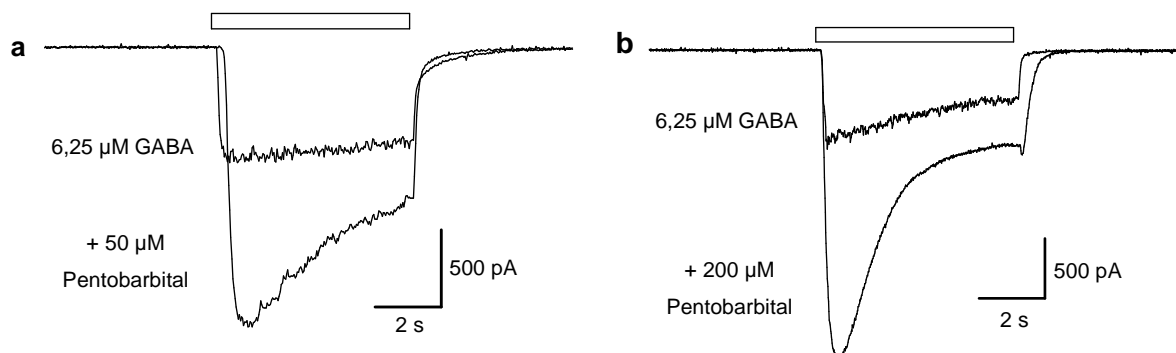


Abb. 31: Steigerung des GABA-induzierten Membranstroms durch Pentobarbital. Der Ethanolanteil beträgt in (a) 30 mM, in (b) 117 mM.

Die in Abb. 31a durch Pentobarbital hervorgerufene Steigerung des Stroms ähnelt dem Effekt einer einfachen Zunahme der GABA-Konzentration. Durchschnittlich wurde mit der Applikation von 6,25 µM GABA und 50 µM Pentobarbital eine Stromamplitude von -825 pA erreicht. Dies entspräche nach Tab. 2 einem Effekt von ca. 12 µM GABA allein, also einer Verdopplung der effektiven GABA-Konzentration.

Bei dieser geringen Konzentration von Pentobarbital und Ethanol war der Stromabfall bei Applikationsende beschleunigt, ähnlich wie bei der Ethanolwirkung auf GABA-Ströme (vgl. Abb. 27). Bei hohen Konzentrationen zeigte sich eine deutliche Verzögerung, die einem

kurzen Peak-Strom folgte. Dies war der Eigenwirkung von Pentobarbital bei hoher Ethanolkonzentration ähnlich (vgl. Abb. 26b).

Aufgrund des verzögerten Stromanstiegs der Pentobarbital-Eigenwirkung (Abb. 3.29) war zu erwarten, daß bei der Steigerung des GABA-Stroms durch Pentobarbital die Spätphase des Stroms vorwiegend durch die Eigenwirkung und die Frühphase eher durch die modulatorische Wirkung von Pentobarbital beeinflusst wurde. Die Messungen der Stromamplituden (frühe Phase!) zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 32) repräsentieren somit weitgehend die modulatorische Wirkung von Pentobarbital.

Die Desensitivierung des GABA-Stroms nimmt in Gegenwart von Pentobarbital ebenfalls zu. Aus Messungen der Desensitivierungszeitkonstanten ergab sich im Mittel für die GABA-Kontrollströme $\tau_D = 6,6$ s (6,25 μ M GABA) und für die Kombination 6,25 μ M GABA / 50 μ M Pentobarbital $\tau_D = 3,4$ s ($n = 7$). Nach der in Abb. 17 gefundenen Beziehung (Gl. 5) zwischen τ_D und der GABA-Konzentration ergäbe sich daraus eine Zunahme der äquivalenten GABA-Konzentration um das 2,8-fache, was einer 2-3-fachen Zunahme des Membranstroms entspräche. Dies paßt ungefähr zur tatsächlichen Steigerung der Stromamplitude durch 50 μ M Pentobarbital (Abb. 32).

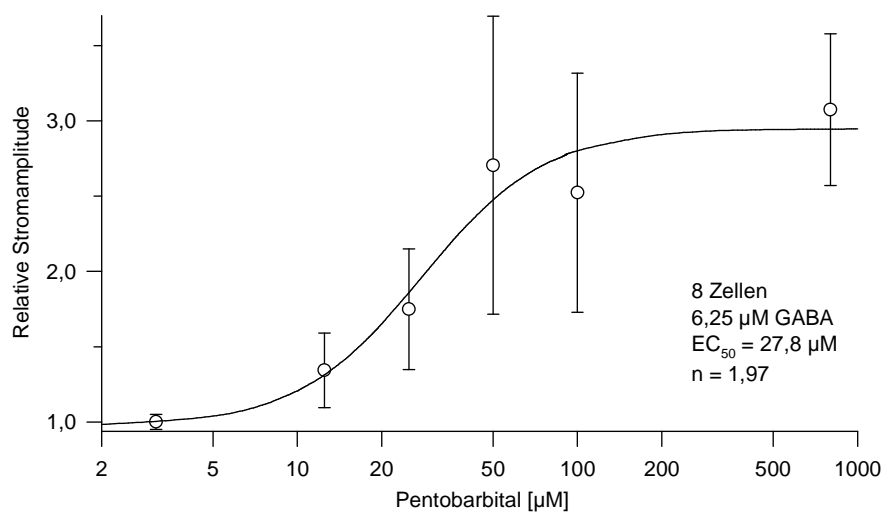


Abb. 32: Dosis-Wirkungs-Kurve der Verstärkung von GABA-Stromamplituden (6,25 μ M) durch Pentobarbital.

Für eine hohe Konzentration von Pentobarbital (800 μ M) wurde $\tau_D = 1,48 \pm 0,54$ s ($n = 9$) ermittelt. Mit diesem Wert war Gl. (5) nicht mehr anwendbar. Der geringe τ_D -Wert bedeutet, daß die äquivalente GABA-Konzentration sehr hoch liegen muß, vermutlich im Sättigungsbereich der GABA-Ströme (Abb. 22). Die sättigenden GABA-Ströme zeigen jedoch eine weniger ausgeprägte Desensitivierung als die Ströme mit 800 μ M Pentobarbital. Dies läßt

vermuten, daß die modulatorische Wirkung von Pentobarbital im Verlauf einer Applikation schneller nachläßt als die alleinige Wirkung einer hohen GABA-Konzentration.

Aufgrund der relativ geringen Eigenwirkungen von 50 μM Pentobarbital und 30 mM Ethanol kann bis zu diesen Konzentrationen die Steigerung des GABA-Stroms weitgehend auf die modulatorische Wirkung von Pentobarbital zurückgeführt werden (Abb. 31a). Bei hoher Pentobarbital- / Ethanolkonzentration muß hingegen die Eigenwirkung dieser Substanzen, vor allem in der Spätphase der Applikation, berücksichtigt werden. In Abb. 31b laufen der Kontroll- und der Teststrom in der zweiten Hälfte der Applikation parallel; vermutlich ist die modulatorische Pentobarbital-Wirkung hier bereits sehr klein und der langsam de-sensitivierende GABA-Strom wird von der in diesem Zeitabschnitt zeitlich konstanten Pentobarbital-Eigenwirkung überlagert.

3.5 Glycin-induzierte Membranströme

Die durch Glycin ausgelösten Membranströme zeigten nicht die gleiche gute Reproduzierbarkeit wie die GABA-Ströme. Ferner mußten im Vergleich zu GABA ca. 2-5-fach höhere Konzentrationen verwendet werden, um ähnlich große Stromamplituden zu erhalten. Es wurden hauptsächlich zwei Formen beobachtet: kleine Ströme (bis ca. 0,5 nA) mit langsamem Anstieg und große Ströme (mehrere nA) mit schnellem Stromanstieg, die GABA-Strömen ähnlich waren (Abb. 33). Junge Zellen bis zu 4 Tagen zeigten ausschließlich die erste Form, ältere Zellen überwiegend die zweite.

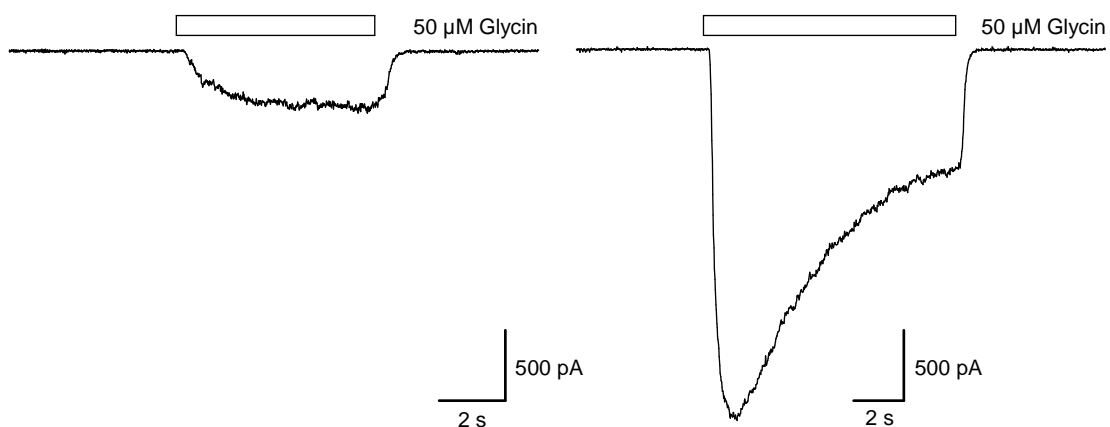


Abb. 33: Hauptformen der glycininduzierten Membranströme. Zellen bis zu einem Kultivierungsalter von 4 Tagen zeigten nur kleine Ströme, ältere Zellen überwiegend größere.

Ein weiterer auffälliger Unterschied war, daß die Stromfluktuationen der glycininduzierten Ströme stets geringer waren als diejenigen der GABA-induzierten. Dies ist ein Hinweis auf

eine kleinere Leitfähigkeit der mit den Glycinrezeptoren gekoppelten Ionenkanäle. Dem Stromverlauf waren jedoch oft sehr große, irreguläre Schwankungen überlagert.

Umkehrpotential

Das Umkehrpotential der glycininduzierten Ströme wurde auf die gleiche Weise wie bei GABA bestimmt. Es betrug unter Standardbedingungen $+1,4 \pm 3,9$ mV ($n = 8$) für die extrazelluläre Lösung ($[Cl^-]_a = 145$ mM) und $+35,2 \pm 3,7$ mV ($n = 3$) bei reduziertem $[Cl^-]_a$ (35 mM). Diese Werte waren ebenfalls mit den entsprechenden von E_{Cl^-} -Werten identisch.

Dosis-Wirkungs-Beziehung

Wie bereits in Abb. 33 angedeutet, zeigten die Zellen in jungen und alten Kultivierungsstadien für Glycin eine unterschiedliche Empfindlichkeit. Dies bestätigte sich beim Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven der Altersgruppen 2-8 und 9-27 Tage (Abb. 34).

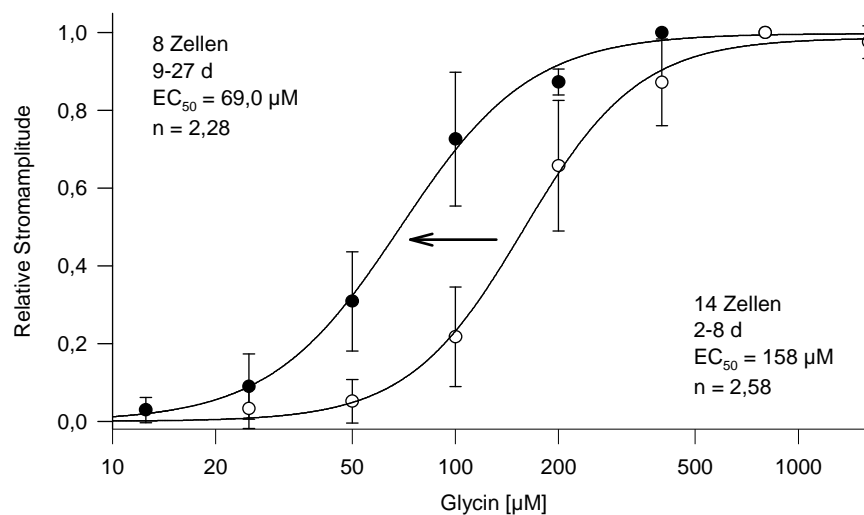


Abb. 34: Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven für Glycin mit dem Kultivierungsalter.

Eine Darstellung der mittleren EC_{50} -Werte als Funktion des Kulturalters macht dies noch deutlicher (Abb. 35).

Bis zu einem Kulturalter von 8 Tagen bleiben die EC_{50} -Werte für Glycin auf einem Niveau zwischen 100 und 150 μ M, danach lagen sie um die Hälfte tiefer. Der statistische Vergleich ergibt bei älteren Zellen für Glycin eine signifikante Erniedrigung der EC_{50} -Werte, für GABA nicht.

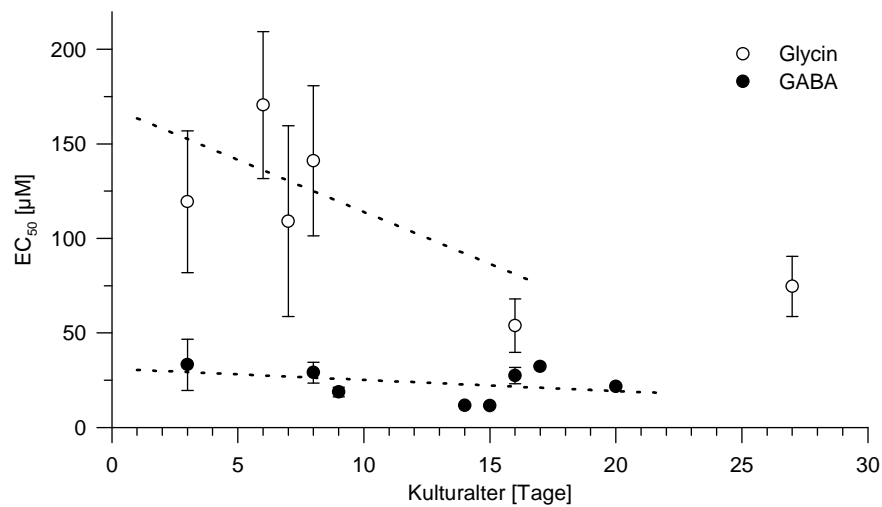


Abb. 35: EC₅₀-Werte aus Dosis-Wirkungs-Kurven für Glycin (n = 27) und GABA (n = 14) in Abhängigkeit des Kulturalters. Die gestrichelten Linien wurden durch lineare Regression aus den Einzelmessungen (bei Glycin: ohne 27. Tag) gewonnen.

Antagonistenwirkung

Die Bestimmung der Hemmkurven für die drei verwendeten Antagonisten verlief bei den Glycinströmen ähnlich wie bei den GABA-Strömen. In Abb. 36 und 37 sind die Bicucullin- und Strychninhemmkurven jeweils für beide Transmitter vergleichend dargestellt.

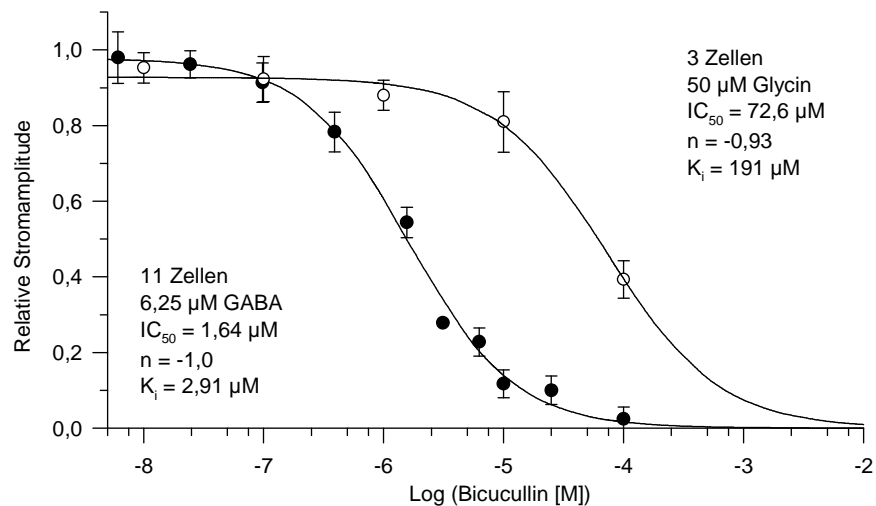


Abb. 36: Hemmkurven der Bicucullinwirkung an GABA- und Glycin-induzierten Strömen.

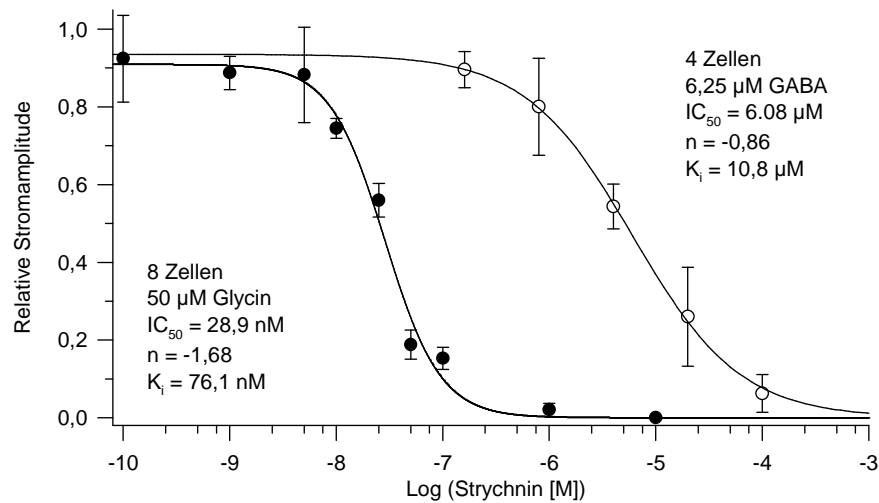


Abb. 37: Hemmkurven der Strychninwirkung an GABA- und glycininduzierten Strömen.

Ein Vergleich der ermittelten IC_{50} - und K_i -Werte für die verschiedenen Agonist-Antagonist-Kombinationen ist in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Parameter der Aktivierungs- und Hemmkurven sowie Berechnung der K_i -Werte für die getesteten Agonisten-Antagonisten-Kombinationen.

Agonist	GABA			Glycin			
$EC_{50} [\mu\text{M}]$	22,4			100*			
Hillkoeffizient	1,68			2,43*			
Konzentration [μM]	6,25		50	50			
Antagonist	Bicuc.	Strych.	Picro.	Bicuc.	Bicuc.	Strych.	Picro.
$IC_{50} [\mu\text{M}]$	1,64	6,08	6,38	11,6	72,6	0,0289	37,2
$K_i [\mu\text{M}]$	2,91	10,8	---	6,23	191	0,0761	---

*Mittlere Dosis-Wirkungs-Kurve aller Messungen (alte und junge Zellen).

Für Picrotoxin konnte kein K_i -Wert ermittelt werden, da es sich um einen nichtkompetitiven Antagonisten handelt.

Überraschend ist, daß für GABA-Ströme der K_i -Wert von Strychnin nur rund 3-fach größer war als von Bicucullin. Strychnin hatte jedoch verglichen dazu an Glycinströmen eine 100-fach effektivere Wirkung, während Bicucullin bei Glycinströmen einen 100-fach geringeren Effekt als bei GABA-Strömen zeigte. Die pharmakologische Charakterisierung der Glycin-

ströme war also auf diese Weise recht genau möglich (hohe Strychnin-, geringe Bicucullin-affinität), während es bei der alleinigen Untersuchung der GABA-induzierten Ströme schwierig gewesen wäre, diese eindeutig der Wirkung von GABA-Rezeptoren zuzuordnen, da Strychnin als spezifischer Blocker von Glycinströmen angesehen wird (Sieghart, 1995). Um die Richtigkeit der modifizierten Cheng-Prusoff-Gleichung zu prüfen, die ja einen von der verwendeten Agonistenkonzentration unabhängigen Vergleich der Hemmwirkung ermöglichen soll, wurde eine zusätzliche Bicucullin-Meßreihe mit einer GABA-Konzentration von 50 μM durchgeführt. Der ermittelte K_i -Wert liegt um den Faktor 2,1 höher als für 6,25 μM GABA. Er sinkt geringfügig auf 1,9 wenn ein Hillkoeffizient von $n = 2$ eingesetzt wird, entsprechend den vermuteten zwei Bindungsstellen am GABA-Rezeptor. Mit der unkorrigierten Cheng-Prusoff-Formel liegt der Unterschiedsfaktor bei 2,8; die Anwendung der Korrektur ist also durchaus sinnvoll.

Modulatoren

Nach der Herstellung der Whole-cell-Konfiguration nahm die Amplitude der glycin-induzierten Membranströme stetig zu, während die GABA-Ströme eher konstant blieben oder kleiner wurden (Abb. 38). Die intrazelluläre Applikation von PMA führte zu einer verstärkten Zunahme der Stromamplituden durch Glycin, während auf GABA-Ströme praktisch keine Wirkung zu beobachten war.

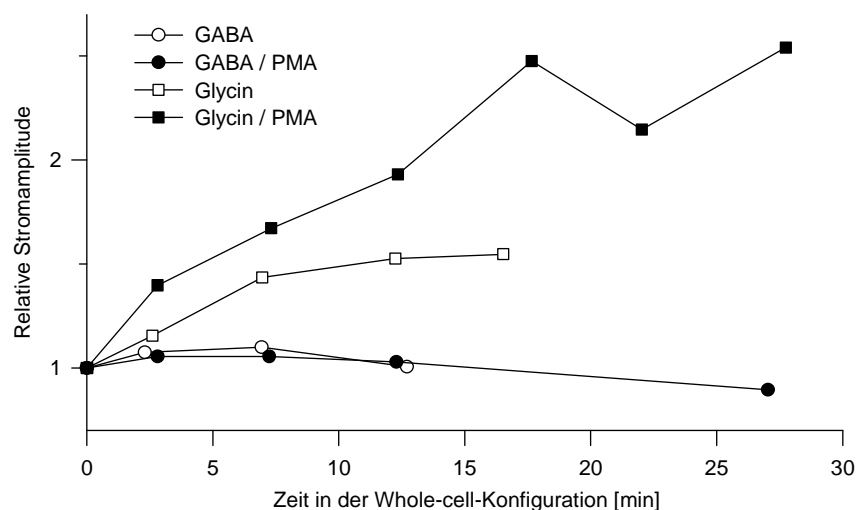


Abb. 38: Einfluß von PMA auf den zeitlichen Verlauf der relativen Amplituden GABA- und glycininduzierter Ströme. Die Messungen von 5-7 Zellen wurden verwendet; Fehlerbalken wurden zur besseren Übersicht nicht dargestellt.

3.6 Kainatinduzierte postsynaptische Ströme

Quantale Ströme

Bei der Qualitätsprüfung der Perfusion mit Hilfe von Kainat (50 und 100 μM) konnte häufig beobachtet werden, daß nicht nur die gewöhnlichen, typischerweise rechteckigen Membranströme ausgelöst wurden, sondern auch schnelle transiente Ströme mit Amplituden bis zu mehreren hundert Picoampère. Es handelte sich dabei offensichtlich um die Reaktion der untersuchten Zelle auf synaptische Eingänge bzw. um spontane postsynaptische Ströme (sPSS) durch Quantenfreisetzung von Überträgerstoff im synaptischen Spalt. In einigen Fällen blieb ihre Häufigkeit auch nach Beendigung einer Kainatapplikation hoch (Abb. 39).

Eine spätere Analyse aller durchgeführten Messungen zeigte, daß sPSS bei schätzungsweise der Hälfte der Zellen auch ohne Applikation von Kainat vorkamen. In zwei Fällen konnte die Auslösung von sPSS durch GABA bzw. Glycin beobachtet werden. Es traten nur dann sPSS auf, wenn die untersuchte Zelle über ihre Ausläufer einen sichtbaren Kontakt zu anderen Zellen oder einem Zellaggregat hatte. Bei einer isoliert stehenden Zelle waren kleine oder überhaupt keine sPSS zu beobachten.

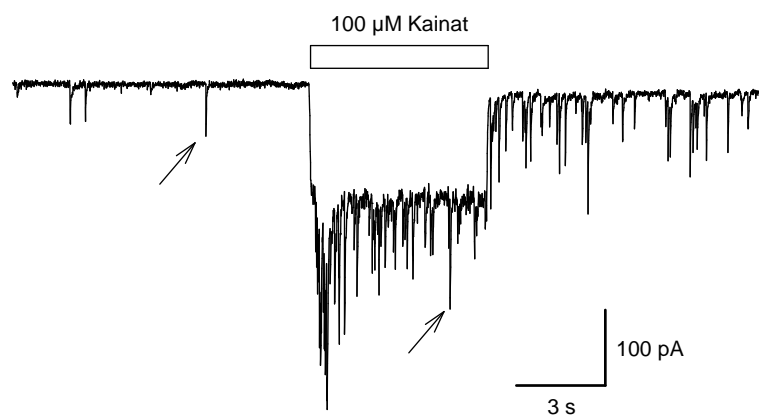


Abb. 39: Zunahme der Häufigkeit spontaner postsynaptischer Ströme (sPSS) durch Kainat (Pfeile markieren zwei Beispiele).

Die stichprobenartige Auswertung von 54 sPSS ergab für den Abfall eine Zeitkonstante von $18,4 \pm 3,6$ ms. Dieser vergleichsweise hohe Wert ließ vermuten, daß es sich um inhibitorische Ströme handelte, da 1. in verschiedenen Zellen die Abfallszeitkonstanten inhibitorischer sPSS in dieser Größenordnung liegen (Cull-Candy, 1995, Kraszewski & Grantyn 1992) und 2. erregende sPSS (durch nicht-NMDA vermittelt) normalerweise eine kleine Abfallszeitkonstante von ca. 1 ms aufweisen.

Die mittlere Amplitude der 2742 sPSS-Amplituden von 9 Zellen (Differenz Spitze - Basis) lag bei -83 pA. Bei Amplituden von weniger als -180 pA (über 90 % der Ereignisse) konnte dem Amplitudenhistogramm eine Normalverteilung mit dem Erwartungswert -53,4 pA und der Streuung 26,3 pA angepaßt werden. Die maximalen sPSS-Amplituden lagen hier bei -500 pA.

Wurden die Amplitudenhistogramme für verschiedene Zellen getrennt ausgewertet, zeigte sich in einigen Fällen eine Verteilung mit Häufungen bestimmter Werte (Abb. 40). Diese waren jeweils ganzzahlige Vielfache einer Grundamplitude von ca. -30 pA.

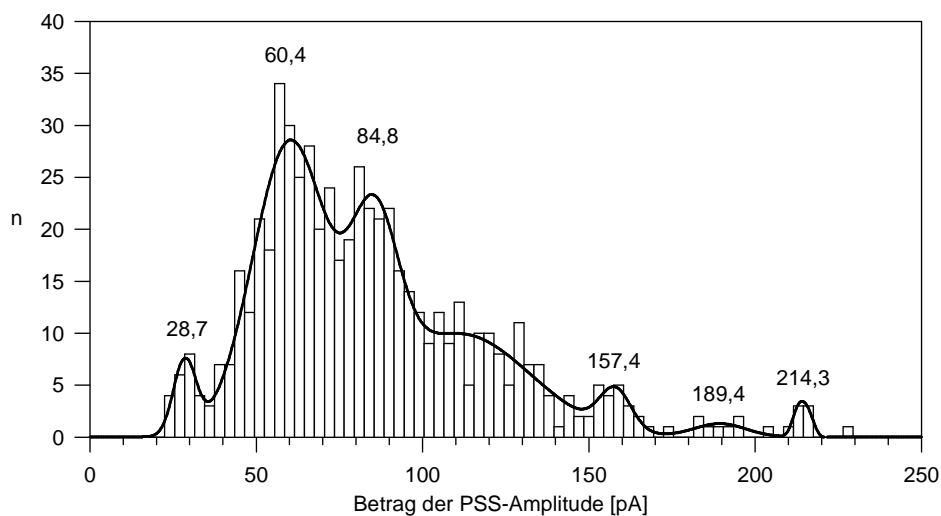


Abb. 40: Häufigkeitsverteilung des Betrags der sPSS-Amplituden einer Zelle; Klassenbreite 3 pA, es wurden 611 sPSS aus 3 aufeinanderfolgenden Experimenten (innerhalb 3 Minuten) verwendet. Die Peak-Werte wurden aus der Anpassung von 7 Gaussfunktionen gewonnen.

Meistens waren die Amplitudenverteilungen viel stärker „verschmiert“, gelegentlich konnte beobachtet werden, daß sich offenbar mehrere Grundamplituden und ihre Vielfache überlagerten.

Um herauszufinden, welcher (mutmaßlich inhibitorische) Transmitter bei den kainat-induzierten sPSS beteiligt war, wurde versucht, diese durch unterschiedliche Strychnin- und Bicucullinkonzentrationen zu blockieren. Im dazu erstellten Meßprotokoll war in der Mitte einer 18 s dauernden Kainatapplikation zusätzlich die Perfusion des jeweiligen Hemmstoffes für 6 s zwischengeschaltet. Zwei Experimente mit 1 μ M Strychnin und 10 μ M Bicucullin als Antagonisten zeigen Abb. 41a und b. Die Amplitude der sPSS nahm zu Beginn der Strychninzugabe leicht ab, ansonsten konnte kaum ein Einfluß festgestellt werden. Durch 10 μ M Bicucullin wurde der größte Teil der sPSS zum Verschwinden gebracht, nur sPSS kleiner Amplitude blieben übrig. Möglicherweise handelte es sich dabei

um sPSS, die durch einen Bicucullin-insensitiven Rezeptor vermittelt wurden. Es könnten auch sPSS gewesen sein, die in ihrer Amplitude lediglich reduziert worden waren. Eine quantitative Auswertung mehrerer Zellen zeigt Tab. 5. Als Maß für die sPSS-Aktivität wurde a) die Anzahl der sPSS und b) die Anzahl der sPSS multipliziert mit ihrer mittleren Amplitude (Abschätzung des Integrals) verwendet. Die sPSS-Aktivität während der 6 s dauernden Kainat- / Antagonistenapplikation wurde auf die ebenfalls 6 s dauernde erste Kainatapplikation (= Kontrolle) bezogen, um so einen relativen Aktivitätswert zu erhalten.

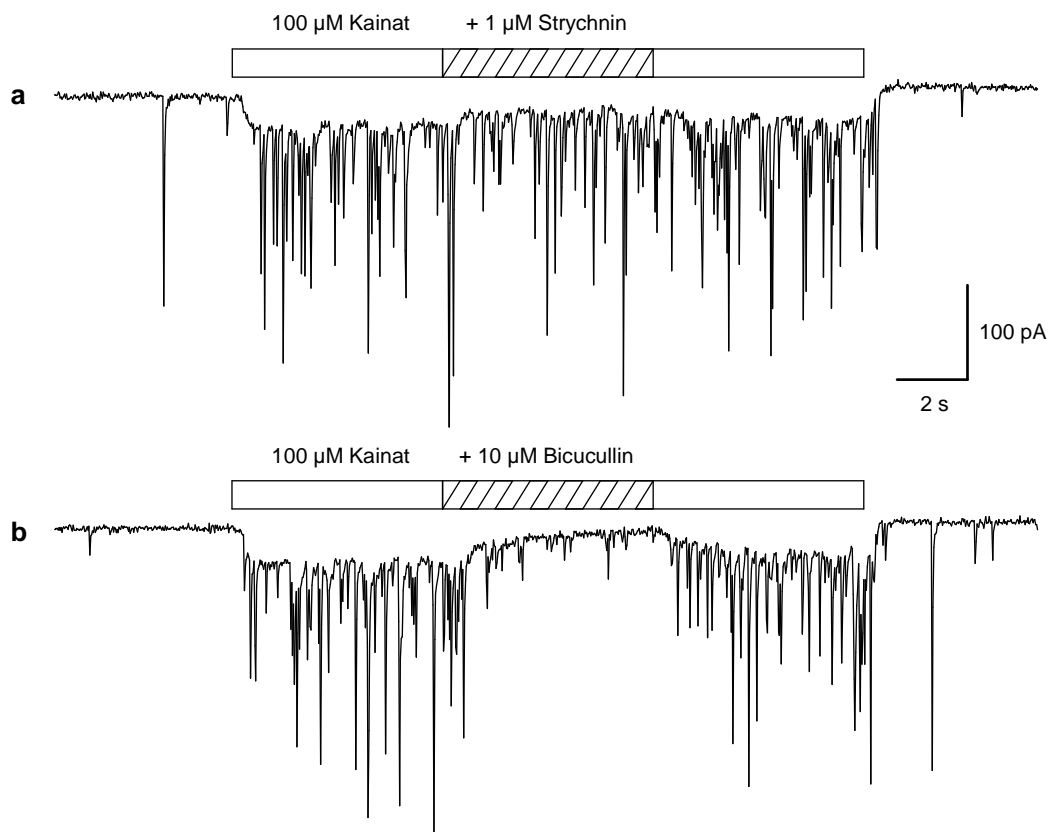


Abb. 41: Einfluß von 1 µM Strychnin (a) und 10 µM Bicucullin (b) auf kainatinduzierte spontane postsynaptische Ströme. Bicucullin hemmt Zahl und Amplitude der Ströme stärker als Strychnin.

Tab. 5: Quantifizierung der sPSS-Hemmung durch Bicucullin und Strychnin. Durch 1 μM Bicucullin wurde die Anzahl der sPSS auf 70 % reduziert.

Antagonist	Mittlere relative Aktivität		n
	Anzahl sPSS	Anzahl \times Amplitude	
1 μM Bicucullin	0,70 \pm 0,24	0,50 \pm 0,18	5
10 μM Bicucullin	0,11 \pm 0,14	0,04 \pm 0,05	5
1 μM Strychnin	0,75 \pm 0,23	0,61 \pm 0,18	15

Die mittleren Werte der relativen Aktivitäten für die drei Antagonistenkonzentrationen sind in Abb. 42a und b in die Hemmkurven von Bicucullin und Strychnin eingetragen.

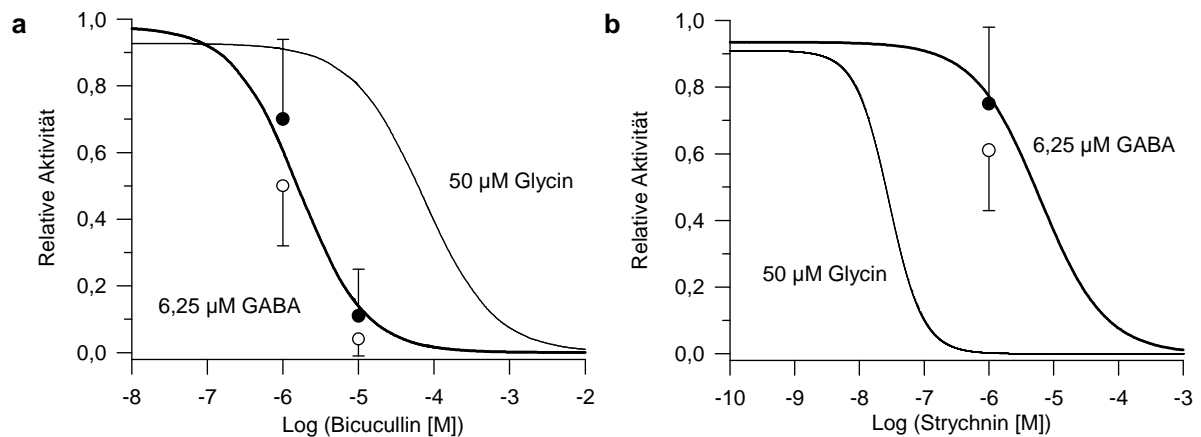


Abb. 42: Die relative Aktivität der sPSS, gemessen an ihrer Anzahl (gefüllte Kreise) bzw. Anzahl \times Amplitude (offene Kreise) liegt nahe an den Hemmkurven von Bicucullin / Strychnin (a / b) für GABA-induzierte Membranströme.

Die Aktivität der sPSS liegt in allen Fällen näher an den Hemmkurven für GABA-Ströme. Bei der Auslösung der sPSS ist also vermutlich GABA als wichtigster Transmitter beteiligt.

Überlagerte nichtquantale / nicksynchronisierte Membranströme

Ein auffallender Effekt, der sich bei einigen Messungen zur sPSS-Hemmung zeigte, war die scheinbare Hemmung des kainatinduzierten Membranstroms durch Bicucullin (angedeutet als Abnahme des Offset-Stroms in Abb. 41b). Es kann sich bei den Offset-Strömen nur teilweise um einen kumulativen Effekt der sPSS gehandelt haben, wie bei zeitweise geringer sPSS-Aktivität zu erkennen war, (Abb. 41b). In weiteren Experimenten konnten die Eigenschaften dieses Offset-Stroms untersucht werden.

Dabei waren die unterschiedlichen Zelleigenschaften hilfreich: Einige Zellen reagierten bei Kainatapplikation zwar mit einer geringen sPSS-Aktivität, zeigten aber einen ausgeprägten Offset-Strom, der eine deutliche Desensitivierung zeigte und gut mit Bicucullin zu blockieren war (Abb. 43a). Der in Gegenwart von Bicucullin verbleibende Membranstrom entsprach dann weitgehend dem direkt durch Kainat an der Zelle hervorgerufenen Strom.

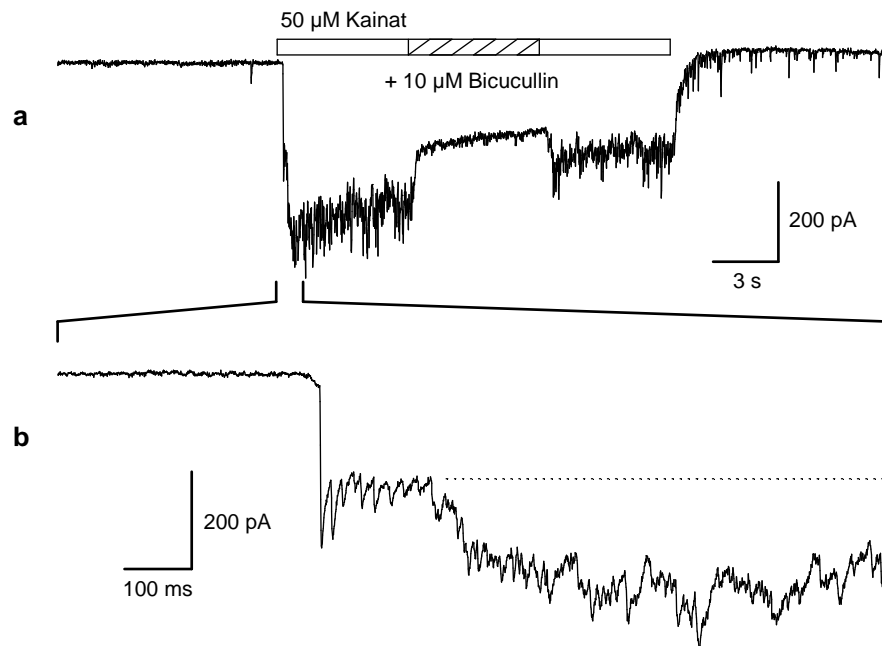


Abb. 43: Hemmung des kainatinduzierten Offset-Stroms durch Bicucullin (a). Bei Applikationsbeginn sind zwei Phasen zu erkennen (b): Die schnell einsetzenden quantalen sPSS werden nach ca. 150 ms durch einen weiteren Membranstrom überlagert, der im Verlauf der Applikation eine deutliche Desensitivierung zeigt (a) und Bicucullin-sensitiv ist.

Bei dem Offset-Strom handelte es sich offenbar um einen GABA-induzierten Membranstrom, der dem direkten kainatinduzierten Strom und den durch Kainat ausgelösten quantelten postsynaptischen Strömen überlagert war. Dafür sprechen drei Überlegungen:

1. In Abb. 43b ist zu erkennen, daß kurz nach Beginn der Kainatapplikation einige sPSS ausgelöst wurden, denen ein langsam zunehmender Offset-Strom überlagert wurde.
2. Der Strom war offenbar kein direkt durch Kainat induzierter Membranstrom an der untersuchten Zelle. Dagegen spricht die langsame Anstiegszeit des Offset-Stroms (200-500 ms) und die Tatsache, daß eine Stromdesensitivierung beobachtet werden konnte.
3. Die weitgehende Blockierung des Offset-Stroms durch 10 μ M Bicucullin legt eine Beteiligung von GABA oder Glycin als funktionellen Transmitter nahe. Daß es sich um

eine nahezu vollständige Blockierung handelte, zeigt die Reduktion der Stromfluktuationen auf ein Ausmaß wie bei den Kainatströmen (vgl. Abb. 15).

Ob es sich bei dem Offset-Strom um die Wirkung einer andauernden Transmitterfreisetzung handelte (nichtquantale Freisetzung) oder um die Überlagerung vieler singulärer Quantenereignisse, konnte nicht geklärt werden. Die Amplitude des Offset-Stroms betrug 100-200 pA (Abb. 43b). Dies entspräche im Mittel einer GABA-Konzentration zwischen 3 und 6 μM (Tab. 3) oder einer Glycin-Konzentration von 15-30 μM . Die nahezu vollständige Hemmung des Offset-Stroms durch bereits 10 μM Bicucullin ist ein starker Hinweis auf GABA als beteiligten Transmitter, da aus der Hemmkurve für GABA-Ströme bei dieser Bicucullin-Konzentration schon eine vollständige Hemmung zu ersehen ist (im Gegensatz zu Glycin-Strömen). Durch eine Bestimmung der Desensitivierungszeitkonstanten τ_D aus Abb. 43b kann mit Hilfe von Gl. 5 eine weitere Abschätzung für die Konzentration gemacht werden. Es ergibt sich $\tau_D = 17,7$ s und damit eine GABA-Konzentration von 5,3 μM . Dabei ist zu bedenken, daß dieser Wert für den Whole-cell-Strom gilt; wenn der Strom nur auf ein kleines Membranareal beschränkt war, muß die tatsächliche lokale Konzentration höher liegen.

4. Diskussion

Die Rezeptoren für GABA und Glycin sind aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der Regulierung zentraler synaptischer Aktivität schon seit drei Jahrzehnten im Blickpunkt elektrophysiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen. Die Beteiligung von hemmenden Transmittern bei bestimmten pathologischen Vorgängen macht diese Rezeptorsysteme für die Entwicklung von Substanzen interessant, die an ihnen spezifische pharmakologische Wirkungen zeigen.

Die bisherigen Kenntnisse über GABA- und Glycinrezeptoren wurden vorwiegend an Nagern und anderen Säugern gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit entsprechende Messungen an Neuronen aus dem Tectum opticum des embryonalen Hühnchens damit übereinstimmen. Durch die Möglichkeit, spontane Transmitterfreisetzung zu induzieren, konnte die synaptische Übertragung zwischen den Zellen in gewissen Grenzen studiert werden.

4.1 Elektrophysiologische Grundparameter

Eine Änderung des durchschnittlichen Ruhemembranpotentials von $E_M = -57$ mV mit dem Kultivierungsalter konnte bei den Zellen des Tectum opticum nicht festgestellt werden. Gewebekulturen mit Pyramidenzellen aus dem Rattencortex (McCormick & Prince, 1987), hippocampalen CA1-Neuronen der Ratte (Spigelman et al, 1992) und Cortexneuronen des embryonalen Hühnchens (Mori-Okamoto, 1983) zeigten hingegen im Laufe der Zeit eine deutliche Verschiebung von E_M zu negativeren Werten hin. Übereinstimmend mit den Pyramiden- und Hippocampuszellen nahm der spezifische Membranwiderstand R_M mit der Zeit ab und blieb dann ungefähr konstant bei $20 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$. Diese Abnahme kommt möglicherweise durch einen Anstieg der Ionenkanaldichte bei zunehmender Reifung der Zellen zustande. So würde eine Vermehrung von Kanälen, die in der Nähe des Ruhemembranpotentials normalerweise geöffnet sind (verantwortlich für die „leak“-Ströme), eine Verminderung von R_M bewirken. Der hohe Widerstand von unreifen Neuronen führt zu einer Vergrößerung der Längskonstante λ und unterstützt damit die elektrotonische Signalausbreitung. Dies könnte die funktionellen Zelleigenschaften in einem Entwicklungsstadium verbessern, in dem die synaptischen Verbindungen noch wenig entwickelt sind.

Die Bestimmung der spezifischen Membrankapazität ergab $C_M = 2,5 \text{ }\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$. Messungen an GH₃-Zellen lieferten unter der Annahme von sphärischen Zellen Werte zwischen 1 und $9 \text{ }\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Fernandez et al., 1984). Dies zeigt, daß die Bestimmung von C_M auch bei Zellen

mit scheinbar einfacher Geometrie problematisch ist, da Zellfortsätze wie Mikrovilli die Oberfläche stark vergrößern können.

Die charakteristischen Eigenschaften der untersuchten Aktionspotentiale waren denen junger corticaler Pyramidenzellen in einigen Punkten ähnlich. Ihre Dauer betrug zunächst ebenfalls 2,5 ms, nahm dann aber stärker ab, auf unter 1 ms. Die Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten waren gering ($\leq 100 \text{ V F}\cdot\text{s}^{-1}$) und vergrößerten sich später.

4.2 GABA- und glycininduzierte Membranströme

Die durch Glycin induzierten Ströme zeigten eine langsamere Anstiegszeit und stärkere, irreguläre Schwankungen als GABA-Ströme. Außerdem reagierten nicht alle Zellen auf Glycin, und es mußten meistens höhere Konzentrationen aufgewendet werden, um gleiche Stromamplituden wie durch GABA zu erhalten. Diese Beobachtungen stimmen mit den Eigenschaften GABA- und glycininduzierter Ströme überein, die bei Körnerzellen aus dem Rattencerebellum beschrieben worden sind (Kaneda et al., 1995). Hier waren nur 56 % der untersuchten Zellen für Glycin empfindlich, 100 % dagegen für GABA. Bei sättigenden Konzentrationen wiesen die GABA-induzierten Ströme eine 4-5 mal höhere Amplitude als Glycin-Ströme auf. Eine geringere Potenz von Glycin wird auch von Bipolarzellen der Kaninchenretina berichtet (Gilette & Dacheux, 1995).

Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die GABA-Konzentration, bei der halbmaximale Amplituden der induzierten Ströme auftraten, betrug im Mittel $EC_{50} = 22,4 \mu\text{M}$, unabhängig vom Alter der untersuchten Zellen. Dies liegt beim Vergleich mit anderen Präparaten in einem mittleren Bereich. Die EC_{50} -Werte für GABA_A-vermittelte Ströme streuen jedoch relativ stark zwischen 1 und 80 μM , allein für kultivierte cerebelläre Körnerzellen liegen sie zwischen 2 und 20 μM (vgl. Choi & Fischbach, 1981; Kaneda et al., 1995). Dies macht deutlich, daß der immensen potentiellen Variabilität der Rezeptorstruktur, verursacht durch die Existenz verschiedener Subtypen der Untereinheiten und der Möglichkeit des alternativen Splicens, eine ebenso große Variabilität von pharmakologischen Rezeptoreigenschaften entsprechen dürfte (Sigel et al., 1990). Das mag nicht nur im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen regionalen Exprimierung gelten, sondern auch für die zeitliche Entwicklung im Verlauf der Ontogenese, was möglicherweise die beobachtete Steigerung der Glycinempfindlichkeit bei den Tectumzellen erklärt: Für junge Zellen lag der EC_{50} um 150 μM und nahm bis zu einem Kulturalter von 14 Tagen auf ca. 70 μM ab. Für Glycinrezeptoren aus dem Rückenmark von Nagern wurde ein unterschiedliches pharmakologisches Verhalten neonataler bzw. adulter Formen beschrieben, insbesondere was die Strychninaffinität betrifft (Betz, 1991).

Hippocampusneurone der Ratte zeigten ab einem postnatalen Alter von einer Woche eine verringerte glycininduzierte Änderung der Membranleitfähigkeit (Ito & Cherubini, 1991).

Die Hillkoeffizienten n der Dosis-Wirkungs-Kurven von GABA und Glycin betragen 1,7 und 2,4. Unter der Annahme einer kooperativen Bindung sind somit mindestens 2 Moleküle GABA bzw. Glycin notwendig, um die entsprechenden Rezeptor-Komplexe zu aktivieren. Auch hier wurden größere Unterschiede berichtet: Die Hillkoeffizienten für GABA schwanken in verschiedenen Modellsystemen zwischen 0,9 und 3,5, für Glycin zwischen 1,0 und 3,0. Als Ursache für diese Diskrepanzen wird unter anderem die unterschiedliche Geschwindigkeit bei der Substanzapplikation gesehen: Der Hillkoeffizient steigt mit größer werdender Applikationsgeschwindigkeit (Gilbertson et al., 1991).

Desensitivierung

Eine Abhängigkeit der Stromdesensitivierung von der GABA-Konzentration wurde z.B. in Hippocampus-Zellkulturen der Ratte (Oh & Dichter, 1992) und sensorischen Froschneuronen (Akaike et al., 1986) gefunden. Wie bei den Zellen des Tectum opticum, genügte hier meist eine Zeitkonstante zur Beschreibung des Stromverlaufs. Beim Tectum opticum lagen die τ_D -Werte jedoch bei gleichen Konzentrationen geringfügig höher. Messungen in der Outside-out-Konfiguration an Hippocampusneuronen des Meerschweinchens ergaben bei Konzentrationen über 20 μM GABA bis zu drei Zeitkonstanten, deren Längen jedoch von der Konzentration unabhängig waren (Celentano & Wong, 1994). Bei diesen Experimenten konnte die geringe Substanzaustrauschzeit (< 1 ms) des verwendeten Perfusionssystems voll genutzt werden, da nur ein kleiner isolierter Membranfleck untersucht wurde. Verzögerungen des Stromanstiegs dürften hingegen bei Messungen in der Whole-cell-Konfiguration auftreten, da hierbei nicht alle Zellbereiche sofort mit einer gewünschten Konzentration perfundiert werden können. Dadurch ist es nicht möglich, schnelle Stromdesensitivierungsvorgänge zu erfassen. Obwohl dieses Problem vermutlich auch bei den vorliegenden Messungen eine Rolle spielte, zeigt doch die schnelle Anstiegszeit der AMPA-induzierten Membranströme (20-30 ms), daß die Geschwindigkeit des Substanzaustrauschs mit der verwendeten Perfusionsnadel ausreichend war, um zumindest Zeitkonstanten im Bereich von mehreren zehn bis hundert Millisekunden erfassen zu können. Die Erklärung für das fast völlige Fehlen kurzer τ_D -Werte könnte eine zu geringe GABA-Konzentration sein. Möglicherweise werden nur bei sehr hohen GABA-Konzentrationen eventuell vorhandene niedrigaffine Bindungsstellen des Rezeptors aktiviert, die zu einem transienten Strom führen. Andererseits gibt es Hinweise darauf, daß die verschiedenen Desensitivierungsphasen unterschiedlichen Rezeptorpopulationen zuzuordnen sind (Cash & Subbarao, 1987).

Bei retinalen Ganglienzellen von Nagern und sensorischen Froschneuronen ist die Stromdesensitivierung vom Membranpotential unabhängig (Tauck et al, 1988; Akaike et al., 1986). Zellen aus dem Rattenhippocampus zeigten dagegen sowohl eine Abhängigkeit vom Potential als auch vom Kulturalter (Oh & Dichter, 1992). Die ermittelten Zeitkonstanten verringerten sich mit fortlaufender Kultivierung z.T. um den Faktor 3. Bei den Tectumzellen wurde das Alter nicht berücksichtigt, so daß Gl. 5 entsprechend kritisch gehandhabt werden sollte.

Bei Rückenmarksneuronen embryonaler Hühnchen wurde eine zeitabhängige Verstärkung der Stromdesensitivierung beobachtet, die möglicherweise unabhängig von einem „run-down“ der GABA-Ströme ist (Gyenes et al., 1988).

Die minimal notwendige Wartezeit zwischen zwei GABA-Applikationen (6,25 μ M), um bei Tectumzellen eine kumulative Stromdesensitivierung zu vermeiden, betrug ca. 30 s. In einem ähnlichen Experiment an Froschneuronen wurde nach vollständiger Stromdesensitivierung durch eine 3minütige GABA-Applikation die Erholung der Ströme untersucht (Akaike et al., 1986). Nach ca. einer Minute war die ursprüngliche Stromamplitude wiederhergestellt.

Als Ursache der Stromdesensitivierung der GABA-Ströme scheidet bei den durchgeführten Messungen eine Chlorid-Akkumulation aus, da Chlorid symmetrisch intra- und extrazellulär verteilt war. Es muß sich daher um eine Abnahme der Kanalleitfähigkeit, also eine Rezeptordesensitivierung gehandelt haben. Letzteres wurde an retinalen Ganglienzellen von Nagern und an Rückenmarksneuronen des embryonalen Hühnchens gefunden (Tauck et al., 1988; Gyenes et al., 1988).

Umkehrpotential

Eine Übereinstimmung des Umkehrpotentials von GABA- und Glycinströmen mit dem theoretisch errechneten Nernstpotential für Chloridionen wird in vielen Fällen berichtet (vgl. Kaneda et al., 1995; Tauck et al., 1988; Bähring et al., 1994) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Widersprüchliche Ergebnisse gibt es jedoch im Hinblick auf den Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie. Manche Autoren finden statt eines linearen Zusammenhangs eine Auswärtsgleichrichtung („outward-rectification“) der Membranströme, was auf eine spannungsabhängige Aktivierung der Ionenkanäle hinweisen würde. Ein Vergleich von Messungen am selben Präparat zeigte, daß die Auswertung von Stromamplituden, induziert durch voneinander getrennte kurzzeitige Applikationen, eine lineare Beziehung liefert, während die Verwendung von Spannungsrampen eine Gleichrichtung ergibt (Kaneda et al., 1995). Für den Gleichrichtungseffekt ergäbe sich eine alternative Erklärung, wenn berücksichtigt wird, daß die Desensitivierung des Plateaustroms bei negativerem Potential verstärkt ist. Damit entstünde der nichtlineare Strom-

Spannungsverlauf durch eine relative Reduzierung des Stroms bei negativen bzw. eine Vergrößerung bei positiven Potentialen (Tauck et al., 1988). Bei den untersuchten Zellen konnte ein solcher Gleichrichtungseffekt in schwach ausgeprägter Form beobachtet werden, allerdings fast ausschließlich bei GABA-Strömen. Dieser Unterschied zwischen GABA und Glycin und die Verwendung von Konzentrationen, die nur eine geringe Stromdesensitivierung auslösten, läßt eine tatsächlich spannungsabhängige Aktivierung nur der GABA-aktivierten Kanäle als möglich erscheinen.

Antagonistenwirkung

Für die hemmende Wirkung von Bicucullin bzw. Strychnin auf GABA- bzw. Glycinströme konnte am Tectum opticum eine hohe Spezifität gefunden werden. Dies wird durch Messungen an verschiedenen Präparaten bestätigt. Für Hippocampusneurone der Ratte ergab sich bei einer Schild-Analyse der Strychnin-Glycin-Interaktion eine Hemmkonstante $K_i = 350$ nM (Ito & Cherubini, 1991). Körnerzellen aus dem Cerebellum zeigten bei Kreuzblockexperimenten Stromreduktionen, die in etwa den ermittelten Hemmkurven in Abb. 36 und Abb. 37 entsprechen (Kaneda et al., 1995). Auch die IC_{50} -Werte von Nucleus-basalis-Neuronen für die vier Kombinationen von GABA / Glycin - Bicucullin / Strychnin lagen sehr nahe an den Werten für die Tectumzellen.

Erstaunlich war die relativ große Effektivität, mit der im Tectum opticum Glycinströme durch Bicucullin, und in noch stärkerem Maß GABA-Ströme durch Strychnin gehemmt werden konnten. In retinalen Ganglienzellen von Nagern führten 50 bzw. 20 μ M Strychnin zur fast vollständigen Blockade eines durch 10 bzw. 20 μ M GABA ausgelösten Membranstroms (Bähring et al., 1994; Tauck et al., 1988). Die Autoren schließen daraus, daß Strychnin nicht ausschließlich für Glycinrezeptoren spezifisch ist und dadurch verschiedene Untersuchungen falsch interpretiert worden sind. So wurde aus Experimenten mit hohen Strychnin-Dosen geschlossen, daß Glycin in den Schichten 2-3 des visuellen Cortex Hemmung vermittelt, ohne daß es dort Hinweise auf ein Vorkommen von Glycin als Transmitter gab (Ebersole & Chatt, 1985). Es fällt auf, daß die Strychninempfindlichkeit von GABA-Rezeptoren an Zellen gefunden wurde, die zu Strukturen des optischen Systems gehören (Retina, Tectum opticum / visueller Cortex). Möglicherweise sind diese Rezeptoren gerade ein Spezifikum des optischen Systems.

Bei Muskelpräparaten des Flußkrebsses wurde ein unspezifischer Cl^- -Kanal gefunden, der durch Acetylcholin, Glutamat und GABA aktivierbar und u.a. durch Curare, Atropin und Picrotoxin blockierbar war (Zufall et al., 1988). Dies spricht für gemeinsame Eigenschaften der Liganden-Rezeptor-Interaktion einiger ligandenaktivierter Ionenkanäle. Das zeigt auch die große strukturelle Ähnlichkeit der $GABA_A$ -, Glycin-, Glutamat-, und nikotinischen Acetylcholinrezeptoren. Möglicherweise gab es einen „Vorläuferrezeptor“ in der phylo-

genetischen Entwicklung, der für alle vier Transmitter und / oder die entsprechenden Antagonisten sensitiv war. Es wäre denkbar, daß ein solcher unspezifischer Rezeptor auch in der ontogenetischen Entwicklung in Erscheinung tritt. Eventuell hat die Strychninempfindlichkeit der GABA-Rezeptoren im Tectum opticum ihre Ursache in der Verwendung von embryonalen Zellen.

Modulatoren

Nach dem Durchbrechen der Zellmembran zur Etablierung der Whole-cell-Konfiguration kommt es durch Diffusionsvorgänge zu einem Auswaschen intrazellulärer Faktoren. Dem Vorteil, die ionale Zusammensetzung in der Zelle definieren zu können, steht ein möglicher Verlust von Komponenten gegenüber, die z.B. zur Aufrechterhaltung eines zu untersuchenden Membranstroms benötigt werden. Andererseits kann auf diese Weise genau bestimmt werden, welche intrazellulären Bedingungen für die Aufrechterhaltung des Stromes wichtig sind.

Bei Rückenmarksneuronen embryonaler Hühnchen führte die wiederholte GABA-Applikation in Konzentrationen, die eine starke Stromdesensitivierung verursachten, zu einer fortlaufenden Verringerung der Stromamplitude (Gyenes et al., 1988). Durch die Verwendung von ATP in der intrazellulären Lösung oder durch die Verwendung einer GABA-Konzentration, bei der nur eine geringe Stromdesensitivierung eintrat, konnte ein „run-down“ verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der verwendeten Standardkonzentration von 6,25 μM GABA nur eine geringe Stromdesensitivierung beobachtet. Dies erklärt den geringen gemessenen „run-down“ der GABA-Stromamplituden. (Abb. 3.32).

Die Zugabe des Protein Kinase C-Aktivators PMA führte zu einem verstärkten „run-up“ der glycininduzierten Ströme. Der gleiche Effekt wurde bei Hippocampuszellen der Ratte beobachtet (Schönrock & Bormann, 1995). Bei diesen Glycinrezeptoren gibt es also vermutlich eine Phosphorylierungsstelle, die durch PKC beeinflusst werden kann. Konsensussequenzen für die Wirkung von PKA, PKC oder Tyrosinkinase wurden auf den Untereinheiten von GABA- und Glycinrezeptoren gefunden (vgl. auch McKernan & Whiting, 1996).

Eine direkte Beeinflussung der GABA-induzierten Ströme durch Ethanol konnte festgestellt werden. Allerdings äußerte sich diese in einer hemmenden, statt in einer stimulierenden Wirkung, wie verschiedentlich berichtet wurde. Ethanol in geringen Konzentrationen (1-50 mM) potenzierte den Effekt von GABA (Reynolds et al., 1992).

Spontane postsynaptische Ströme (sPSS)

Durch Kainat konnten in den untersuchten Zellen des Tectum opticum sPSS ausgelöst werden. Die großen Stromamplituden (einige hundert pA) weisen darauf hin, daß es sich dabei um die synchronisierte Freisetzung mehrerer synaptischer Vesikel handelte. Dies zeigte sich auch durch das vereinzelte Auftreten mehrgipfliger Amplitudenverteilungen mit einer Grundeinheit von ca. -30 pA. Wie gut die Synchronisation erfolgte, und inwieweit es sich dabei um durch Aktionspotentiale induzierte Ströme handelte, wurde nicht weiter untersucht. Offenbar scheint Kainat die Wahrscheinlichkeit für die Auslösung von sPSS erhöht zu haben. Dies folgt aus der Fähigkeit von Kainat, Ionenkanäle für Na⁺- und K⁺-Ionen zu öffnen und damit die präsynaptische Membran zu depolarisieren (Kandel, 1991). Die Applikation von GABA oder Glycin führte nur sehr selten zu einer (geringfügigen) sPSS-Induktion; in einigen Fällen konnte die Hemmung von sPSS beobachtet werden. Dies bedeutet, daß die Adult-Funktion dieser Transmitter, nämlich die Vermittlung von Hemmung, in den kultivierten Tectumzellen überwiegt - im Gegensatz zu einer erregenden Funktion z.B. durch ein verschobenes Cl⁻-Gleichgewichtspotential (Cherubini et al., 1991).

Bei der Untersuchung von Nucleus-basalis-Neuronen der Ratte (Akaike et al., 1992) wurden sPSS durch eine Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration ausgelöst. Wie durch Experimente zur Bicucullin- und Strychninhemmung dieser sPSS (ähnlich den hier durchgeführten) festgestellt wurde, waren diese ebenfalls GABAerg.

Durch Stimulation synaptisch verbundener, kultivierter Neurone aus dem Colliculus superior der Ratte (Kraszewski & Grantyn, 1992), konnten sPSS mit einer mittleren Amplitude von -130 pA induziert werden. Die Zeitkonstante des Abfalls der sPSS war mit 34 ms ca. doppelt so groß wie bei den Messungen an Tectumneuronen. Die Häufigkeitsverteilung der sPSS war ebenfalls mehrgipflig, jedoch mit einer Grundamplitude -7 pA, die damit viermal kleiner war als bei den Zellen des Tectum opticum. Die Ursache für diese große Differenz blieb unklar. Bei den Experimenten an den Rattenneuronen konnten mit Hilfe von Tetrodotoxin die durch präsynaptische Aktionspotentiale ausgelösten sPSS blockiert werden, so daß nur noch die unsynchronisierten Ereignisse gemessen wurden. Diese hatten eine Amplitude von ca. -8 pA, entsprachen also der zuerst festgestellten Grundamplitude.

An Neuronen des Tectum opticum konnte möglicherweise auch eine kainatinduzierte nichtquantale Komponente der Freisetzung von hemmendem Überträgerstoff nachgewiesen werden. Eine nichtquantale Freisetzung von GABA wurde auch von cerebellären Körnerzellen berichtet (Kaneda et al., 1995). Inwieweit sie zur Informationsverarbeitung im ZNS beiträgt, ist unklar.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu GABA- und glycininduzierten Membranströmen an kultivierten Neuronen aus dem Tectum opticum (E8) des embryonalen Hühnchens durchgeführt. Tectumneurone weisen bereits zu einem frühen Kultivierungsstadium funktionelle Rezeptoren für GABA und Glycin auf, die pharmakologisch unterschieden werden können. Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ◆ Für Glycin wurden bei Zellen bis zum 4. Kulturtag halbmaximale Membranströme (EC_{50}) von ca. 160 μ M ermittelt. Im Verlauf der Kultivierung nahm die Rezeptoraffinität der Zellen für Glycin signifikant um das Doppelte zu. Der EC_{50} -Wert lag für Zellen älter als 4 Tage bei ca. 70 μ M.
- ◆ Für GABA konnte bis zu einem Kultivierungsalter von 4 Wochen keine signifikante Veränderung der Rezeptoraffinität festgestellt werden. Die EC_{50} -Werte schwankten zwischen 10 und 30 μ M.
- ◆ Das Umkehrpotential der GABA- und glycininduzierten Membranströme änderte sich mit der Chloridkonzentration und war mit dem Nernstpotential für Chloridionen identisch.
- ◆ Die Desensitivierungszeitkonstante τ_D der GABA-Ströme korrelierte mit der verwendeten GABA-Konzentration. Die Kenntnis von τ_D erlaubte somit eine Abschätzung der korrespondierenden GABA-Konzentration.
- ◆ Die Hemmkonstante K_i (modifiziert nach Cheng-Prusoff) für Strychnin an GABA-Strömen war ähnlich hoch wie für Bicucullin (11 bzw. 3 μ M). Diese unspezifische Hemmung ist möglicherweise eine Eigenschaft des optischen Systems. Dennoch war die Bindung von Strychnin an Glycin spezifischer ($K_i = 76$ nM) als Bicucullin-Glycin ($K_i = 190$ μ M). Picrotoxin blockierte den offenen Chloridkanal des GABA- und Glycinrezeptors. Die IC_{50} -Werte betragen 6 μ M (bei 6,25 μ M GABA) und 37 μ M (50 μ M Glycin).
- ◆ Ein weiteres Indiz für getrennte GABA- und Glycinrezeptoren war die unterschiedliche zeitliche Änderung der Stromamplituden und ihre Beeinflussung durch PMA.
- ◆ Pentobarbital zeigte als schwacher GABA-Agonist eine langsam mit der Konzentration zunehmende Eigenwirkung. Die modulatorische Wirkung von Pentobarbital (Verstärkung des GABA-Stroms), nahm im Verlauf der Perfusion ab.
- ◆ Durch Kainat konnten quantale postsynaptische Ströme induziert werden, die GABA-spezifisch blockierbar waren. Gleichzeitig wurden möglicherweise nichtquantale Ströme beobachtet, die offenbar ebenfalls durch GABA (ca. 5 μ M) induziert waren.

6. Literaturverzeichnis

- Akaike N, Harata N, Ueno S, Tateishi N (1992) GABAergic synaptic current in dissociated nucleus basalis of Meynert neurones of the rat. *Brain Res*, 570:102-108
- Akaike N, Inoue M, Krishtal OA (1986) Concentration-clamp study of γ -aminobutyric acid-induced chloride current kinetics in frog sensory neurons. *J Physiol (Camb)*, 379:171-185
- Bähring R, Standhardt H, Martelli EA, Grantyn R (1994) GABA-activated chloride currents of postnatal mouse retinal ganglion cells are blocked by acetylcholine and acetylcarnitine: How specific are ion channels in immature neurons? *Eur J Neurosci*, 6:1089-1099
- Barry PH (1994) JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Meth*, 51:107-116
- Betz H (1991) Glycine receptors: heterogenous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci*, 14:458-461
- Betz H, Becker C-M (1988) The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein. *Neurochem Int*, 13:137-146
- Biedermann B, Pannicke T, Francke M, Reichelt W (1996) GABA receptors on isolated primate Müller cells. Abstracts des 1. Kongresses der neurowissenschaftlichen Gesellschaft in Berlin, Spektrum, 1996, p 217
- Bormann J (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci*, 11:112-116
- Bormann J, Feigenspan A (1995) GABA_C receptors. *Trends Neurosci* 18:515-519
- Cash DJ, Subbarao K (1987) Desensitization of γ -aminobutyric acid receptor from rat brain: two distinguishable receptors on the same membrane. *Biochemistry*, 26:7556-7562
- Celentano JJ, Wong RKS (1994) Multiphasic desensitization of the GABA_A receptor in outside-out patches. *Biophysical Journal*, 66:1039-1050
- Cheng Y-C, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, 22: 3099-3108

- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515-519
- Choi DW, Fischbach GD (1981) GABA conductance of chick spinal cord and dorsal root ganglion neurones in cell culture. *J Neurophysiol*, 45:605-620
- Craig DA (1993) The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation. *Trends Pharmacol Sci*, 14:89-91
- Dudel J, Finger W, Stettmeier H (1980) Inhibitory synaptic channels activated by γ -aminobutyric acid (GABA) in crayfish muscle. *Pflügers Arch*, 387:143-151
- Ebersole JS, Chatt AB (1985) Differences between strychnine and penicillin epileptogenesis suggest a laminar organization of neocortical inhibition. *Brain Res* 340:390-396
- Föhr KJ, Schirm T, Finger W (1995) NMDA-induced whole-cell currents and single channel conductances in tectal neurons during two stages of early development of chicken. *Neurosci Lett* 183:87-90
- Feigenspan A, Bormann J (1994) Facilitation of GABAergic signaling in the retina by receptors stimulating adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:10893-10897
- Feigenspan A, Wässle H, Bormann J (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl^- channels in rat retinal bipolar cells. *Nature*, 361:159-161
- Fernandez JM, Fox AP, Krasne S (1984) Membrane patches and whole-cell membranes: A comparison of electrical properties in rat clonal pituitary (GH_3) cells. *J Physiol*, 356:565-585
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velzquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995) GABA_A /Benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 15:2720-2732
- Gilbertson TA, Borges S, Wilson M (1991) The effects of glycine and GABA on isolated horizontal cells from the salamander retina. *J Neurophysiol*, 66: 2002-2013
- Gillette MA, Dacheux RF (1995) GABA- and Glycine-activated currents in the rod bipolar cell of the rabbit retina. *J Neurophysiol*, 74:856-875
- Gurley D, Amion J, Ross PC, Weiss DS, White G (1995) Point mutations in the M2 region of the α , β , or γ subunit of the GABA_A channel that abolish block by picrotoxin. *Receptors and channels*, 3:13-20

- Gyenes M, Farrant M, Farb DH (1988) "Run-down" of γ -aminobutyric acid_A receptor function during whole-cell recording: a possible role for phosphorylation. *Mol Pharmacol*, 34:719-723
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 391:85-100
- Hille B (1992) *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer
- Inoue M, Akaike N (1988) Blockade of γ -aminobutyric acid-gated chloride current in frog sensory neurons by picrotoxin. *Neurosci Res*, 5:380-394
- Ito S, Cherubini E (1991) Strychnine-sensitive glycine responses of neonatal rat hippocampal neurones. *J Physiol*, 440:67-83
- Johnston GAR (1986) Multiplicity of GABA receptors. *Benzodiazepine/GABA Receptors and Chlorid Channels: Structural and Functional Properties*, Alan R Liss, Inc
- Kaila K (1994) Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 42:489-537
- Kaneda M, Farrant M, Cull-Candy SG (1995) Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *J Physiol*, 485:419-435
- Korpi ER, Kleingoor C, Kettenmann H, Seeburg PH (1993) Benzodiazepine-induced motor impairment linked to point mutation in cerebellar GABA_A receptor. *Nature* 361:356-359
- Kraszewski K, Grantyn R (1992) Unitary, quantal and miniature GABA-activated synaptic chloride currents in cultured neurons from the rat superior colliculus. *Neurosci*, 47:555-570
- Lazareno S, Birdsall NJM (1993) Estimation of antagonist K_b from inhibition curves in functional experiments: alternatives to the Cheng-Prusoff equation. *Trend Pharmacol Sci*, 14:237-239
- Leff P, Dougall IG (1993) Further concerns over Cheng-Prusoff analysis. *Trend Pharmacol Sci*, 14:110-112
- MacDonald RL, Olsen RW (1994) GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci*, 17:569-602

- McCormick DA, Prince DA (1987) Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J Physiol* 393:743-762
- McKernan RM, Whiting PJ (1996) Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19:139-143
- Mey J, Thanos S (1992) Development of the visual system of the chick - a review. *J Hirnforsch* 33:673-702
- Michler A (1990) Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. *Int J Devl Neurosci* 8:463-472
- Mierlak D, Farb DH (1988) Modulation of neurotransmitter receptor desensitization: chlordiazepoxide stimulates fading of the GABA response. *J Neurosci*, 8:814-820
- Mori-Okamoto J, Ashida H, Maru E, Tatsuno J (1983) The development of action potentials in cultures of explanted cortical neurons from chick embryos. *Dev Biol* 97:408-416
- Ng B, Barry PH (1995) The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *J Neurosci Methods* 56:37-41
- Numann R, Wong R (1984) Voltage clamp study an GABA response desensitization in single pyramidal cells dissociated from the hippocampus of adult guinea pigs. *Neurosci Lett*, 47:289-294
- Oh DJ, Dichter MA (1992) Desensitization of GABA-induced currents in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci*, 49:571-576
- Pastor A, Chvatal A, Sykova E, Kettenmann H (1995) Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord slice. *Europ J Neurosci*, 7:1188-1198
- Penner R (1995) A practical guide to patch clamping. Single channel recording, 2nd ed. Ed. Sakamnn B, Neher E. New York: Plenum
- Pusch M, Neher E (1988) Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Arch* 411:203-211
- Reynolds JN, Prasad A MacDonald JF (1992) Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur J Pharmacol*, 224:173-181
- Schönrock B, Bormann J (1995) Modulation of hippocampal glycine channels by protein kinase C. *NeuroReport*, 6:301-304

-
- Schirm T (1993) NMDA-induzierte Membran- und Einzelkanalströme in kultivierten Nervenzellen des Tectum opticum embryonaler Hühnchen. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen
- Schlosshauer B, Dütting D (1991) Intraretinal pathfinding of ganglion cell axons is perturbed by a monoclonal antibody specific for a G4/Ng-CAM-like cell adhesion molecule. *Dev Brain Res* 63:181-190
- Segal M, Barker JL (1984) Rat hippocampal neurons in culture: properties of GABA-activated Cl⁻ ion conductance. *J Neurophysiol*, 51:500-515
- Sieghart W (1995) Structure and Pharmacology of γ -Aminobutyric Acid_A Receptor Subtypes. *Pharmacol Rev*, 47:181-234
- Sieghart W (1992) GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trend Pharmacol Sci*, 13:446-450
- Sigel E, Baur R, Trube G, Möhler H, Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron*, 5:703-711
- Sivilotti L, Nistri A (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 36:35-92
- Smith GB, Olsen RW (1995) Functional domains of GABA_A receptors. *Trend Pharmacol Sci*, 16:162-168
- Song YS, Huang L-YM (1990) Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature*, 348:242-245
- Spigelman I, Zhang L, Carlen PL (1992) Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K⁺ currents. *J Neurophysiol* 68:55-69
- Stahl J-H (1995) Konstruktion und Fertigung einer 7-Kanal-Perfusionspipette zum schnellen Substanztausch an kultivierten Einzelzellen. Bericht zum II Praxissemester, Medizintechnik, FH Ulm
- Stelzer A, Kay AR, Wong RKS (1988) GABA_A-receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 241:334-343
- Study RE, Barker JL (1981) Diazepam and (-)pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of γ -aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:7180-7184

-
- Suzdak PD, Glowa JR, Crawley JN, Schwartz RD, Skolnick P, Paul SM (1986) A selective Imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science* 234:1243-1247
- Tauk D, Frosch MP, Lipton SA (1988) Characterization of GABA- and glycine-induced currents of solitary rodent retinal ganglion cells in culture. *Neurosci*, 27:193-203
- Ticku MK (1990) Alcohol and GABA-benzodiazepine receptor function. *Ann Med*, 22:241-246
- Twyman RE, MacDonald RL (1992) Neurosteroid regulation of GABA_A receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *J Physiol*, 456:215-245
- Upton N (1994) Mechanisms of action of new antiepileptic drugs: rational design and serendipitous findings. *Trend Pharmacol Sci*, 15:456-463
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B (1990) Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend upon subunit composition. *Neuron*, 4:919-928
- Wafford KA, Whiting PJ (1992) Ethanol potentiation of GABA_A receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the $\gamma 2$ subunit. *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Lett*, 313:113-117
- Yoon KW, Covey DF, Rothman SM (1993) Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol (Camb)*, 464:423-439
- Young AB, Chu D (1990) Distribution of GABA_A and GABA_B receptors in mammalian brain: potential targets for drug development. *Drug Dev Res* 21:161-167
- Young AB, Snyder SH (1973) Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:2832-2836
- Zaman SH, Shingai R, Harvey RJ, Darlison MG, Barnard EA (1992) Effects of subunit types of the recombinant GABA_A receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmacol*, 225:321-330
- Zufall F, Franke C, Hatt H (1988) Acetylcholine activates chloride channel as well as glutamate and GABA. *J Comp Physiol A* 163:609-620

Herrn Prof. Dr. W. Finger möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die zahlreichen anregenden Diskussionen, die oft herausfordernden Knobeleyen gleichkamen, danken.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Dr. K.-J. Föhr, der mir praktisch in sehr vielen Dingen weiterhelfen konnte.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und Geduld danken, wenn es mal zeitlich eng wurde. Dies gilt insbesondere für meinen Bruder Johannes.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des NMI bedanke ich mich für das angenehme und bisweilen kurzweilige Betriebsklima.