

Charakterisierung von Glutamat-Rezeptoren bei Neuronen
im auditorischen Hirnstamm der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Harald Vitten
aus Koblenz

Frankfurt (2001)
(D F 1)

Vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Karl-Dieter Entian
Gutachter: Prof. Dr. Herbert Zimmermann, Prof. Dr. Eckhard Friauf
Datum der Disputation: 29.03.2001

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>1.1</u>	<u>ZIELE DER ARBEIT</u>	<u>7</u>
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>8</u>
<u>2.1</u>	<u>VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG</u>	<u>8</u>
<u>2.2</u>	<u>HERSTELLUNG DER HIRNSCHNITTE</u>	<u>8</u>
<u>2.3</u>	<u>MESSTECHNIK</u>	<u>9</u>
<u>2.4</u>	<u>STATISTIK</u>	<u>11</u>
<u>2.5</u>	<u>PHARMAKA UND PHARMAKAAPPLIKATION</u>	<u>11</u>
<u>3</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>13</u>
<u>3.1</u>	<u>ETABLIERUNG EINES MEHRKANAL-APPLIKATIONSSYSTEMS</u>	<u>13</u>
<u>3.1.1</u>	<u>DIE SCHLAUCHVENTILE</u>	<u>14</u>
<u>3.1.2</u>	<u>DIE APPLIKATIONSPIPETTE</u>	<u>16</u>
<u>3.1.3</u>	<u>FUNKTIONSÜBERPRÜFUNG DES APPLIKATIONSSYSTEMS</u>	<u>19</u>
<u>3.2</u>	<u>ANALYSE IONOTROPER GLUTAMAT-REZEPTOREN BEI LSO-NEURONEN</u>	<u>23</u>
<u>3.2.1</u>	<u>AMPA-EVOZIERTE STRÖME BEI LSO-NEURONEN</u>	<u>23</u>
<u>3.2.2</u>	<u>ALTERSABHÄNGIGKEIT VON AMPA-EVOZIERTEN STRÖMEN</u>	<u>25</u>
<u>3.2.3</u>	<u>KAINAT-EVOZIERTE STRÖME BEI LSO-NEURONEN</u>	<u>26</u>
<u>3.2.4</u>	<u>ALTERSABHÄNGIGKEIT VON GYKI-RESISTENTEN KAINAT-EVOZIERTEN STRÖMEN</u>	<u>29</u>
<u>3.2.5</u>	<u>DIE WIRKUNG SPEZIFISCHER KAINAT-REZEPTOR AGONISTEN</u>	<u>31</u>
<u>3.2.6</u>	<u>DER EINFLUSS VON CONCANAVALIN A AUF GLUTAMAT-EVOZIERTE STRÖME</u>	<u>34</u>
<u>3.3</u>	<u>ANALYSE IONOTROPER GLUTAMAT-REZEPTOREN BEI MNTB-NEURONEN</u>	<u>35</u>
<u>3.3.1</u>	<u>AMPA- UND KAINAT-EVOZIERTE STRÖME BEI MNTB-NEURONEN</u>	<u>35</u>
<u>3.3.2</u>	<u>ALTERSABHÄNGIGKEIT VON AMPA-EVOZIERTEN STRÖMEN UND GYKI-RESISTENTEN KAINAT-EVOZIERTEN STRÖMEN</u>	<u>37</u>
<u>3.3.3</u>	<u>DIE WIRKUNG DES SPEZIFISCHEN KAINAT-REZEPTOR AGONISTEN ATPA</u>	<u>38</u>
<u>3.3.4</u>	<u>DER EINFLUSS VON CONCANAVALIN A AUF GLUTAMAT-EVOZIERTE STRÖME</u>	<u>39</u>

4	<u>DISKUSSION</u>	41
4.1	<u>DAS APPLIKATIONSSYSTEM</u>	41
4.1.1	<u>VERGLEICH MIT ANDEREN APPLIKATIONSSYSTEMEN</u>	44
4.2	<u>IONOTROPE GLUTAMAT-REZEPTOREN BEI LSO- UND MNTB-NEURONEN</u>	46
4.2.1	<u>FUNKTIONELLE AMPA-REZEPTOREN BEI LSO- UND MNTB-NEURONEN</u>	46
4.2.2	<u>FUNKTIONELLE KAINAT-REZEPTOREN BEI LSO- UND MNTB-NEURONEN</u>	50
4.2.3	<u>ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN</u>	55
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	57
5.1	<u>DAS APPLIKATIONSSYSTEM</u>	57
5.2	<u>IONOTROPE GLUTAMAT-REZEPTOREN BEI LSO- UND MNTB-NEURONEN</u>	58
6	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	59
7	<u>LITERATUR</u>	60

1 Einleitung

"Pongileonis Trompeten und das Streichen ungenannter Geiger haben die Luft in der großen Halle erschüttert und das Glas der Fenster zum Vibrieren gebracht. Das wiederum hat die Luft in Lord Edward's Appartement auf der anderen Seite zum Beben gebracht. Die bebende Luft erschütterte Lord Edward's *Membrana tympani*. Die Mittelohrknöchelchen *Hammer*, *Amboß* und *Steigbügel* wurden in Bewegung gesetzt, um die winzige Membran des ovalen Fensters zu bewegen und einen winzigen Flüssigkeitssturm im Labyrinth zu erzeugen. Die haarigen Endigungen des Hörnervs schaukelten wie Seegras in rauer See. Eine riesige Anzahl verborgener Wunder fand im Gehirn statt, und Lord Edward flüsterte ekstatisch <BACH!> " (Huxley, 1928).

Diese ebenso eindrucksvolle wie humorvolle Schilderung der Vorgänge, die Lord Edward die Wahrnehmung <BACH!> ermöglichen, lässt die Komplexität der am Hörvorgang beteiligten Prozesse erahnen. In der Tat zeichnet sich das auditorische System durch eine sehr große Komplexität, bei einem gleichzeitig hohen Grad an Ordnung, aus. Ursache der großen Komplexität ist die mehrkanalige Parallel-Verarbeitung von Information im auditorischen System, sowie die im Vergleich mit anderen sensorischen Systemen große Anzahl an Verarbeitungsebenen (Irvine, 1986; Helfert et al., 1991). Gleichzeitig ist das auditorische System, wie alle sensorischen Systeme, topographisch aufgebaut und dementsprechend hochgradig geordnet. Unter Topographie versteht man die räumlich benachbarte Abbildung und Verarbeitung von Information, die räumlich, zeitlich oder inhaltlich in einem engen Zusammenhang steht. Im Fall des auditorischen Systems spricht man von Tonotopie, da hier der Ort der Verarbeitung eines Schallereignisses durch seine Frequenz bestimmt wird.

Dank intensiver Forschung ist der Anteil der "verborgenen Wunder" kontinuierlich gesunken. So ist z.B. heute sehr genau bekannt, wie die vom Innenohr (Cochlea) in neuronale Erregung transduzierte Schallinformation über die Kerngebiete des Hirnstamms *Nucleus cochlearis*, *Olivia superior*, *Nucleus lemniscus lateralis*, *Colliculus inferior* und *Corpus geniculatum mediale* zum auditorischen Cortex weitergeleitet und verrechnet wird.

Das große Interesse, das die Wissenschaft dem auditorischen System entgegenbringt, liegt in der enormen sozialen Bedeutung des Hörsinnes, und den dementsprechend großen Anstrengungen die unternommen werden, um ihn bei Beschädigung wieder herzustellen oder

zumindest zu verbessern, begründet. So betragen die volkswirtschaftlichen Kosten der Behandlung von Hörschädigungen allein in den Vereinigten Staaten von Amerika, mit ca. 30 Millionen Betroffenen, über 56 Milliarden Dollar jährlich (Dana Allianz for Brain Initiatives, 1996).

Weiterhin ist das große Interesse der Wissenschaft am auditorischen System auf das System selbst, mit seinen z.T. spektakulären Leistungen zurückzuführen: So liegt z.B. der vom Menschen wahrnehmbare Frequenzbereich zwischen 20 Hz und 20 kHz, was, verglichen mit dem visuellen System, einer 1000fach größeren Bandbreite entspricht (Hudspeth, 1997).

Eine weitere bedeutende Eigenschaft des auditorischen Systems ist das Richtungshören. Das Richtungshören beruht vor allem auf der Fähigkeit des neuronalen Apparates, Laufzeit- und Intensitätsunterschiede zwischen den beiden Ohren wahrzunehmen. Dies wird durch spezielle neuronale Verschaltungen ermöglicht, die Informationen von beiden Ohren miteinander vergleichen. So beträgt das menschliche Auflösungsvermögen für die Lokalisation von Schallquellen in der Ebene ca. 2° , was einer Zeitdifferenz von $11 \mu\text{s}$ und einer Intensitätsdifferenz von 1 dB zwischen den beiden Ohren entspricht (Schmidt, 1995; Oertel, 1997). Um solch geringe Laufzeit- und Intensitätsunterschiede detektieren zu können, besitzen Neurone des auditorischen Systems verschiedene synaptische und biophysikalische Spezialisierungen. Einige der Neurone bilden sogenannte Calyces aus, das heißt, ihre Axonterminalen umhüllen einen Großteil der postsynaptischen Neurone (Friauf und Ostwald, 1988; Guinan und Li, 1990). Andere Neurone zeichnen sich durch ungewöhnlich schnelle AMPA-Rezeptoren und Kalium-Kanäle mit sehr geringer Aktivierungsschwelle aus (Oertel, 1997; Trussell, 1997; Trussell 1999). Alle diese Spezialisierungen dienen dazu, eine sichere und zeitlich akkurate synaptische Transmission zu gewährleisten.

Bei Ratten findet, wie bei den meisten Mammaliern, die Verrechnung von Intensitäts- bzw. Laufzeitunterschieden zwischen den beiden Ohren erstmals im Superioren Oliven Komplex (SOC) des auditorischen Hirnstammes statt. Der SOC besteht aus mehreren Kernen, von denen die Mediale Superiore Olive (MSO) vorwiegend der Verrechnung von Laufzeitunterschieden dient (Masterton, 1975; Smith, 1995). Dagegen dient die Laterale Superiore Olive (LSO) hauptsächlich der Prozessierung von Intensitätsunterschieden (Joris, 1996; Park et al., 1996; Park et al., 1997). Ermöglicht wird dies durch die spezielle Verschaltung der LSO-Neurone (Abb. 1): Die Neurone der LSO erhalten sowohl exzitatorischen, glutamatergen Eingang vom ipsilateralen Nucleus Cochlearis (CN) als auch inhibitorischen, glycinergen Eingang vom contralateralen CN via dem Medialen Nucleus des

Trapezkörpers (MNTB), der vorwiegend als Relaisstation dient (Boudreau und Tsuchitani, 1968; Tsuchitani, 1977; Kandler und Friauf, 1995a).

Die LSO stellt folglich ein ideales Modell-System dar, um die Wechselwirkung von inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen zu untersuchen. Da bei Ratten der Hörbeginn ca. 12 Tage nach der Geburt liegt (Uziel et al., 1981; Blatchley et al., 1987), die grundlegenden synaptischen Verbindungen aber bereits vor der Geburt angelegt werden und funktionell sind (Friauf und Kandler, 1990; Sanes und Siverls, 1991; Sanes, 1993; Kandler und Friauf, 1995a; Kotak und Sanes, 1995), bietet sich zusätzlich die Möglichkeit, ein reifendes neuronales System vor und nach dem Beginn der sensorischen Aktivität zu untersuchen.

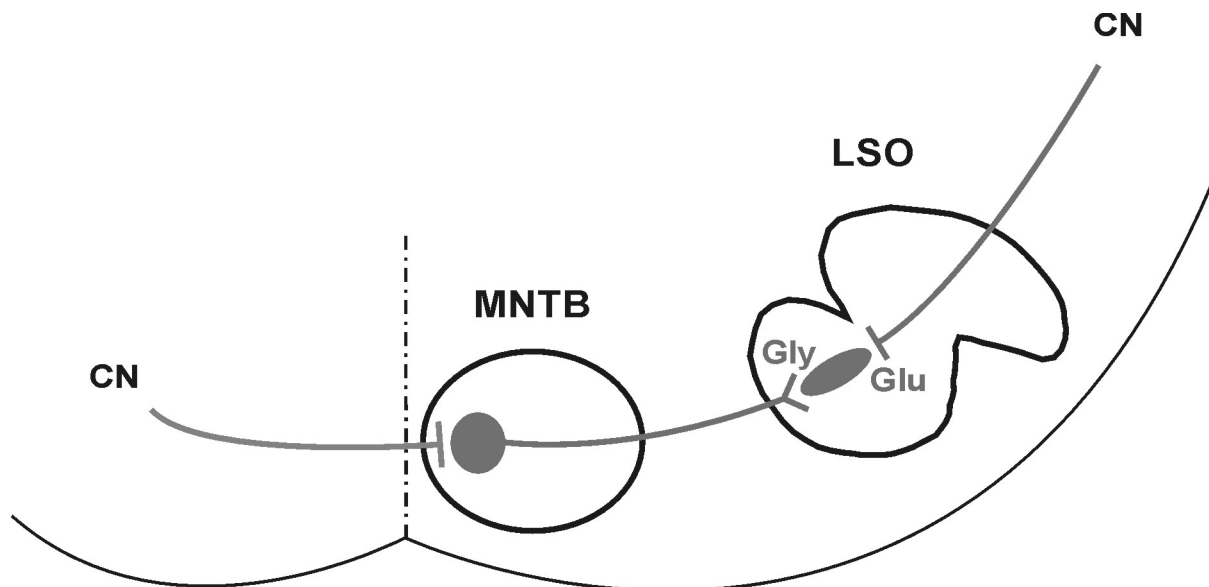


Abb. 1: Schematische Darstellung der LSO und ihrer Afferenzen. LSO-Neurone erhalten exzitatorische, glutamaterge Eingänge (Glu) vom ipsilateralen Nucleus cochlearis (CN) und inhibitorische, glycinerge Eingänge (Gly) vom Medialen Nucleus des Trapezkörpers (MNTB). Der MNTB erhält seinerseits exzitatorische, glutamaterge Eingänge vom contralateralen CN.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der ionotropen Glutamat-Rezeptoren auf LSO-Neuronen der Ratte. Zusätzlich wurden vergleichende Untersuchungen an MNTB-Neuronen durchgeführt.

Ionotrope Glutamat-Rezeptoren werden nach ihrer Aktivierbarkeit durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionat (AMPA) und (2S, 3S, 4S)-3-Carboxy-methyl-4-isopropenylpyrrolidine-2-carboxylic acid (Kainat), entsprechend

in NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren unterschieden (Abb. 2). AMPA- und Kainat-Rezeptoren werden auch als nonNMDA-Rezeptoren bezeichnet.

Aus elektrophysiologischen Untersuchungen war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt, dass LSO- und MNTB-Neurone sowohl Rezeptoren vom NMDA- als auch vom nonNMDA-Typ besitzen (Casparly und Faingold, 1989; Wu und Kelly, 1992a; Wu und Kelly, 1992b; Wu und Fu, 1998). Eine weitergehende Differenzierung der nonNMDA-Rezeptoren erfolgte im Rahmen dieser Studien jedoch nicht. Dementsprechend war bisher nicht bekannt, ob LSO- bzw. MNTB-Neurone AMPA-Rezeptoren oder Kainat-Rezeptoren besitzen.

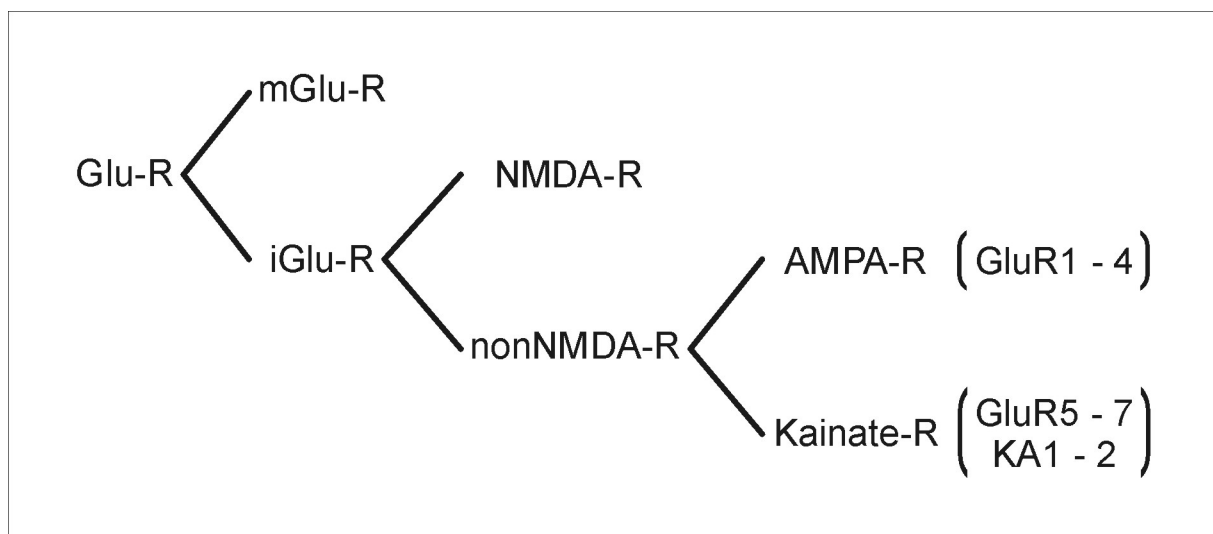


Abb. 2: Übersicht über die Einteilung der Glutamat-Rezeptoren. In Klammern sind die für AMPA- bzw. Kainat-Rezeptoren codierenden Gen-Familien angegeben. (m = metabotrop, i = ionotrop)

Die grundlegenden molekularbiologischen, biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von AMPA- und Kainat-Rezeptoren sind in zahlreichen Artikeln ausführlich dargestellt worden (Übersicht in: Seeburg, 1993; Seeburg, 1994; Hollmann und Heinemann, 1994; Bettler und Mülle, 1995; Ozawa et al., 1997; Bleakman und Lodge, 1998).

Kainat-Rezeptoren werden von zwei Genfamilien, der Familie GluR5 bis 7 und der Familie KA1 und KA2 codiert. Diese Genfamilien codieren für Untereinheiten der Kainat-Rezeptoren, die sich sowohl in ihrer Sequenz-Homologie als auch in ihrer Affinität zu [³H]Kainat unterscheiden. Die niedrig-affinen Untereinheiten GluR5 bis 7 sind zu 75% - 80% homolog, während die hoch-affinen Untereinheiten KA1 und KA2 zu ca. 70% homolog sind. Als Mitglieder der Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren zeigen die Untereinheiten der Kainat-Rezeptoren eine ca. 40%ige Sequenz-Homologie zu den AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR1 bis 4, die untereinander wiederum zu ca. 70% homolog sind.

Wie alle ionotropen Glutamat-Rezeptoren zeichnen sich auch die Kainat-Rezeptor Untereinheiten durch eine große extrazellulär gelegene N-Terminus-Domäne und 4 hydrophobe Membran Segmente aus. Im Gegensatz zu anderen liganden-gesteuerten Ionen-Kanälen wie z.B. dem nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor oder dem GABA_A-Rezeptor sind jedoch nur 3 der hydrophoben Elemente Transmembran-Domänen. Die mit M2 bezeichnete zweite hydrophobe Region bildet eine in der Membran gelegene Schleife, was u.a. dazu führt, dass der C-Terminus im Intrazellulär-Raum liegt. Die Länge der Kainat-Rezeptor Untereinheiten GluR5 bis 7 entspricht mit ca. 900 Aminosäuren in etwa der Länge der AMPA-Rezeptor Untereinheiten, während die Untereinheiten KA1 und KA2 mit ca. 970 Aminosäuren etwas länger sind.

Wie auch bei den AMPA-Rezeptor Untereinheiten gibt es durch sogenanntes Alternatives-*Splicen* und post-transkriptionelles mRNA-*Editing* zahlreiche Varianten der Kainat-Rezeptor Untereinheiten. So sind z.B. für das Genom der Ratte mehrere *Splice*-Varianten der Untereinheiten GluR5 und 7 bekannt, sowie post-transkriptionelles *Editing* der Untereinheiten GluR5 und 6, was wesentlichen Einfluss auf die Leitfähigkeit und die Kalzium-Permeabilität der Kanäle hat. Während alle AMPA-Rezeptor Untereinheiten funktionelle Homomere bilden können, gilt dies nur für die Kainat-Rezeptor Untereinheiten GluR5 bis 7. Die Untereinheiten KA1 und KA2 bilden nur als Bestandteil von Heteromeren mit den Untereinheiten GluR5 bis 7 funktionelle Rezeptoren.

Die Anzahl der am Aufbau eines funktionellen Rezeptors beteiligten Untereinheiten wird kontrovers diskutiert. Bis vor kurzem wurde generell angenommen, dass ionotrope Glutamat-Rezeptoren, wie andere transmitter-aktivierte Ionen-Kanäle auch, aus 5 Untereinheiten aufgebaut sind. Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass es sich bei den ionotropen Glutamat-Rezeptoren um Tetramere handelt (Rosenmund et al., 1998; Übersicht in: Dingledine et al., 1999).

Über die Funktion von Kainat-Rezeptoren weiß man, im Gegensatz zu den AMPA-Rezeptoren, nur sehr wenig, was auf einen Mangel an spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten zurückzuführen ist. Erst in den letzten Jahren hat es die Entwicklung solcher spezifischen Pharmaka ermöglicht, Kainat-Rezeptoren und ihre physiologische Funktionen näher zu untersuchen. Mittlerweile sind Kainat-Rezeptoren als postsynaptische Vermittler, aber auch als präsynaptische Modulatoren synaptischer Transmission in verschiedenen Systemen bekannt. So sind z.B. postsynaptische Kainat-Rezeptoren auf CA3 Pyramidenzellen und Interneuronen des Hippocampus (Castillo et al., 1997; Vignes und Collingridge, 1997;

Frerking et al., 1998; Cossart et al., 1998; Bureau et al., 1999), auf Off-Bipolar Zellen der Retina (DeVries und Schwartz, 1999) sowie auf Zellen des Rückenmarks, der Amygdala und des Cortex (Li und Rogawski, 1998; Li et al., 1999; Kidd und Isaac, 1999) nachgewiesen worden. Präsynaptische Kainat-Rezeptoren, die einen modulierenden, i.d.R. hemmenden Einfluss auf die synaptische Transmission haben, sind in Systemen wie dem Hippocampus, dem Hypothalamus und dem Cortex nachgewiesen worden (Chittajalu et al., 1996; Clarke et al., 1997; Rodriguez-Moreno et al., 1997; Vignes et al., 1998; Liu et al., 1999; Perkinson und Sihra, 1999). Kontrovers diskutiert wird die These, dass präsynaptische Kainat-Rezeptoren im Hippocampus über einen metabotropen Mechanismus modulierend auf die Freisetzung von GABA einwirken (Rodriguez-Moreno und Lerma, 1998; Frerking et al., 1999). Ebenfalls unklar ist die mögliche Beteiligung von Kainat-Rezeptoren an der Induktion von LTP an Moos-Faser-Synapsen im Hippocampus (Castillo et al., 1994; Weisskopf und Nicoll, 1995; Tong et al., 1996; Bortolotto et al., 1999; Yeckel et al., 1999; siehe auch Nicoll et al., 2000 und Bortolotto et al., 2000). Eine aktuelle Übersicht über die physiologische Bedeutung der Kainat-Rezeptoren findet sich bei Chittajalu et al. (Chittajalu et al., 1999), sowie bei Frerking und Nicoll (Frerking und Nicoll, 2000).

Was das auditorische System betrifft, so konnten bisher noch keine funktionellen Kainat-Rezeptoren nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, konnte mit elektrophysiologischen Untersuchungen lediglich nachgewiesen werden, dass LSO- und MNTB-Neurone nonNMDA-Rezeptoren besitzen (Caspary und Faingold, 1989; Wu und Kelly, 1992a; Wu und Kelly, 1992b; Wu und Fu, 1998). Der Nachweis dieser Rezeptoren erfolgte mit Hilfe der Antagonisten CNQX und NBQX. Eine weitergehende Differenzierung der nonNMDA-Rezeptoren in AMPA- und Kainat-Rezeptoren ist mit diesen Substanzen jedoch nicht möglich (Wilding und Huettner, 1996). Da aber bereits mittels immunzytologischer Untersuchungen sowohl AMPA-Rezeptor Untereinheiten als auch Kainat-Rezeptor Untereinheiten im SOC nachgewiesen wurden (Petralia et al., 1994; Caicedo und Eybalin, 1999; Löhrlke et al., 1999), lag die Vermutung nahe, dass LSO- und MNTB-Neurone neben AMPA-Rezeptoren auch funktionelle Kainat-Rezeptoren exprimieren. Für beide Rezeptor-Typen wurde im Rahmen dieser Studien eine entwicklungsabhängige Expression einzelner Untereinheiten beschrieben.

1.1 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Beschreibung der ionotropen Glutamat-Rezeptoren auf Neuronen der LSO im auditorischen Hirnstamm der Ratte. Hierzu wurden Neurone dieses Kerngebietes mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in akut isolierten Hirnschnitten untersucht. Dies ermöglicht Aussagen über funktionelle Rezeptoren, im Gegensatz zu Protein- oder mRNA-Nachweisen einzelner Rezeptor-Untereinheiten. Zum Vergleich der erhaltenen Werte aus der LSO wurden entsprechende Untersuchungen auch an MNTB-Neuronen durchgeführt. Im Vordergrund der Untersuchungen standen dabei zwei Aspekte:

1. Werden von LSO- bzw MNTB-Neuronen funktionelle AMPA- und / oder Kainat-Rezeptoren exprimiert?
2. Ist die Größe von AMPA- oder Kainat-Rezeptor vermittelten Strömen in der LSO oder dem MNTB abhängig vom Alter der Tiere?

Die Beantwortung dieser Fragen wurde durch den Einsatz spezifischer Agonisten, Antagonisten und Modulatoren ermöglicht (Tab. 1). Diese Pharmaka erlauben aufgrund ihrer hohen Selektivität, AMPA- und Kainat-Rezeptoren getrennt voneinander zu untersuchen.

Die Applikation dieser Substanzen erfolgte mittels eines innovativen Achtkanal Applikationssystems. Dieses neu konstruierte System zeichnete sich durch pneumatische Schlauchventile aus, die keine elektromagnetischen Störfelder erzeugen. Die Entwicklung dieses Applikationssystems war ein weiterer wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit, und wird dementsprechend im ersten Teil der Ergebnisse ausführlich beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden Sprague Dawley Ratten zwischen postnatal Tag 2 (P 2) und P 11 verwendet. Der Tag der Geburt wurde als P 0 definiert. Die Tiere stammten hauptsächlich aus eigener Zucht (Tierhaus Universitäts-Klinikum-Frankfurt bzw. Universität-Kaiserslautern). Zu Beginn der Zucht sowie zeitweise zur Ergänzung wurden Tiere von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) oder Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Gehalten wurden die Tiere in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, bei Futter und Wasser ad libitum. Insgesamt wurden Gehirne von 150 Ratten für Experimente verwendet.

Sämtliche Experimente wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

2.2 Herstellung der Hirnschnitte

Entsprechend der Lage des Superioren Oliven Komplexes (SOC) wurden coronale Hirnschnitte des auditorischen Hirnstammes angefertigt. Hierzu wurden die Ratten betäubt (Ketamin; 1 mg / g KG; i.p.), und nach Ausbleiben von Reflexen dekapitiert. Nach der Entnahme des Gehirns und Überführung in eisgekühlte Präparationslösung (Zusammensetzung in mM: NaHCO₃ 25, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, D-Glucose 260, Na-Pyruvate 2, Myo-Inositol 3, Kynuren-Säure 1 (kontinuierlich begast mit 95% O₂ und 5% CO₂, pH 7.4) wurden zwischen dem rostralen Ende des Pons und dem caudalen Ende der Medulla Oblongata die Meningen vom ventralen Bereich des Stammhirns mit Hilfe von zwei feinen Pinzetten entfernt (Dumont Nr. 5, FST, Heidelberg, Deutschland). Anschließend wurde mittels zweier gekreuzter Skalpelle der oben beschriebene Bereich des Stammhirns geblockt und mit der rostralen Schnittfläche auf dem Probenhalter eines Vibratoms (VT 1000S, Leica, Bensheim, Deutschland) aufgeklebt (Krazy[®] Glue; Elmer's Products Inc., Columbus, USA). Der Probenhalter wurde in die mit eisgekühlter Präparationslösung gefüllte Präparationswanne überführt und so ausgerichtet, dass die Schnittrichtung entlang der Dorsoventralachse verlief. Mit minimalem Vortrieb und maximaler Frequenz wurden 300 µm dicke Schnitte im Bereich des SOC geschnitten. Die erhaltenen Hirnschnitte wurden für 1 Stunde in 37°C warmer Bad-Lösung aufbewahrt.

Danach wurden sie für mindestens eine weitere Stunde in Bad-Lösung bei Zimmertemperatur (20 – 25°C) inkubiert, bevor sie für die Experimente verwendet wurden. Zur Durchführung der Experimente wurden einzelne Schnitte mittels einer Pasteurpipette in eine Ableitkammer überführt, wo sie für die gesamte Zeitdauer des Experimentes kontinuierlich mit der Badlösung perfundiert wurden (1,6 ml / min). Die Badlösung wurde ebenfalls mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast (pH 7.4) und hatte folgende Zusammensetzung (mM): NaCl 125, NaHCO₃ 25, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, D-Glucose 10, Na-Pyruvat 2, Myo-Inositol 3, Ascorbin-Säure 0.4.

2.3 Messtechnik

Sämtliche Untersuchungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration (Hamill et al., 1981) durchgeführt. Die Experimente zur Funktionsüberprüfung des Applikationssystems erfolgten im Current-Clamp-Modus, bei dem bei vorgegebenem Haltestrom Potentialdifferenzen zwischen Meß- und Bad-Elektrode gemessen werden. Versuche zur Analyse der ionotropen Glutamat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen wurden im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Hierbei wird das Membranpotential einer Zelle durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf einen bestimmten Wert, die sogenannte Sollspannung, eingestellt. Der Strom, der hierzu benötigt wird, resultiert aus der Differenz zwischen Sollspannung und tatsächlichem Membranpotential. Dieser Kompensationsstrom ist es, der dann gemessen wird. Er stellt ein Maß für die Leitfähigkeit der Membran dar, da er einem Strom über die Membran äquivalent, aber entgegengesetzt gerichtet ist.

Die für die Experimente verwendeten Patch-Pipetten wurden aus Borosilikatglas (GB150F–8P; Science Products, Hofheim, Deutschland) in 5 Schritten mit einem horizontalen Elektrodenziehgerät der Firma Sutter Instruments (Novato, USA) gezogen. Mit der verwendeten Pipetten-Lösung (in mM; KCl 130, Hepes 10, EGTA 5, MgCl₂ 1, Na₂ATP 2, Na₂GTP 0.3, pH 7.2 mit KOH) hatten die Pipetten einen Widerstand zwischen 3 und 8 MΩ, in der Bad-Lösung. Das Liquid-Junction-Potential, welches an Grenzflächen zwischen Lösungen verschiedener ionaler Zusammensetzung (z.B. Pipettenlösung / Badlösung) auftritt, wurde mittels des Programms JPCalc (Barry, 1994) berechnet und betrug 3 mV. Alle Messungen wurden *online* um diesen Wert korrigiert.

Die Annäherung der Pipetten an die Zellen erfolgte mit der “Blow and Seal” Technik (Stuart et al., 1993) unter visueller Kontrolle mittels einer Video-Kamera (VX44; PCO, Deutschland / Monitor: Sony, Japan) und Infrarot-Differenz-Interferenz-Kontrast Mikroskopie (Axioskop FS; Objektiv: Wasserimmersion 40x, Optovar: 2,5x, Okular: 10x; Zeiss, Jena, Deutschland). Ein SMI Mikromanipulator der Firma Luigs & Neumann (Ratingen, Deutschland) erlaubte die exakte Heranführung der Pipetten an die Zellen. Um Störungen durch einlaufende Schwingungen zu vermeiden, befand sich der gesamte Versuchsaufbau auf einem schwingungs isolierten Labortisch mit Niveau-Reguliersystem der Firma Physic Instruments (Waldbronn, Deutschland).

Nach dem Aufsetzen der Patch-Pipette auf die Zell-Membran und dem Erzeugen eines Abdichtwiderstandes im Gigaohm-Bereich, wurde durch das Einreißen des Membranbereiches unter der Pipettenöffnung ein niederohmiger Zugang zum Zellinneren, d.h. die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt. Der dadurch entstandene Serienwiderstand wurde während der Experimente kontinuierlich überwacht. Im Mittel hatte er eine Größe von $13 \pm 7 \text{ M}\Omega$ ($n = 124$) und wurde zu 50% kompensiert. Bei einer Zunahme des Serienwiderstandes um mehr als $5 \text{ M}\Omega$ wurden die Messungen abgebrochen. Sowohl der Serienwiderstand als auch die Membrankapazität wurden über eine Routine des verwendeten Patch-Clamp-Verstärkers bestimmt. Als Verstärker diente ein EPC 9 Modell der Firma HEKA (Lambrecht, Deutschland). Nur Neurone mit einem Ruhemembranpotential von mindestens -50 mV wurden für Messungen verwendet. Im Durchschnitt hatten die verwendeten SOC-Neurone ein Ruhemembranpotential von $-62 \pm 6 \text{ mV}$ ($n = 124$). Für die Voltage-Clamp-Experimente wurden die Zellen auf ein Membranpotential von -60 mV geklemmt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur ($20 - 25^\circ\text{C}$) durchgeführt.

Die Datenaufnahme erfolgte durch einen Personal-Computer mit der Software Pulse 8.0 (HEKA). Für ein Aufnahme fenster von 60 Sekunden Dauer wurden die Daten mit 125 Hz gefiltert und mit einer Aufnahme rate von 250 Messpunkten je Sekunde digitalisiert.

Die gewonnenen Daten wurden mittels eines handelsüblichen PCs und den Programmen PulseFit 8.0 (HEKA), Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, USA), WinSTAT 1999.3 (R.Fitch Software, Staufen, Deutschland) sowie Excel 2000 (Microsoft, USA) analysiert. Die Montage sowie eine Nachbearbeitung der Abbildungen erfolgte in dem Graphik-Programm CorelDRAW 9.0 (Corel, USA).

2.4 Statistik

Alle erhobenen Datensätze wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Mittelwerte werden als arithmetisches Mittel mit der Standardabweichung als Streumaß angegeben. Der Vergleich zweier Populationen erfolgte mit dem t-Test nach Student (abhängig / unabhängig). Mehr als zwei Populationen wurden mittels Varianzanalysen (abhängig / unabhängig) auf signifikante Unterschiede überprüft.

Größe und Art des Zusammenhanges zwischen zwei Parametern wurden mit Hilfe der Regressions- (linear) und Korrelations-Rechnung bestimmt. Der Korrelationskoeffizient wurde nach Pearson berechnet.

Generell wurde zwischen den drei Signifikanzniveaus signifikant (*, $p < 0,05$), hoch signifikant (**, $p < 0,01$) und höchst signifikant (***, $p < 0,001$) unterschieden.

2.5 Pharmaka und Pharmakaapplikation

Die zur Herstellung der Präparationslösung benötigte Kynurensäure wurde bei Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) bezogen. SERVA (Heidelberg, Deutschland) lieferte die für die Pipettenlösung benötigten Substanzen EGTA, Na_2ATP und Na_2GTP .

Ascorbinsäure sowie Concanavalin A (Con A) wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Con A wurde direkt vor den jeweiligen Experimenten in einer Konzentration von $0,3 \mu\text{g/ml}$ in die entsprechenden Lösungen eingewogen. Von allen anderen Drogen wie Tetrodotoxin ($0,5 \mu\text{M}$), Glutamat (1 mM), AMPA ($200 \mu\text{M}$), Kainat ($100 \mu\text{M}$), GYKI 52466 ($100 \mu\text{M}$), Joro-Spider-Toxin ($1 \mu\text{M}$), ATPA ($10 \mu\text{M}$), SYM 2081 ($10 \mu\text{M}$) und S-5-Iodowillardiine ($1 \mu\text{M}$) (alle RBI Biotrend, Köln, Deutschland) wurden Stammlösungen angesetzt, die bei -20°C aufbewahrt und am Versuchstag auf die in Klammern angegebenen Arbeitskonzentrationen verdünnt wurden. Alle anderen Substanzen wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Sämtliche Glutamat-Rezeptor spezifischen Pharmaka (Tab. 1) wurden lokal mittels Mikroperfusion auf die zu untersuchenden Zellen appliziert. Das dazu verwendete Applikationssystem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Zusammenarbeit mit Herrn B. Mittendorf von der Elektronikwerkstatt des Zentrums der Physiologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main entwickelt und wird dementsprechend im ersten Teil der Ergebnisse ausführlich vorgestellt.

Tetrodotoxin wurde in einer Konzentration von 0,5 μM sowohl über das Applikationssystem als auch über das Bad eingewaschen.

Agonist compound	EC₅₀ values at kainate receptors [μM]	EC₅₀ values at AMPA receptors [μM]	Working concentration [μM]	Refs
ATPA	0,6	340	10	A
SYM 2081	0,12	132	10	B
(S)-5-Iodowillardiine	0,14	19	1	C
Kainate	12	64	100	A
AMPA	3000	1 - 30	200	D
Antagonist compound	IC₅₀ values at kainate receptors [μM]	IC₅₀ values at AMPA receptors [μM]	Working concentration [μM]	Refs
GYKI 52466	> 200	18	100	E
JSTX	-	0,056	1	F
A: Clarke et al., 1997; B: Donevan et al., 1998; C: Wong et al., 1994; D: Hollmann and Heinemann, 1994; E: Wilding and Huettner, 1995; F: Iino et al., 1996				

Tab. 1: *Übersicht der verwendeten Glutamat-Rezeptor spezifischen Pharmaka.*

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Mehrkanal-Applikationssystems

Das Applikationssystem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu konstruiert und entwickelt. Es besteht aus 8 verschiedenen Reservoirs für die zu applizierenden Lösungen, 8 Druckluftventilen sowie dem dazugehörigen elektronischen Steuergerät, 8 Schlauchventilen und einer Achtkanal-Applikationspipette (Abb. 3).

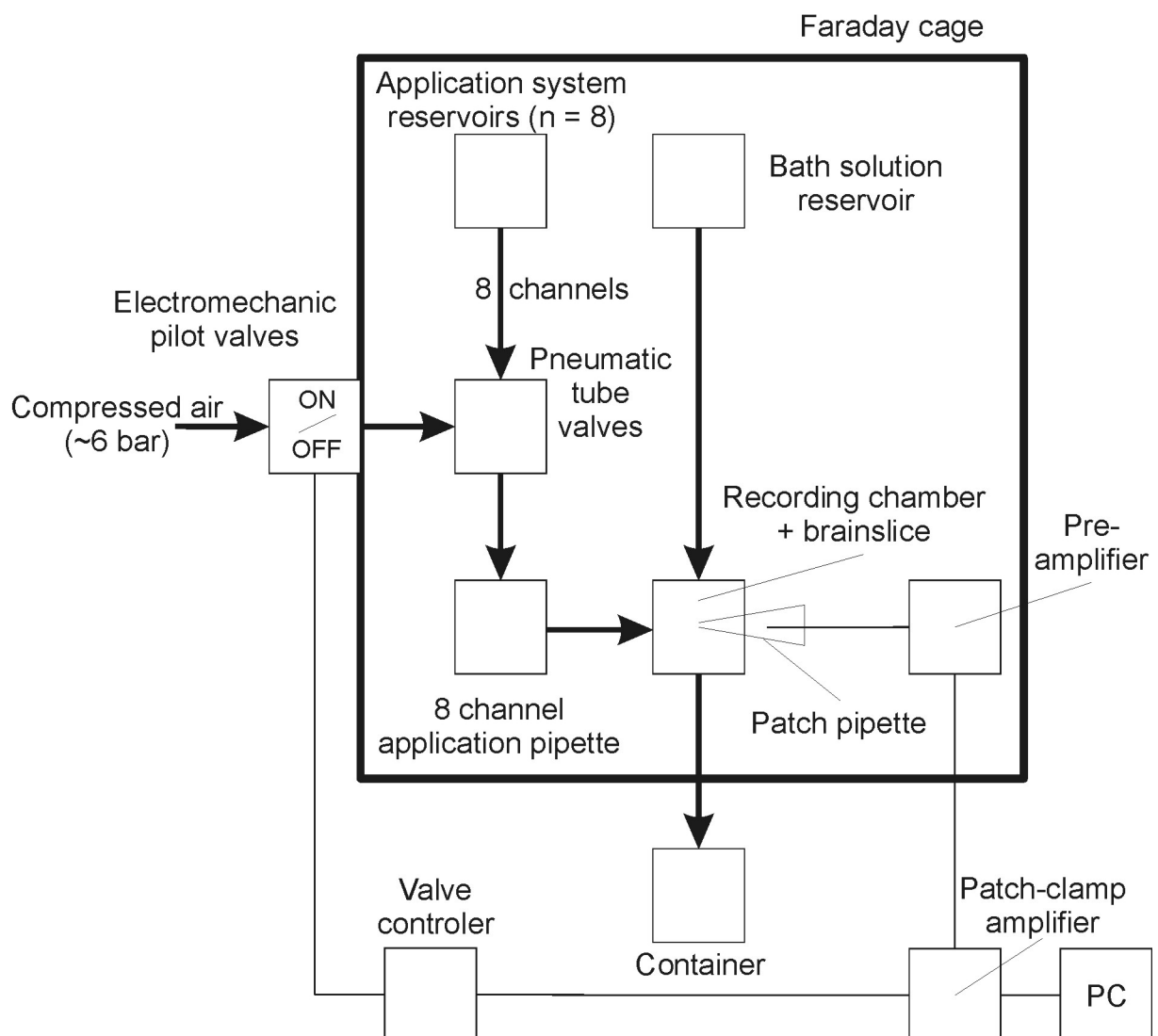


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Dargestellt ist der Faraday-Käfig mit Badzulauf, Applikationssystem und Messapparatur.

Als Reservoir für die Lösungen dienten Einmalspritzen (60 ml, PLASTIPAK; Becton Dickinson, Madrid, Spanien), die an einer Kunststoffhalterung auswechselbar angebracht wurden. Die Verwendung von Einmalspritzen bietet mehrere Vorteile: erstens lassen sich die Behälter leicht und kostengünstig austauschen, und zweitens lassen sich die Spritzen problemlos mittels Luer-Kupplungen an das Schlauchsystem des Applikationssystems anschließen. Zusätzlich können alle Lösungen bei Bedarf begast werden.

3.1.1 Die Schlauchventile

Entwickelt wurde das System im Hinblick auf eine - im Vergleich zu einer Badapplikation - relativ lokale und schnelle Applikation. Aus der Forderung nach einer schnellen Applikation mit einem möglichst geringen, nicht begasbaren Totvolumen (Bereich zwischen den Ventilen und der Pipettenspitze; siehe Abb. 3), ergab sich die Forderung nach Ventilen, die möglichst nahe an der Applikationspipette liegen. Aufgrund der dadurch entstehenden Nähe der Ventile zur Messpipette würden kommerziell erhältliche, elektromagnetische Ventile die Messungen erheblich stören. Aus diesem Grund wurden Schlauchventile entwickelt, deren Betrieb keine elektromagnetischen Felder zur Folge hat (Abb. 4). Das Funktionsprinzip dieser Ventile beruht auf dem Abklemmen bzw. nicht Abklemmen eines lösungführenden Schlauches durch einen größeren druckluftführenden (gasdichten) Schlauch, der unter hohem Druck (bis 6 bar) gesetzt werden kann (Abb. 4B). Setzt man den druckluftführenden Schlauch unter Druck, wird der lösungführende Schlauch abgeklemmt und das Ventil ist geschlossen. Das Ventil ist dagegen geöffnet, wenn keine Druckluft eingeleitet wird. Die Regelung des Luftdrucks erfolgte mittels kommerzieller Druckluftventile (Festo, MSOV-3, Deutschland), die außerhalb des Faraday-Käfigs angebracht wurden. Die elektronische Ventilsteuerung ermöglichte es, die elektromechanischen Ventile und damit die Schlauchventile über die Software des Patch-Clamp-Verstärkers anzusteuern. Zusätzlich konnten die Ventile mittels des Steuergerätes manuell betätigt werden.

Ein Silikon-Schlauch (1 mm i.D. / 2 mm ä.D.) diente als lösungführender Kanal. Der druckluftführende Schlauch bestand aus Tygon® 3603 (2,4 mm i.D. / 4 mm ä.D.; neoLab, Heidelberg, Deutschland), um ausreichende Elastizität bei gleichzeitiger Gasdichtigkeit zu gewährleisten. Die Gasdichtigkeit muss gegeben sein, um zu verhindern, dass feinste Gasbläschen vom druckluftführenden Schlauch in den lösungführenden Schlauch übertreten.

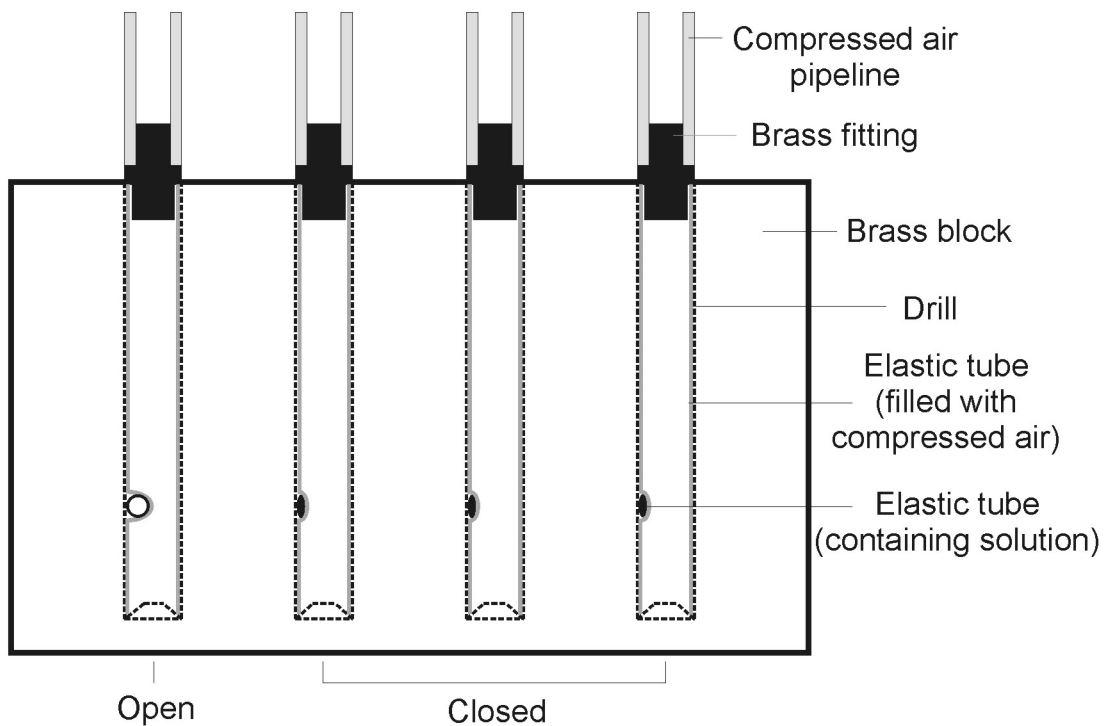
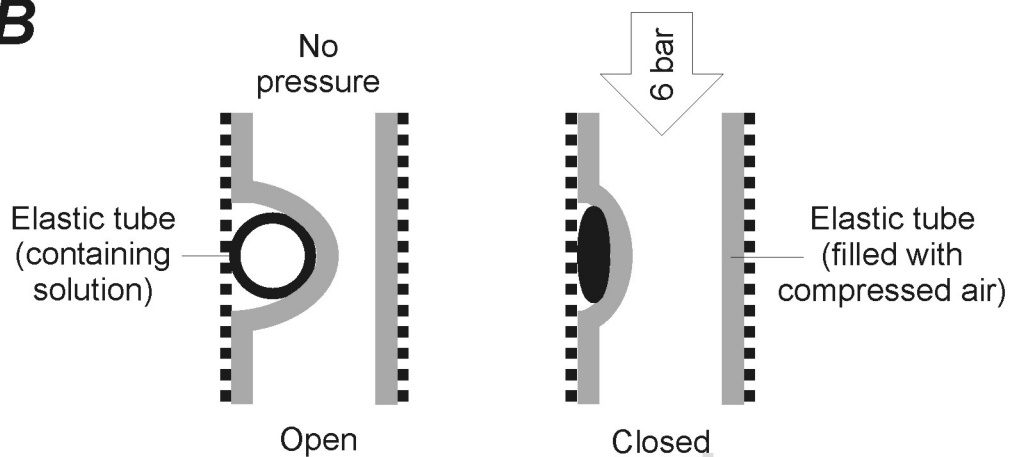
A**B**

Abb. 4: Schematische Darstellung des Druckluftventils. A: Aufsicht auf einen Ventilblock mit 4 Ventilen. **B:** Funktionsprinzip des Ventils. Mittels Luftdruck wird ein lösungsführender Schlauch abgeklemmt oder freigegeben und dementsprechend das Ventil geschlossen bzw. geöffnet.

Da der druckluftführende Schlauch, ebenso wie der lösungsführende, elastisch sein muss, wurde der Schlauch in seiner gesamten Länge (12 mm) in einen Messingblock (Tiefe: 15 mm, Breite: 30 mm, Höhe: 6 mm) eingesetzt, um ein zu starkes Aufblähen unter Druck zu vermeiden (Abb. 4A). Zu diesem Zweck wurden in zwei Messingblöcke jeweils vier

Bohrungen (Tiefe: 12 mm, Durchmesser: 4mm) eingebracht, was zweimal vier Schlauchventilen entspricht. Die Bohrungen für die lösungführenden Kanäle erfolgten jeweils am Rand der druckluftführenden Kanäle und im rechten Winkel zu deren Längsachsen. Der Anschluss der Druckluft an die Schlauchventile erfolgte mit Hilfe von unelastischen Druckluftschläuchen (Festo, Deutschland) und eigens zu diesem Zweck hergestellten Anschlusskupplungen (Messing; Abb. 4A).

3.1.2 Die Applikationspipette

Die Applikationspipette besteht aus 8 Mikropipetten (MicroFil™ MF28G; WPI, Berlin, Deutschland), die in einem Glastrichter in Kunstharz eingegossen sind und in einen gemeinsamen Ausführkanal, ebenfalls eine Mikropipette (MicroFil™ MF28G), münden (Abb. 5A).

Aufgrund der Materialeigenschaften der Mikropipetten (Quarz, Beschichtung mit Polyimid) lassen sich die 8 Kanäle gut reinigen, und somit besteht keine Gefahr von Verunreinigung der zu applizierenden Lösungen. Luer-Kupplungen ermöglichen den einfachen Anschluss der Pipette an das Schlauchsystem des Applikationssystems.

Die geringen Dimensionen der Mikropipetten (250 µm i.D. / 350 µm ä.D.) erlauben die Anordnung von 7 Testlösung führenden Kanälen um einen zentralen Spülkanal, der Extrazellulärlösung (= Badlösung) führt (Abb.: 5B u. C). Ein zentraler Spülkanal ist notwendig um je nach Applikationsart zwischen den einzelnen Kanälen wechseln zu können. Prinzipiell sind zwei verschiedene Applikationsarten mit dem von uns entwickelten System möglich:

1. Die Spitzen-Applikation

Bei der Spitzen-Applikation wird die zu applizierende Substanz eines Kanals bis in die Spitze der Applikationspipette "geladen". Durch Öffnen und Schließen des zugehörigen Ventils kann nun diese Substanz sehr schnell appliziert werden. Um zwischen zwei Kanälen zu wechseln, empfiehlt es sich, zunächst die Pipette mit Hilfe des zentralen Spülkanals mit Badlösung zu spülen, um die in der Spitze stehende Substanz zu entfernen. Anschließend kann die Substanz des zweiten Kanals in die Pipettenspitze vorgeladen werden.

2. Die Puls-Applikation

Die Puls-Applikation zeichnet sich dadurch aus, dass ständig Lösung durch die Applikationspipette, in der Regel Badlösung durch den zentralen Spülkanal, fließt. Um

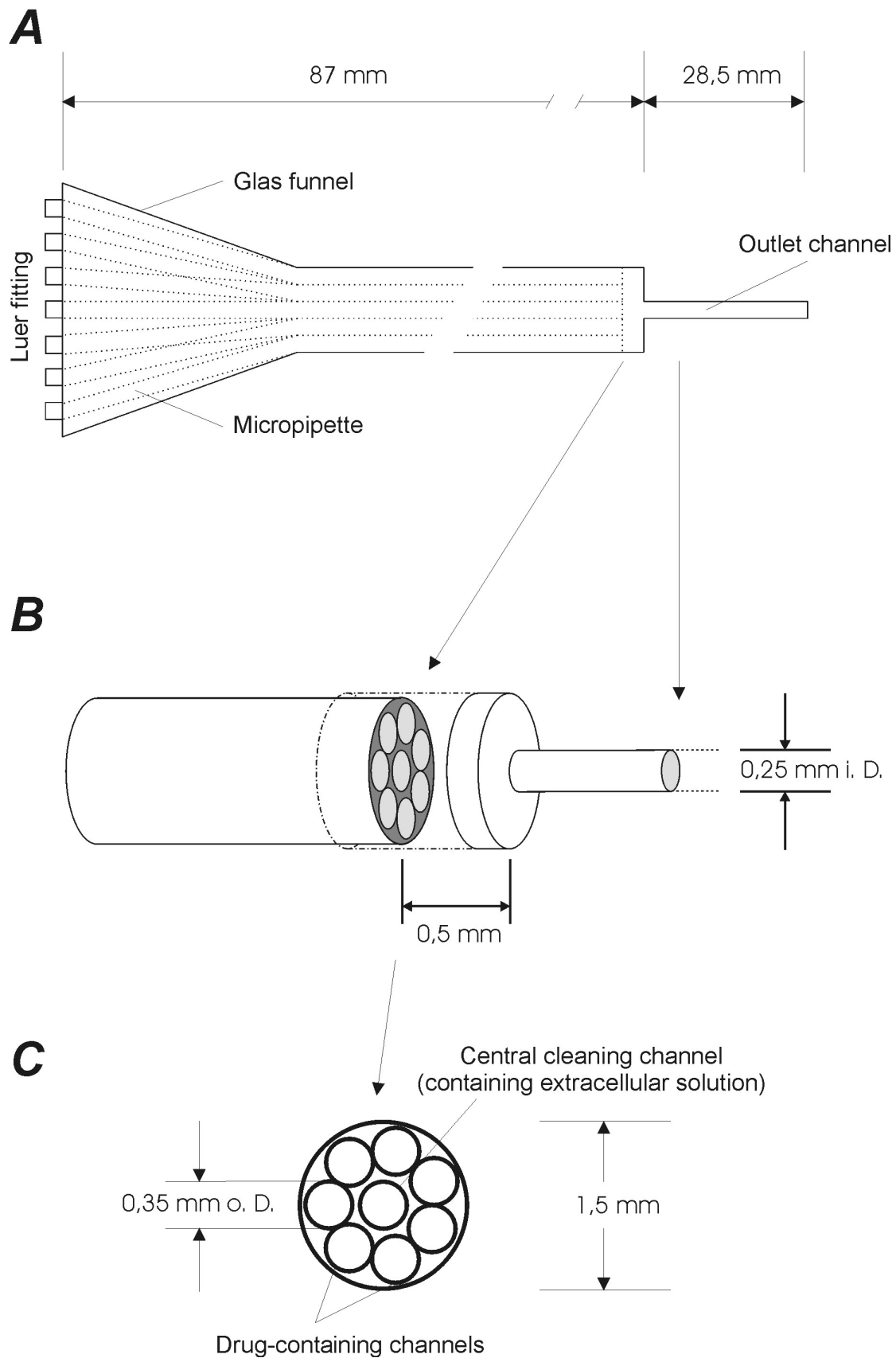


Abb. 5: Schematische Darstellung der Applikationspipette. A: Seitenansicht der Applikationspipette. **B:** Vergrößerte Darstellung der Pipettenspitze. **C:** Querschnitt der Pipette.

einzelne Kanäle zu aktivieren, also bestimmte Substanzen zu applizieren, wird zwischen dem zentralen Spülkanal und den betreffenden Kanälen gewechselt. So werden Ein- / Aus-Schaltartefakte verhindert, die von Druckschwankungen an der Oberfläche der Schnitte bzw. der Zellen ausgelöst werden können. Außerdem kann so im Verlauf eines Experimentes unkompliziert und schnell zwischen allen sieben zur Verfügung stehenden Kanälen gewechselt werden. Sämtliche Experimente zur Untersuchung der Glutamat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen wurden aufgrund dieser Vorteile mit der Puls-Applikation durchgeführt.

Der geringe Durchmesser der Pipettenspitze (i.D.: 250 μm) bietet die Möglichkeit einer lokalen Applikation (Abb. 6). Eine lokale Applikation meint in diesem Zusammenhang, dass entsprechend dem Alter der Tiere die gesamte LSO (junge Tiere, P1 – P2) bzw. ein Großteil der LSO (ältere Tiere, \geq P3) von der Applikation erreicht wird, während die übrige Fläche des Schnittes unbeeinflusst bleibt.

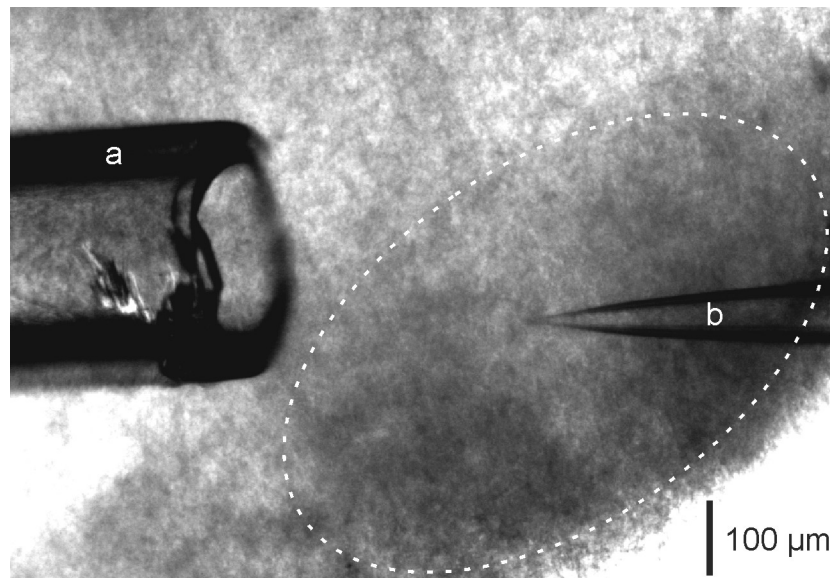


Abb. 6: *Mikroskopaufnahme eines Hirnschnittes mit Applikations- und Patch-Pipette.* Die weiß gestrichelte Linie markiert die Lage der LSO. (a = Spitze der Applikationspipette; b = Spitze einer Patch-Pipette)

3.1.3 Funktionsüberprüfung des Applikationssystems

Die völlige Neuentwicklung des Applikationssystems machte eine gründliche Überprüfung der Eigenschaften desselben notwendig. Hierzu wurden drei Messreihen durchgeführt: Die erste Messreihe diente der Charakterisierung der Schalteigenschaften des Systems. Mit der zweiten Messreihe sollten die beiden Applikationsformen Puls- und Spitzen-Applikation charakterisiert und miteinander verglichen werden. Im Rahmen einer dritten Messreihe wurde das System unter den späteren Versuchsbedingungen, d.h. Messungen an akut isolierten Hirnschnitten, getestet.

Mit der ersten Messreihe sollte mittels der Spitzenapplikation insbesondere überprüft werden, ob die Schlauchventile einheitlich schalten und ob alle Kanäle gleiche Durchflussraten besitzen. Dazu wurden sogenannte Liquid-Junction-Potential Messungen durchgeführt (Abb. 7). Bei dieser Art von Messung macht man sich das Auftreten von Potentialdifferenzen zwischen zwei Lösungen unterschiedlicher Ionenkonzentration zu nutze. Für diese Messreihe wurden alle 8 Kanäle des Applikationssystems mit einer 10 mM Natriumchloridlösung gefüllt. Als Badlösung diente eine 1 M Natriumchloridlösung. Die zwischen diesen Lösungen auftretenden Potentialschwankungen konnten mit einer Patch-Pipette, die ebenfalls mit einer 1 M Natriumchloridlösung gefüllt war, gemessen werden.

Die gemessenen Antworten wurden anhand der Parameter *Amplitude*, *Latenz* und *Aktivierungszeitkonstante* τ miteinander verglichen. Die *Latenz* wurde definiert als die Zeitspanne zwischen Beginn der Applikation und Beginn des evozierten Stromes. τ wurde als Maß für die Geschwindigkeit der Potentialänderung verwendet; es ist definiert als die Zeit, nach der 63% der maximalen Amplitude der Antwort erreicht ist. Dabei ist die Geschwindigkeit der Potentialänderung proportional zur Geschwindigkeit des Konzentrationsaufbaus. Alle drei Parameter sind abhängig von der Durchflussrate durch die jeweiligen Kanäle und von dem Schaltverhalten der entsprechenden Schlauchventile. So führt z.B. eine Verengung in einem der Kanäle zu einer größeren Latenz, einer langsameren Potentialänderung und einer geringeren Amplitude der entsprechenden Antwort. Entsprechendes gilt für ein unzureichend öffnendes Schlauchventil.

Es konnte gezeigt werden, dass alle acht Ventile eine gute Übereinstimmung in ihrem Schaltverhalten aufwiesen (Abb. 7A). Die Antworten der einzelnen Kanäle stimmten sowohl in Amplitude (26 ± 2 mV, $n = 8$) und Latenz (130 ± 11 ms, $n = 8$), als auch in ihren τ -Werten

(22 ± 1 ms, $n = 8$) sehr gut überein. Somit war der Konzentrationsaufbau sehr schnell (verglichen mit einer Bad-Applikation), und es ergaben sich keine großen Abweichungen zwischen den einzelnen Kanälen, was sich in den geringen Standardabweichungen der gemessenen Parameter widerspiegelte.

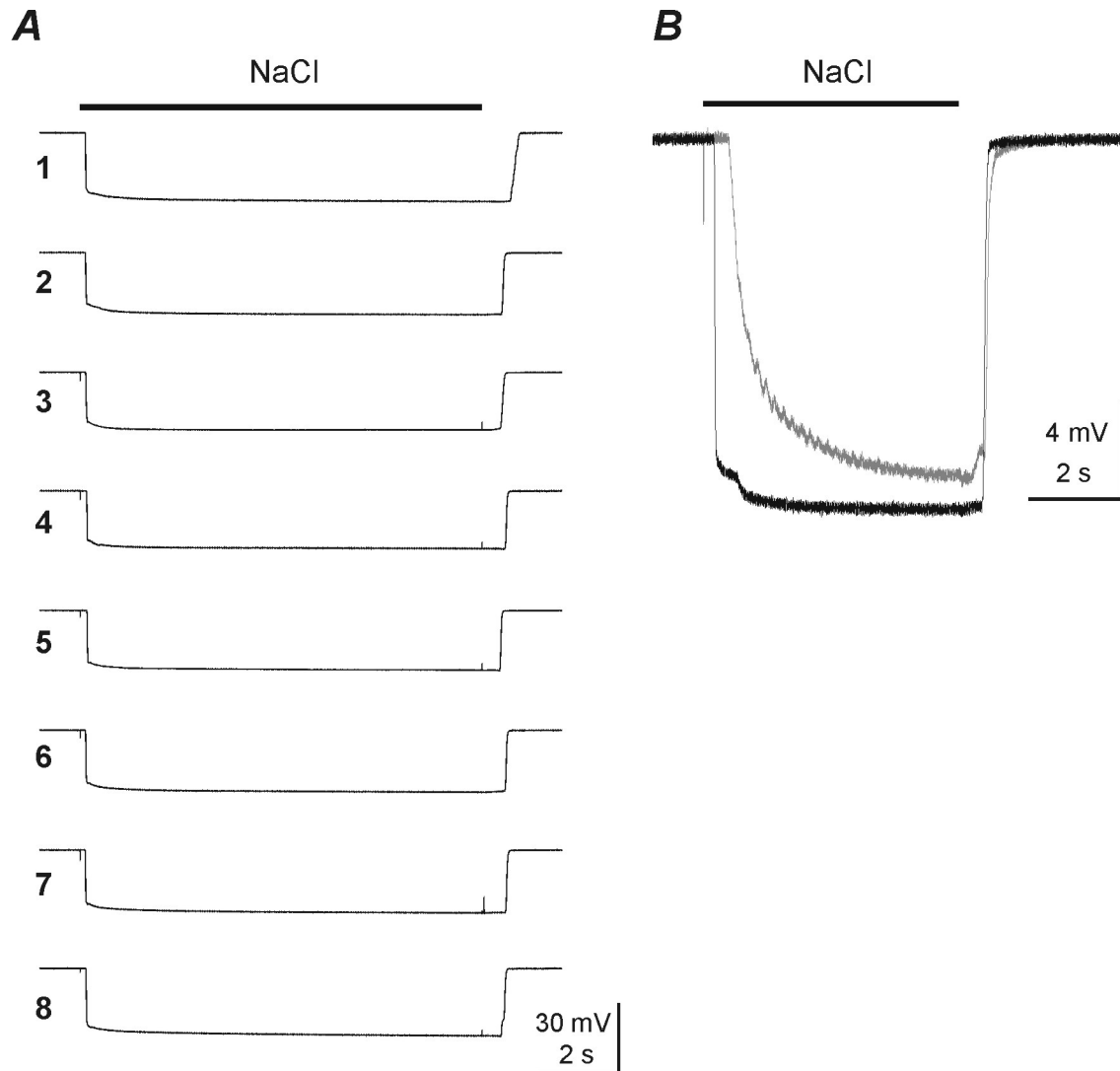


Abb. 7: Eigenschaften des Applikationssystems I (Liquid-Junction-Potential Messungen). **A:** Vergleich der Schalteigenschaften der einzelnen Kanäle (1 - 8) mittels der Spitzen-Applikation. Die Applikation von 10 mM NaCl machte deutlich, dass alle 8 Kanäle in guter Übereinstimmung miteinander schalten. **B:** Vergleich der beiden Applikationsformen Puls- (grau) und Spitzen-Applikation (schwarz).

Für die Puls-Applikation ergaben sich, insbesondere im Hinblick auf die Geschwindigkeit des Konzentrationsaufbaus, deutlich größere Werte. Um die beiden Applikationsformen Puls-Applikation und Spitzen-Applikation miteinander vergleichen zu können, wurden im Rahmen einer zweiten Messreihe ebenfalls Liquid-Junction-Potential Messungen durchgeführt

(Abb. 7B). Im Gegensatz zur ersten Messreihe wurde jedoch der zentrale Spülkanal mit Badlösung gefüllt, so dass bei der Aktivierung des Spülkanals kein Liquid-Junction-Potential entstand.

Bei den Messungen wurde deutlich, dass der Konzentrationsaufbau der Puls-Applikationen mit $\tau = 395 \pm 57$ ms ($n = 7$) fast 20fach langsamer war als der Konzentrationsaufbau der Spitzen-Applikationen ($\tau = 22 \pm 1$ ms, $n = 7$). Die Latenz der Potentialänderungen nach Puls-Applikationen war mit 354 ± 50 ms ($n = 7$) mehr als dreimal so groß wie die Latenz nach Spitzen-Applikationen ($L = 104 \pm 17$ ms, $n = 7$). Im Gegensatz dazu ergab der Vergleich der erreichten maximalen Amplituden keinen signifikanten Unterschied zwischen der Puls-Applikation und der Spitzen-Applikation (24 ± 3 mV vs. 25 ± 3 mV, je $n = 7$; $p > 0,05$).

Aufgrund der Unterschiede in der Geschwindigkeit des Konzentrationsaufbaus wurden die maximalen Amplituden jedoch unterschiedlich schnell erreicht. Mit der Spitzen-Applikation wurde die maximale Amplitude bereits nach weniger als 1 s erreicht, dagegen wurde mit der Puls-Applikation die maximale Amplitude erst nach ca. 5 s erreicht. Wie auch bei der Spitzen-Applikation stimmten die einzelnen Kanäle in ihrem Schaltverhalten bei der Puls-Applikation gut miteinander überein, was sich in den geringen Standardabweichungen der gemessenen Parameter widerspiegelte.

In der dritten Messreihe wurde mit dem System eine 30 mM Kalium Lösung auf einen Hirnschnitt im Bereich der LSO appliziert und von LSO-Neuronen im Current-Clamp-Modus abgeleitet (Abb. 8). Dieser Versuchsansatz bietet einerseits die Möglichkeit, Puls- und Spitzen-Applikation auf ihre Eignung für Experimente an Hirnschnitten zu überprüfen, andererseits erlaubt diese einfache Kontrolle, die minimale Applikationszeit abzuschätzen, welche gewährleistet, dass eine konstante Konzentration der Testlösung im Hirnschnitt erreicht wird.

Die Spitzen-Applikation der Kalium-Lösung für eine Sekunde hatte eine Depolarisation von -54 mV auf -21 mV ($\Delta V = 33$ mV) zur Folge (Abb. 8A). Dagegen wurde das gleiche Neuron bei einer ebenfalls eine Sekunde andauernden Puls-Applikation der Kalium-Lösung nur um 11 mV depolarisiert (Abb. 8B). Auffallend war, dass im Vergleich zur Spitzen-Applikation die Dauer der Depolarisation deutlich verkürzt war (3,9 s vs. 21 s). Auch im Bezug auf die Geschwindigkeit der Potentialänderung zeigten sich drastische Unterschiede. Mit einem τ von 371 ms für die Depolarisation und einem τ_R -Wert von 605 ms für die Repolarisation war die durch die Puls-Applikation hervorgerufene Potentialänderung um ein

Vielfaches schneller als die Änderung des Membranpotentials bei der Spitzen-Applikation ($\tau = 2,5$ s bzw. $\tau_R = 5,5$ s). Im Hinblick auf die Latenzen gab es keine großen Unterschiede zwischen Puls- und Spitzen-Applikation. Die durch die Spitzen-Applikation hervorgerufene Potentialänderung setzte mit einer Latenz von 625 ms geringfügig später ein als die durch die Puls-Applikation hervorgerufene (600 ms).

Eine kontinuierliche Applikation der Kalium-Lösung mittels der Puls-Methode hatte eine maximale Depolarisation von 49 mV zur Folge (Abb. 8C). Es zeigte sich, dass sich nach ca. 7 s ein neues konstantes Membranpotential (*Steady State*) eingestellt hatte. Nach Beendigung der mehrere Sekunden dauernden Applikation repolarisierte die Zelle langsam, erreichte jedoch ihr ursprüngliches Ruhemembranpotential nicht mehr vollständig.

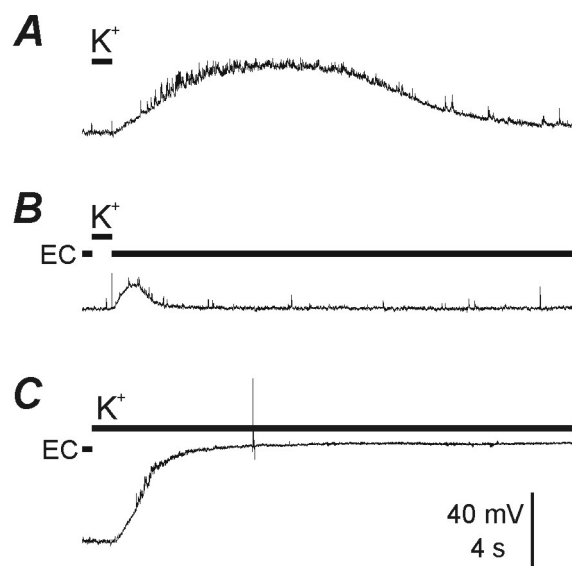


Abb. 8: *Eigenschaften des Applikationssystems II (Current-Clamp-Messungen im Hirnschnitt).* **A:** Membranpotentialänderungen eines LSO-Neurons nach Applikation von 30 mM Kalium-Lösung mittels der Spitzenapplikation. **B:** Membranpotentialänderungen des gleichen Neurons wie in A nach Applikation von Kalium-Lösung mittels der Pulsapplikation. **C:** Auswirkung einer langanhaltenden Kalium-Applikation mittels der Puls-Applikation auf das gleiche Neuron wie in A und B.

Wie zuvor bereits erwähnt, wurden alle in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Experimente zur Charakterisierung der ionotropen Glutamat-Rezeptoren auf LSO- bzw. MNTB-Neuronen mit Hilfe der Puls-Applikation durchgeführt. Entsprechend der oben beschriebenen Ergebnisse wurden alle Agonisten für 10 s appliziert. Die Applikation von Antagonisten sowie Modulatoren erfolgte als Co-Applikation, wobei diese Substanzen zusätzlich für mindestens 1 min vorappliziert wurden.

3.2 Analyse ionotroper Glutamat-Rezeptoren bei LSO-Neuronen

3.2.1 AMPA-evozierte Ströme bei LSO-Neuronen

Die Applikation von 200 μM AMPA ((RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) löste in allen untersuchten LSO-Neuronen einwärts gerichtete Ströme aus ($n = 37$). Die durch AMPA evozierten Ströme konnten vollständig und reversibel durch den spezifischen AMPA-Rezeptor-Blocker GYKI 52466 (1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7, 8-methylenedioxy-5H-2, 3-benzodiazepine hydrochloride) blockiert werden (Abb. 9). Im Gegensatz dazu hatte die Applikation von 1 μM Joro Spider Toxin (JSTX) keine Auswirkungen auf die Amplitude von AMPA-evozierten Strömen ($P = 8$; $n = 3$; $p > 0,05$).

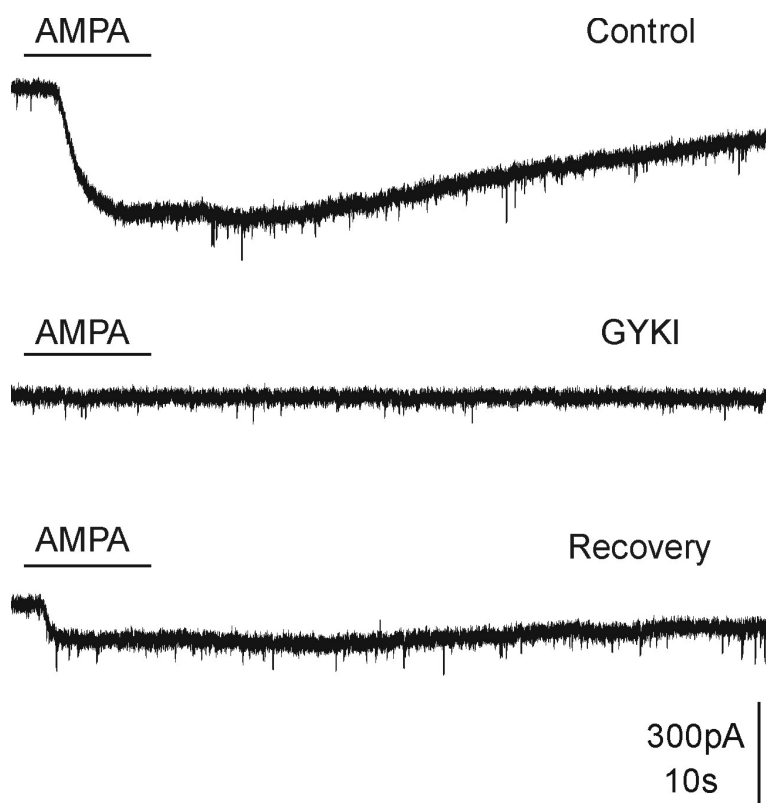
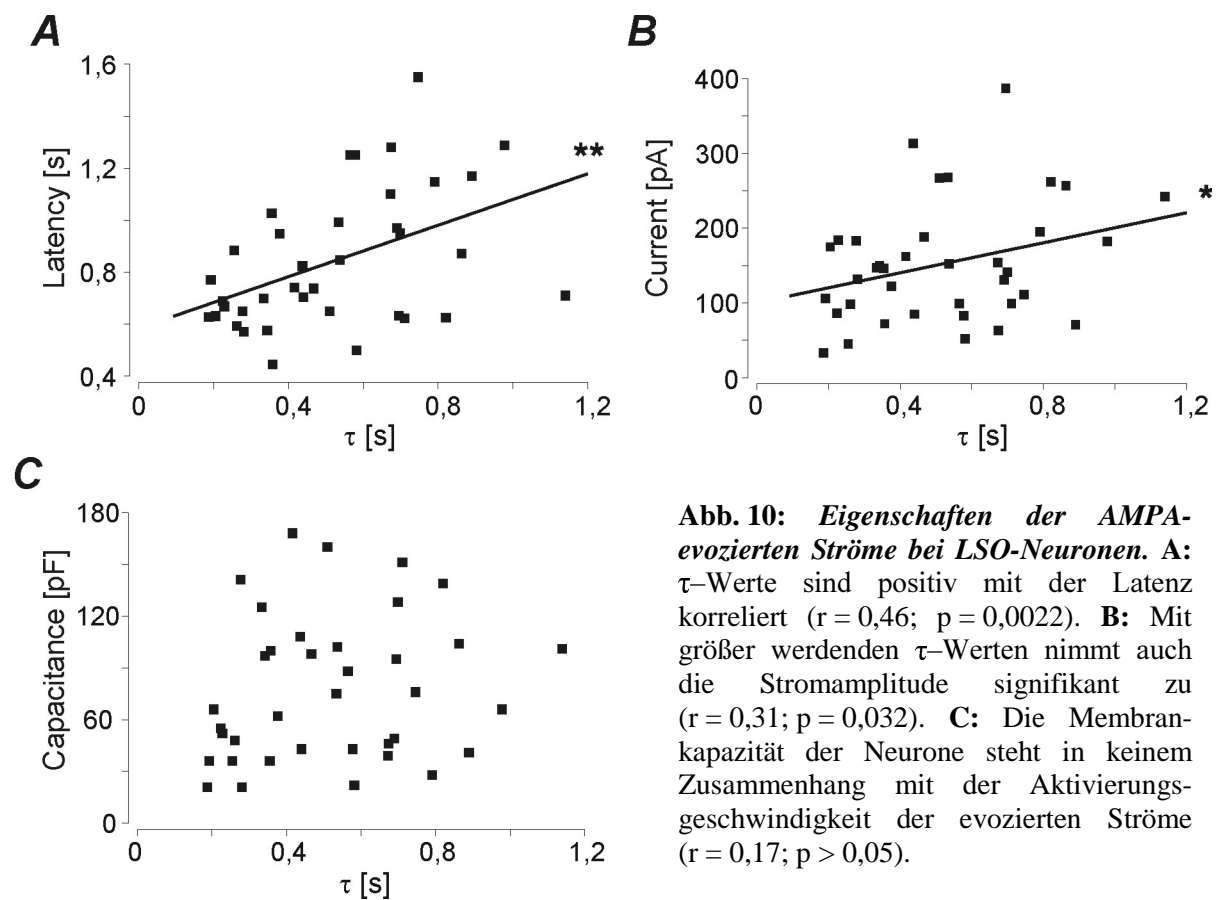


Abb. 9: AMPA-evozierte Ströme in Neuronen der LSO werden durch 100 μM GYKI 52466 vollständig und reversibel blockiert. Durch 200 μM AMPA evozierte Ströme in einem P3 Neuron vor, während und nach der Applikation von 100 μM GYKI 52466.

Die Stromantworten nach einer AMPA-Applikation zeigten einen charakteristischen Verlauf. Nach einer schnellen Anstiegsphase, mit einem mittleren τ von 522 ± 245 ms ($n = 37$), konnte ein Einwärtsstrom mit einer durchschnittlichen Amplitude von 152 ± 80 pA ($n = 37$) gemessen werden. Die mittlere Latenz betrug 843 ± 264 ms ($n = 37$). Nach Beendigung der Applikation kam es zu einer charakteristischen, sehr langsamen Abnahme der Strom-

Amplitude. Erst nach mehreren Sekunden (40 - 60 s) erreichte der Strom wieder seinen Ausgangswert.

Bei der weiteren Analyse einzelner AMPA-evozierter Ströme zeigte sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der Latenz und der Aktivierungszeitkonstanten τ der evozierten Ströme (Abb. 10A). Der Korrelationskoeffizient (r) hatte einen Wert von 0,46 bei einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0,0022$ ($n = 37$).



Auch die Stromamplitude zeigte mit einem r von 0,31 ($p = 0,032$; $n = 37$) eine signifikante Abhängigkeit von τ (Maß für die Geschwindigkeit des Stromanstiegs; Abb. 10B). Die τ -Werte hatten eine Spannweite von 953 ms (Minimum: 187 ms, Maximum: 1,14 s). Die Spannweite der Latenz betrug 1,104 s (Minimum: 446 ms, Maximum: 1,55 s).

Die Geschwindigkeit des Stromanstiegs war unabhängig von der Membran-Kapazität der LSO-Neurone ($r = 0,17$; $p > 0,05$; Abb. 10C). Die mittlere Kapazität der LSO-Neurone betrug 77 ± 42 pF ($n = 37$), mit einem Minimum von 21 pF und einem Maximum von 168 pF.

3.2.2 Altersabhängigkeit von AMPA-evozierten Strömen

Eine Analyse der AMPA-evozierten Ströme bezüglich einer möglichen Altersabhängigkeit ergab folgendes Bild (Abb. 11). Weder τ noch die Latenz war abhängig von dem Alter der

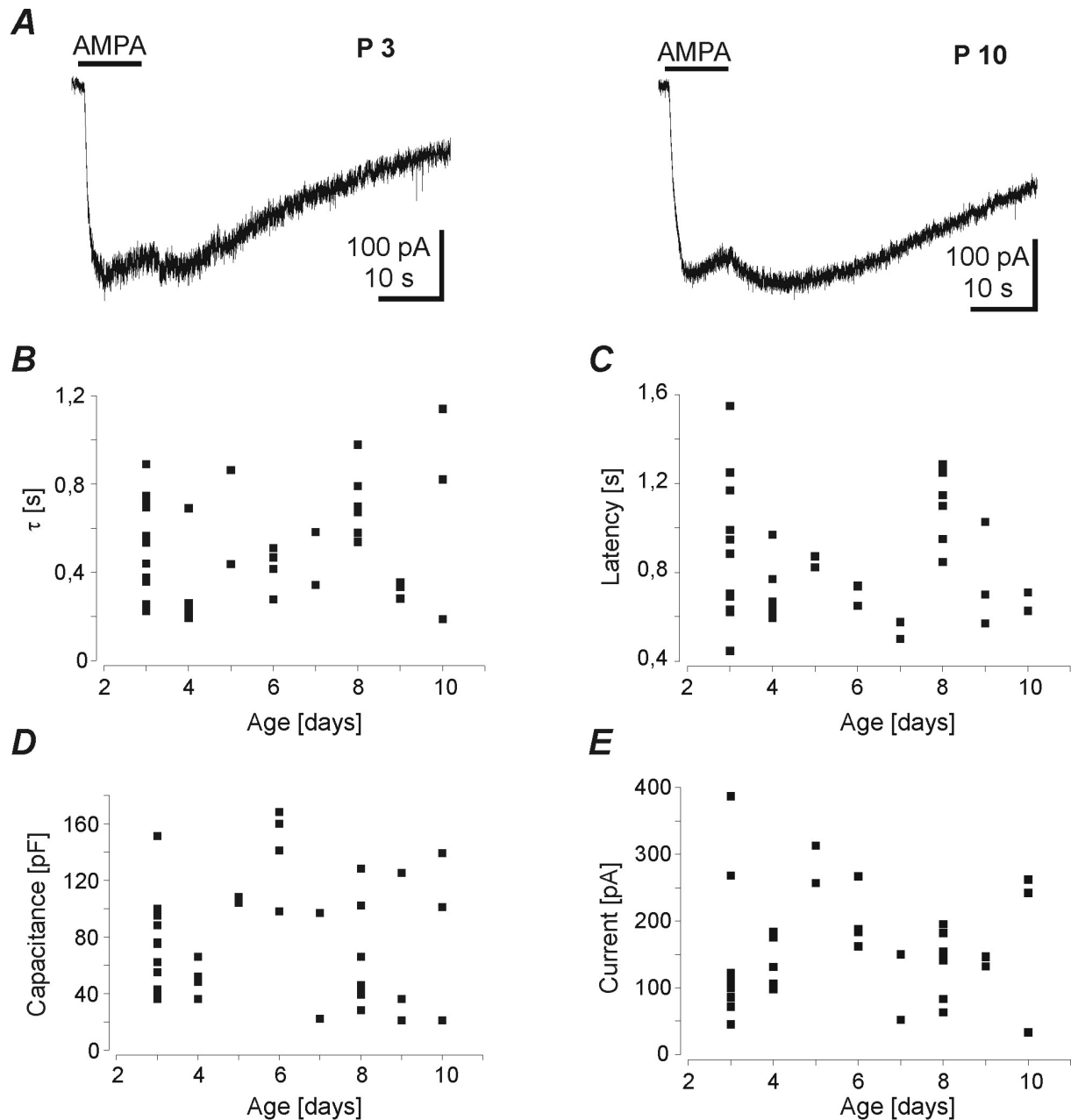


Abb. 11: Analyse der AMPA-evozierten Ströme bei LSO-Neuronen in Abhängigkeit vom Alter. A: Beispiele für AMPA-evozierte Ströme (200 μ M) in einem P3 und in einem P10 Neuron. **B, C:** Weder die τ -Werte ($r = 0,21$; $p > 0,05$) noch die Latenzen ($r = 0,01$; $p > 0,05$) der AMPA-evozierten Ströme verändern sich mit dem Alter. **D:** Es gibt keinen Zusammenhang zwischen der Membrankapazität der Neurone und dem Alter der Tiere ($r = 0,01$; $p > 0,05$). **E:** Die Stromamplituden stehen in keinem signifikanten Zusammenhang zu dem Alter der Tiere ($r = 0,07$; $p > 0,05$).

untersuchten Tiere ($r = 0,21$ bzw. $r = 0,01$; je $p > 0,05$; Abb. 11B u. C). Dies bedeutet, dass im Untersuchungszeitraum von P 3 bis P 10 die Unterschiede zwischen den evozierten Strömen rein zufällig verteilt waren. Auch die Kapazität der untersuchten Zellen zeigte keine Abhängigkeit vom Alter der Tiere ($r = 0,01$; $p > 0,05$; Abb. 11D). Ebenfalls unabhängig vom Alter der Tiere war die maximale Stromamplitude ($r = 0,07$; $p > 0,05$; Abb. 11E). Die mittlere Stromamplitude zwischen P 3 und P 10 betrug 152 ± 80 pA ($n = 37$).

3.2.3 Kainat-evozierte Ströme bei LSO-Neuronen

Die Applikation des Neurotoxins Kainat ((2S, 3S, 4S)-3-Carboxy-methyl-4-isopropenylpyrrolidine-2-carboxylic acid; $100 \mu\text{M}$) führte in LSO-Neuronen ($n = 37$) zu großen, einwärts gerichteten Strömen (Abb. 12A). Aufgrund von langsam aktivierenden Strömen (27%, $n = 10$) und zum Teil biphasischen Antworten (38%, $n = 14$), erreichten nur 35% ($n = 13$) der Stromantworten während der Applikation einen *Steady State*. Die mittlere Amplitude dieser Ströme betrug $1,6 \pm 0,4$ nA ($n = 13$).

Die Kainat-Applikationen erfolgten sowohl in $100 \mu\text{M}$ GYKI 52466 als auch in GYKI-freier Lösung jeweils frühestens eine Minute nach einer Applikation von $200 \mu\text{M}$ AMPA. Mit der Applikation von AMPA wurde die Wirkung von GYKI 52466 am AMPA-Rezeptor überprüft. Voraussetzung für die Versuche war die vollständige Blockierung der AMPA-evozierten Ströme (und dementsprechend auch der AMPA-Rezeptoren) durch GYKI 52466. Die Analyse der AMPA-evozierten Ströme wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln (siehe 3.2.1) dargestellt.

Im Gegensatz zu den AMPA-Applikationen wurden auch in der Anwesenheit des spezifischen AMPA-Rezeptor Blockers GYKI 52466 durch Kainat deutliche Einwärtsströme ausgelöst ($n = 37$; Abb. 12A u. B). Die erreichte maximale Amplitude war jedoch deutlich kleiner als die der Kainat-evozierten Ströme in GYKI-freier Lösung. Nur 15 (40%) der 37 GYKI-resistenten Ströme erreichten während der Kainat-Applikation einen *Steady State*. Die mittlere Amplitude dieser Ströme lag bei 217 ± 189 pA ($n = 15$).

Auffällig war, dass es zwei charakteristische Formen von Kainat-evozierten Strömen in der Gegenwart von GYKI 52466 gab. Neun der untersuchten LSO-Neurone zeigten einen sehr schnellen Einwärtsstrom als Antwort auf die Gabe von Kainat (Abb. 12B, links). In den übrigen 28 Neuronen wurden deutlich langsamere Ströme durch Kainat ausgelöst (Abb. 12B, rechts). Da jedoch nur 21% ($n = 6$) der langsam aktivierenden Ströme einen

Steady State erreichten, wurden nur diese bezüglich ihrer spezifischen Parameter *Amplitude*, *Aktivierungszeitkonstante* τ und *Latenz* ausgewertet.

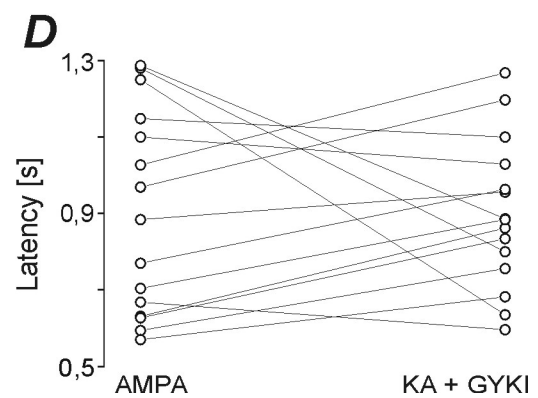
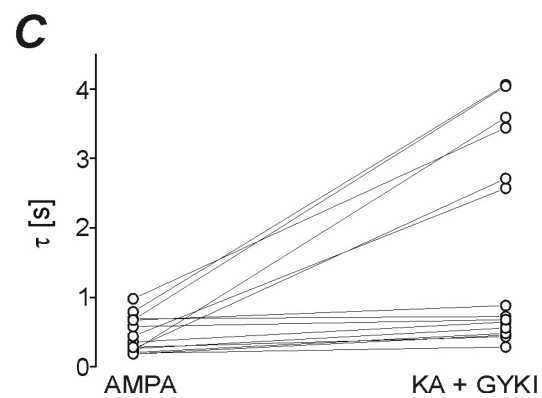
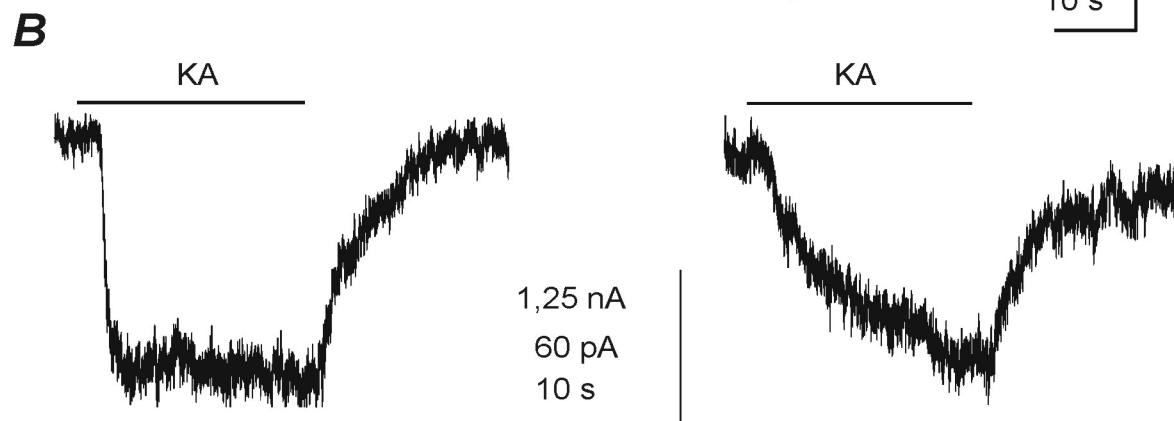
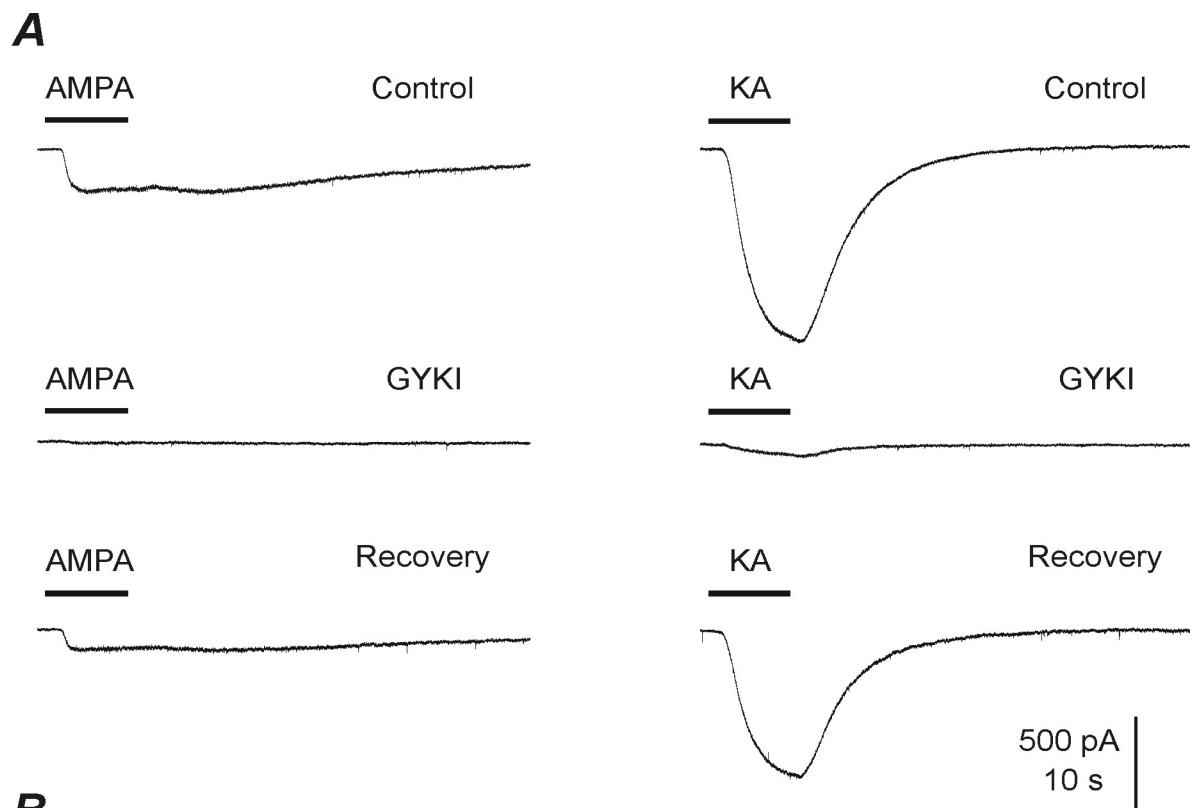


Abb. 12: Kainat-evozierte Ströme bei LSO-Neuronen in der Gegenwart von GYKI 52466. A: AMPA-evozierte Ströme (200 μ M) wurden komplett und reversibel von 100 μ M GYKI 52466 blockiert, während Kainat (100 μ M) bei den gleichen Zellen auch in der Gegenwart von GYKI 52466 Einwärtsströme evozierte. Dargestellt ist das Beispiel eines P3 Neurons. **B:** Kainat-evozierte Ströme in der Gegenwart von GYKI 52466 in zwei P4 Neuronen. Die GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme konnten nach ihren Aktivierungsgeschwindigkeiten in eine schnelle (links) und eine langsame (rechts) Gruppe unterteilt werden. **C:** Die Gruppe der schnellen Kainat-evozierten Ströme erreicht vergleichbare Aktivierungszeitkonstanten (τ -Werte) wie die AMPA-evozierten Ströme, während sich die langsame Gruppe durch signifikant größere τ -Werte auszeichnet ($p < 0,01$). **D:** Hinsichtlich der Latenzen gab es keine Unterschiede zwischen AMPA-evozierten und GYKI-resistenten Kainat-evozierten Strömen ($p > 0,05$).

Die GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme trennten sich, im Gegensatz zu den in den gleichen Zellen durch AMPA evozierten Strömen, hinsichtlich der Zeitkonstanten des Stromanstieges deutlich in 2 Gruppen auf, während sie sich im Hinblick auf die Latenz nicht unterschieden (Abb. 12C/D; Abb. 13A). Der Mittelwert der Zeitkonstanten τ für die schnellen Antworten lag bei 571 ± 180 ms ($n = 9$), mit einem Minimum von 285 ms und einem Maximum von 724 ms. Mit einem mittleren τ von $3,4 \pm 0,6$ s ($n = 6$) setzten sich die langsamen Antworten deutlich von den schnellen Antworten ab ($p < 0,01$). Die Spannweite der langsamen Antworten betrug 1,49 s (Minimum: 2,57 s, Maximum: 4,06 s). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant hinsichtlich ihrer Latenzen ($p > 0,05$). Die mittlere Latenz der schnellen Antworten lag bei 914 ± 220 ms ($n = 9$), die der langsamen Antworten bei 870 ± 168 ms ($n = 6$).

Auffällig war, dass sich die GYKI-resistenten schnellen und langsamen Kainat-evozierten Ströme auch signifikant in ihrer maximalen Amplitude unterschieden ($p < 0,01$; Abb. 13B). Die mittlere Amplitude der schnellen Ströme betrug 311 ± 192 pA ($n = 9$), während die langsamen Antworten im Durchschnitt nur eine Amplitude von 76 ± 40 pA ($n = 6$) erreichten. Die Membrankapazität der Zellen, die mit schnellen Einwärtsströmen auf die Kainat-Applikationen in der Gegenwart von GYKI 52466 reagierten, unterschied sich dagegen nicht signifikant von der Kapazität der Neurone mit langsamen Antworten ($p > 0,05$; Abb. 13C). So betrug die mittlere Membrankapazität der Zellen mit schnellen Antworten 42 ± 13 pF ($n = 9$), die der Zellen mit langsamen Antworten 48 ± 16 pF ($n = 6$).

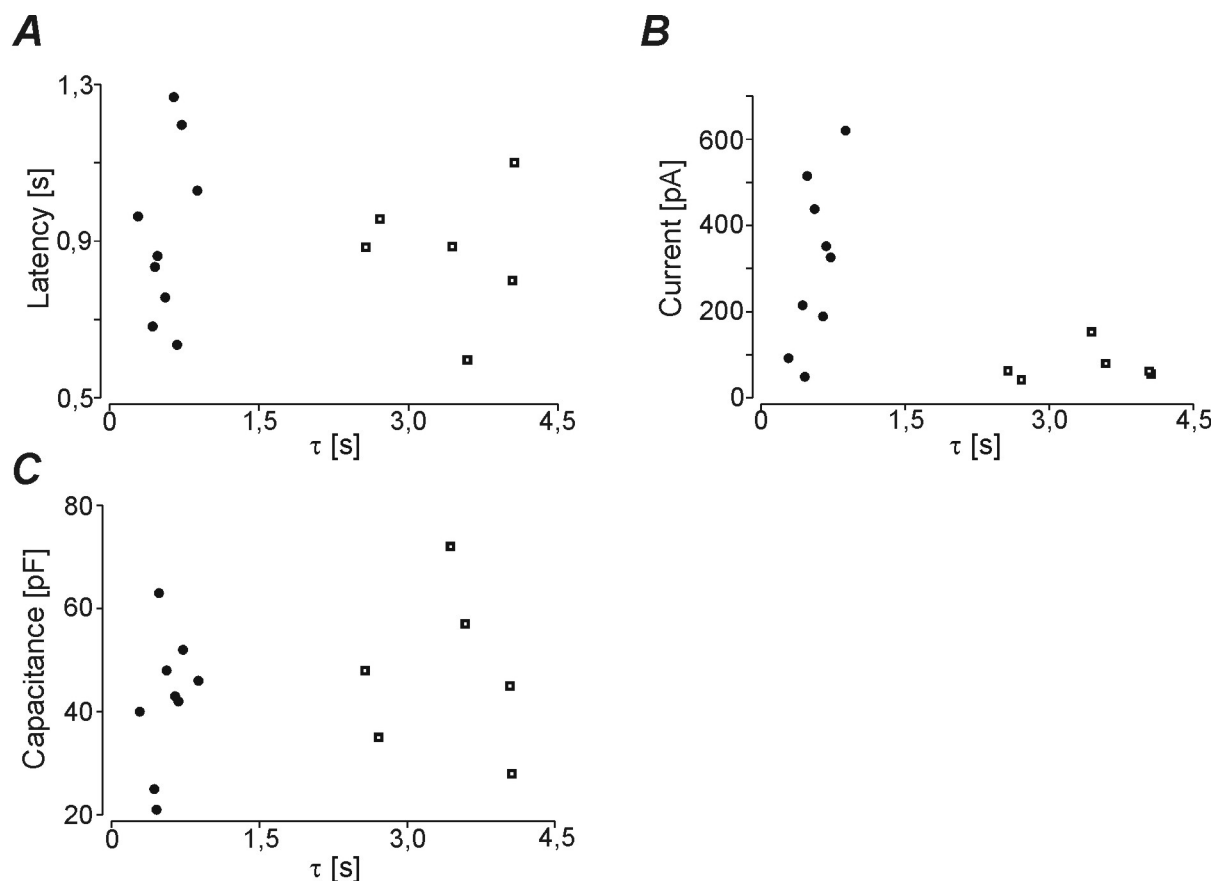


Abb. 13: Eigenschaften der Kainat-evozierten Ströme bei LSO-Neuronen in der Gegenwart von GYKI 52466. **A:** Zwei Gruppen von GYKI-resistenten Kainat-evozierten Strömen konnten unterschieden werden; solche mit kleinen τ -Werten (\bullet) und solche mit signifikant langsameren τ -Werten (\square ; $p < 0,01$). Bezüglich der Latenzen gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,05$). **B:** Die Gruppe mit den schnellen Antworten erreichte im Mittel eine signifikant größere Amplitude als die Gruppe mit den langsamen Aktivierungszeiten ($p < 0,01$). **C:** Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine Unterschiede im Hinblick auf die Membrankapazität der Neurone ($p > 0,05$).

3.2.4 Altersabhängigkeit von GYKI-resistenten Kainat-evozierten Strömen

Schnelle und langsame Kainat-evozierte Ströme in der Anwesenheit von GYKI 52466 konnten sowohl bei LSO-Neuronen von jungen Tieren (P3 / P4) als auch bei LSO-Neuronen von älteren Tieren (P8 – P10) nachgewiesen werden. (Abb. 14).

Die τ -Werte der langsamen GYKI-resistenten Ströme wurden mit zunehmendem Alter der Tiere größer ($r = 0,83$; $p = 0,041$). Im Gegensatz dazu waren die τ -Werte der schnellen Antworten nicht signifikant mit dem Alter der Tiere korreliert ($r = 0,17$; $p > 0,05$; Abb. 14B). Die Latenzen der schnellen Antworten wie auch die der langsamen Antworten waren im

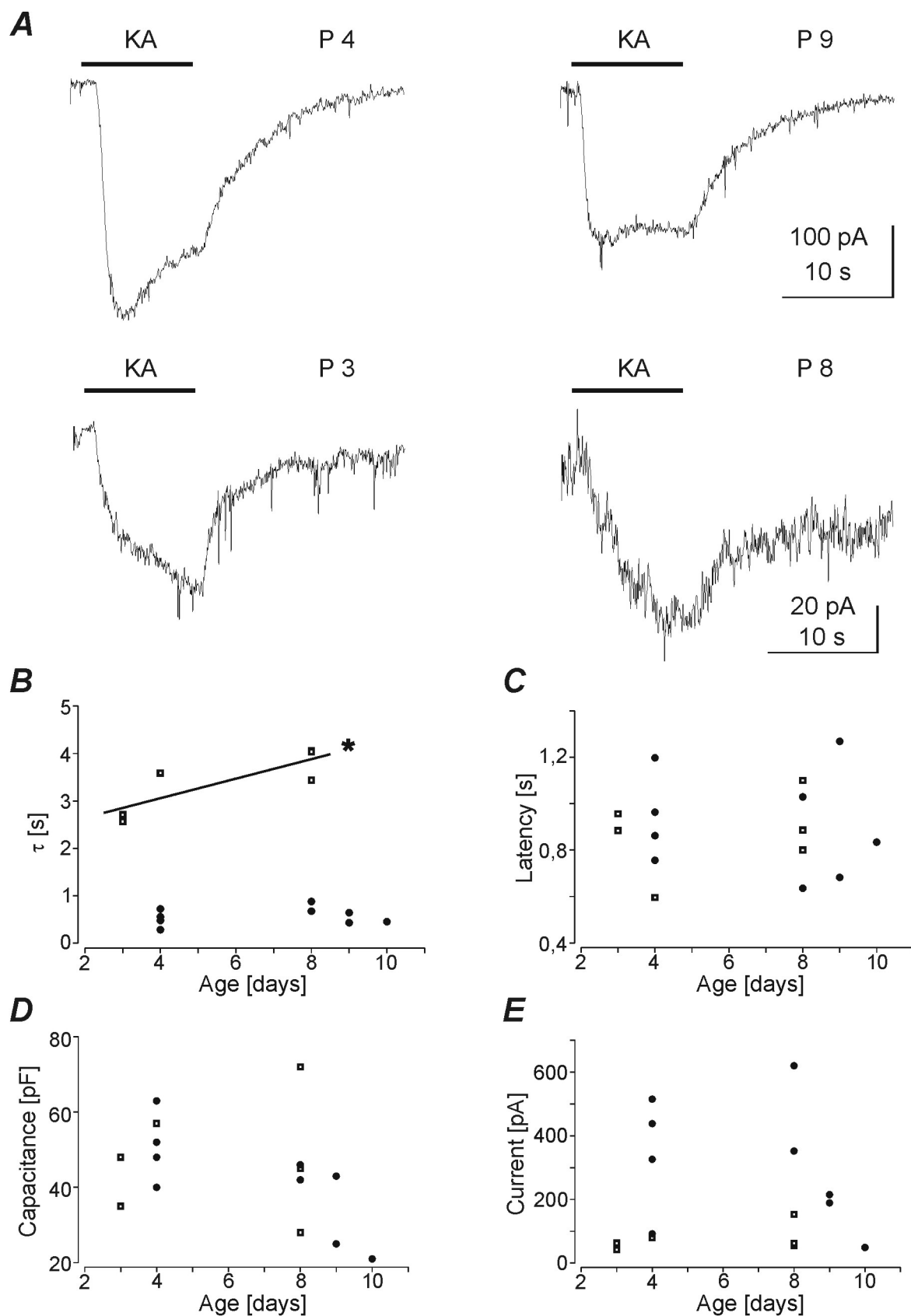


Abb. 14: Analyse der GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme in LSO-Neuronen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. **A:** Beispiele für schnelle und langsame GYKI-resistente Kainat-evozierte Ströme in jungen (P4 u. P3) und alten Neuronen (P9 u. P8). **B:** Die τ -Werte der langsamen

Antworten (\square) zeigten eine Korrelation zum Alter ($r = 0,83$; $p = 0,041$). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter und den τ -Werten der schnellen Antworten (\bullet , $r = 0,17$; $p > 0,05$). **C:** Die Latenzen beider Gruppen waren nicht signifikant mit dem Alter korreliert (\square , $r = 0,28$; \bullet , $r = -0,12$; je $p > 0,05$). **D:** Es gibt keinen Zusammenhang zwischen der Membrankapazität der Neurone und dem Alter (\square , $r = 0,11$; \bullet , $r = -0,73$; je $p > 0,05$). **E:** Weder die Stromamplituden der langsamen Antworten noch die der schnellen Antworten stehen in einem signifikanten Zusammenhang zu dem Alter (\square , $r = 0,42$; \bullet , $r = -0,31$; je $p > 0,05$).

Untersuchungszeitraum unabhängig vom Alter ($r = -0,12$ bzw. $r = 0,28$; je $p > 0,05$; Abb. 14C). Die Analyse der Kapazitäten zeigte, dass sowohl die Membrankapazität der Zellen mit schnellen Antworten als auch die Membrankapazität der Zellen mit langsamen Antworten nicht signifikant mit dem Alter korreliert war ($r = -0,73$ bzw. $r = 0,11$; je $p > 0,05$; Abb. 14D).

Bei der Analyse der Amplituden im Hinblick auf die Entwicklung der Tiere ergab sich folgendes Bild: Die Amplituden der schnellen Kainat-evozierten Ströme waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes unabhängig vom Alter ($r = -0,31$; $p > 0,05$; Abb. 14E). Entsprechendes gilt für die langsamen Kainat-evozierten Ströme. Auch deren Amplituden zeigten zwischen P 3 und P 10 keine entwicklungsbedingte Tendenz ($r = 0,42$; $p > 0,05$; Abb. 14E).

3.2.5 Die Wirkung spezifischer Kainat-Rezeptor Agonisten

In einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ führte der spezifische Kainat-Rezeptor Agonist SYM 2081 ((2S, 4R)-4-Methylglutamat) bei LSO-Neuronen (P3 – P10) zu schnellen Einwärtsströmen (Abb. 15A). SYM 2081 ist in der verwendeten Konzentration hoch spezifisch für die Glutamat-Rezeptor Untereinheiten GluR5 und 6 (Zhou, 1997; Donevan et al., 1998). Die evozierten Ströme aktivierten schnell und zeigten nach einem Spitzen-Wert eine Desensibilisierung. Der Wert der Zeitkonstanten τ betrug $260 \pm 170 \text{ ms}$ ($n = 10$). Die Latenz der Antworten war vergleichbar mit den Latenzen der Kainat- und AMPA-evozierten Ströme, sie lag im Mittel bei $844 \pm 247 \text{ ms}$ ($n = 10$). Im Durchschnitt wurde eine Amplitude von $97 \pm 103 \text{ pA}$ ($n = 10$) erreicht.

Mit SYM 2081 wurden auch in der Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ des spezifischen AMPA-Rezeptor Blockers GYKI 52466 schnelle Einwärtsströme ausgelöst (Abb. 15A). Die evozierten Ströme hatten eine mittlere Amplitude von $55 \pm 63 \text{ pA}$ ($n = 7$) und zeigten damit

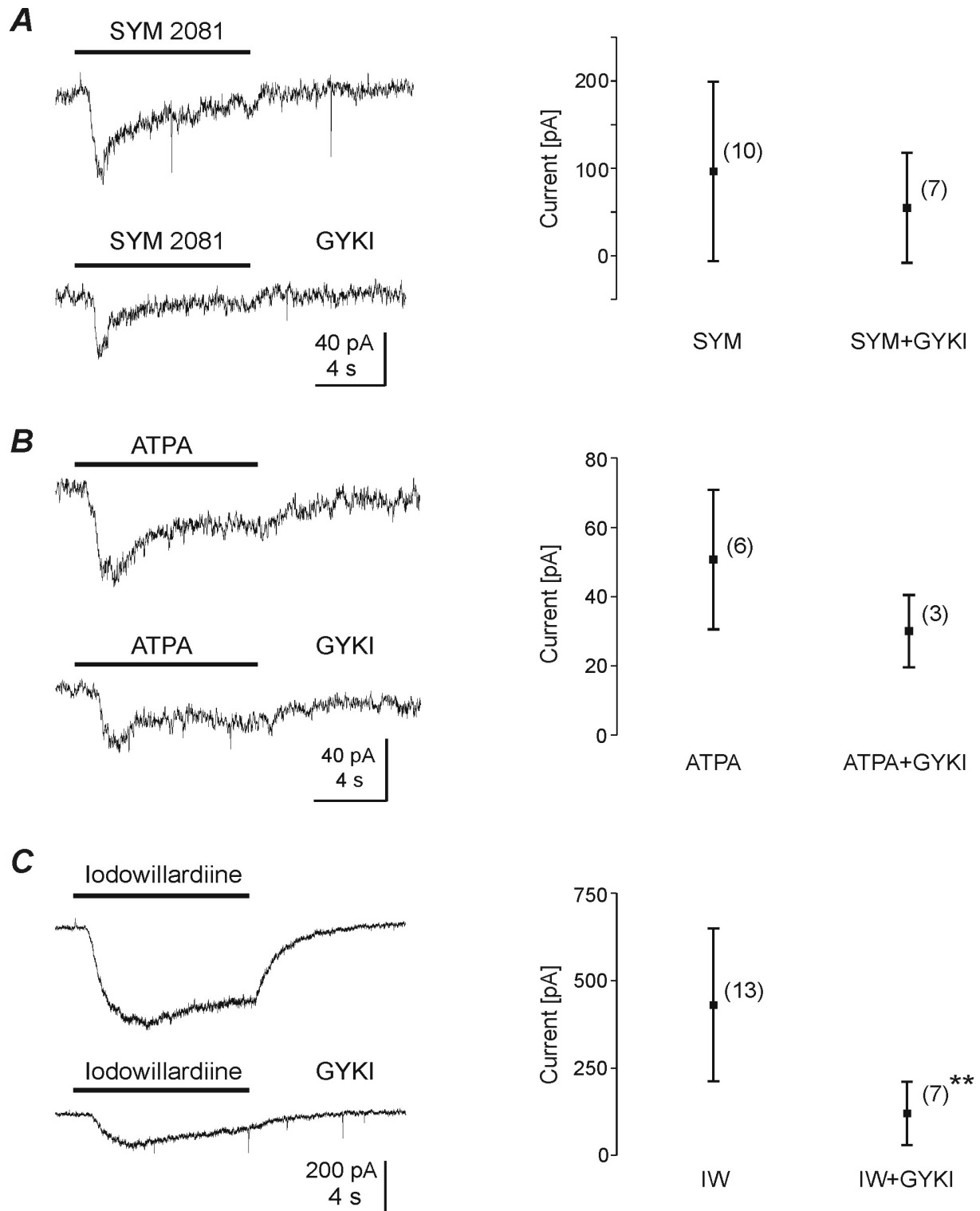


Abb. 15: Spezifische Kainat-Rezeptor Agonisten evozieren Ströme bei LSO-Neuronen. A: SYM 2081 (10 μ M) evozierte sowohl in der Anwesenheit als auch in der Abwesenheit von GYKI 52466 (100 μ M) Ströme in LSO-Neuronen; hier dargestellt am Beispiel eines P4 Neurons. GYKI 52466 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die erreichten Stromamplituden ($p > 0,05$). **B:** ATPA (10 μ M) führte auch in der Gegenwart von GYKI 52466 in LSO-Neuronen zu Einwärtsströmen. Die Stromamplitude wurde von GYKI 52466 nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$). Die Originalaufnahme stammt von einem P4 Neuron. **C:** (S)-5-Iodowillardiine-evozierte Ströme (1 μ M) wurden signifikant von 100 μ M GYKI 52466 gehemmt ($p < 0,01$). (Beispiel = P4 Neuron)

keine signifikante Abweichung von den SYM 2081-evozierten Strömen in GYKI-freier Lösung ($p > 0,05$; Abb. 15A, rechts). Auch die τ -Werte sowie die Latenzen unterschieden sich nicht signifikant von den in GYKI-freier Lösung gemessenen Werten ($p > 0,05$). Die Latenz lag im Durchschnitt bei 918 ± 186 ms, während τ einen Mittelwert von 227 ± 126 ms erreichte.

Auch mit ATPA ((RS)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5-^Lbutylisoxazol-4-yl) propanoic acid), einem spezifischen Kainat-Rezeptor Agonisten mit hoher Selektivität für die Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluR5 (Clarke et al., 1997; Vignes et al., 1998), wurden schnelle Einwärtsströme in LSO-Neuronen (P3 – P10) ausgelöst (Abb. 15B). Insgesamt konnten bei 6 von 8 untersuchten Zellen mit $10 \mu\text{M}$ ATPA Einwärtsströme evoziert werden. Die Antworten waren den mit SYM 2081 evozierten Antworten sehr ähnlich. Nach einem anfänglichen schnellen Spitzenstrom (der Wert der Zeitkonstanten τ betrug im Mittel 530 ± 408 ms; $n = 6$), folgte für die weitere Dauer der Applikation ein kontinuierlicher Einwärtsstrom geringerer Amplitude. Die durchschnittliche Spitzen-Amplitude der Antworten lag bei 51 ± 20 pA ($n = 6$). Die evozierten Ströme folgten den jeweiligen Applikationen mit einer mittleren Latenz von 880 ± 292 ms ($n = 6$).

GYKI 52466 hatte lediglich einen Einfluss auf die Amplitude der ATPA-evozierten Ströme, der jedoch nicht signifikant war ($p > 0,05$; Abb. 15B, rechts). Die mittlere Spitzen-Amplitude in der Anwesenheit von GYKI 52466 betrug 30 ± 10 pA. Mit einem mittleren τ von 722 ± 916 ms und einer durchschnittlichen Latenz von 1054 ± 120 ms zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen ATPA-evozierten Strömen in GYKI-freier und -haltiger Lösung ($p > 0,05$).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Versuche mit (S)-5-Iodowillardiine ((S)-(-)- α -Amino-5-iodo-3, 4-dihydro-2, 4-dioxo-1(2H) pyridinepropanoic acid) durchgeführt. (S)-5-Iodowillardiine ist ein Agonist an der Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluR5 (Swanson et al., 1998) und somit ebenfalls ein spezifischer Agonist an Kainat-Rezeptoren. $1 \mu\text{M}$ (S)-5-Iodowillardiine löste große Einwärtsströme bei LSO-Neuronen (P2 – P9) aus ($n = 13$; Abb. 15C). Verglichen mit den durch SYM 2081 oder ATPA evozierten Strömen waren die durch (S)-5-Iodowillardiine evozierten Ströme deutlich langsamer und erreichten größere Amplituden. Im Mittel erreichten die Antworten eine Amplitude von 430 ± 219 pA mit einem τ -Wert von $1,32 \pm 0,92$ s und einer Latenz von 873 ± 205 ms ($n = 13$).

GYKI 52466 hatte auch bei den durch (S)-5-Iodowillardiine evozierten Strömen einen hemmenden Effekt, der jedoch im Gegensatz zu den ATPA- bzw. SYM 2081-Applikationen hoch signifikant war ($p < 0,01$; Abb. 15C, rechts). Die mittlere Amplitude in der Gegenwart von GYKI 52466 betrug 120 ± 91 pA ($n = 7$). Vergleichbar mit den Antworten der Agonisten SYM 2081 und ATPA wirkte sich die Applikation von GYKI 52466 nur auf die Amplitude, nicht aber auf die Latenz oder die Geschwindigkeit der (S)-5-Iodowillardiine-evozierten Ströme aus. Im Mittel hatten die evozierten Ströme in GYKI-haltiger Lösung einen τ -Wert von $1,35 \pm 0,83$ s und eine Latenz von 922 ± 184 ms ($n = 7$).

3.2.6 Der Einfluss von Concanavalin A auf Glutamat-evozierte Ströme

Das Lektin Concanavalin A (aus *Canavalia Ensiformis*) führte in 14 von 17 untersuchten LSO-Neuronen (P2 – P7) zu einer Potenzierung von Glutamat-evozierten Strömen (Abb. 16).

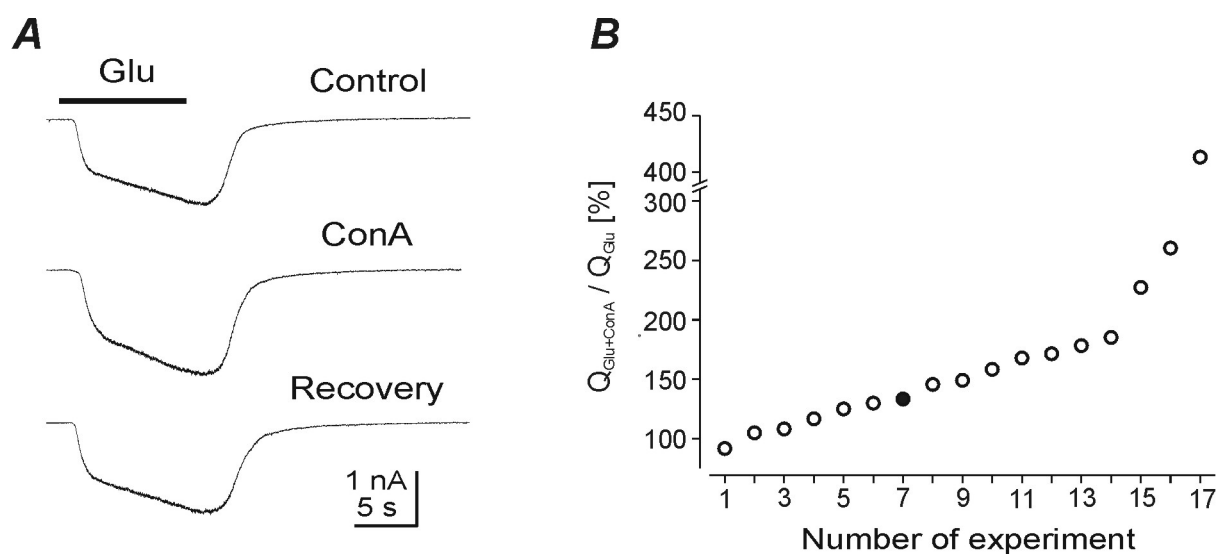


Abb. 16: Concanavalin A potenziert Glutamat-evozierte Ströme in LSO-Neuronen. **A:** Glutamat-evozierte Ströme in einem P4 Neuron vor, während und nach der Applikation von 0,3 mg/ml Con A. **B:** Con A potenzierte in der Mehrzahl der untersuchten Neurone die durch Glutamat ausgelösten Antworten. (● = Wert des in A gezeigten Neurons)

In dieser Versuchsreihe wurde Glutamat in einer Konzentration von 1 mM appliziert, um zu gewährleisten, dass Kainat- und AMPA-Rezeptoren annähernd zu gleichen Teilen aktiviert wurden und es zu keinen Unterschieden bezüglich der Desensibilisierung der Rezeptoren kommen konnte. Glutamat induzierte große, sehr variable Einwärtsströme (Abb. 16A). Aufgrund der hohen Variabilität des Stromverlaufs mit zum Teil biphasischen Antworten

(12% in Con A-freier Lösung; 23% in Con A-haltiger Lösung), wurde nicht die Stromamplitude bestimmt, sondern die als Folge der Glutamat-Applikation über die Membran verschobene Ladungsmenge (Q). Hierzu wurde jeweils das Integral über den evozierten Strom bestimmt.

Im Mittel erfolgte nach einer Applikation von Glutamat eine Ladungs-Verschiebung von 14 ± 17 nC ($n = 17$). In der Anwesenheit von 0,3 mg/ml Con A erhöhte sich die mittlere verschobene Ladungsmenge auf 20 ± 20 nC ($n = 17$). Dementsprechend wurden die Glutamat-evozierten Antworten durch Con A um durchschnittlich $167 \pm 77\%$ ($n = 17$) potenziert (Abb. 16B).

3.3 Analyse ionotroper Glutamat-Rezeptoren bei MNTB-Neuronen

3.3.1 AMPA- und Kainat-evozierte Ströme bei MNTB-Neuronen

In allen untersuchten MNTB-Neuronen ($n = 8$) löste sowohl AMPA als auch Kainat deutliche einwärts gerichtete Ströme aus (Abb. 17). Die durch 200 μ M AMPA hervorgerufenen Ströme zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die AMPA-evozierten Ströme bei LSO-Neuronen (Abb. 17). Nach einer schnellen Aktivierung des Stromes folgte eine langsame Deaktivierung, die bis zu 60 s dauern konnte. Im Gegensatz zu den bei LSO-Neuronen gemessenen Stromantworten löste 100 μ M Kainat in MNTB-Neuronen große Einwärtsströme aus, die immer einen *Steady State* erreichten.

AMPA-evozierte Ströme wurden durch 100 μ M GYKI 52466 stets vollständig und reversibel blockiert, während die durch Kainat hervorgerufenen Antworten nur in einer Zelle vollständig blockiert wurden. In allen anderen MNTB-Neuronen ($n = 7$) zeigte sich ein GYKI-resistenter Strom nach der Applikation von Kainat (Abb. 17).

Während im Hinblick auf die Latenzen keine signifikanten Unterschiede zwischen AMPA-Applikationen (845 ± 448 ms) und Kainat-Applikationen in der Gegenwart von GYKI 52466 (1230 ± 590 ms) festgestellt werden konnten ($p > 0,05$; $n = 7$; Abb. 17C; Abb. 18A), zeigten sich deutliche Unterschiede in den Aktivierungsgeschwindigkeiten der Ströme ($p < 0,05$; Abb. 17B; Abb. 18A). Den durchweg schnellen AMPA-evozierten Strömen ($\tau = 269 \pm 81$ ms, $n = 7$) stehen die mit einem mittleren τ von $2,9 \pm 2,5$ s ($n = 7$) langsameren GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme gegenüber. Im Gegensatz zu den LSO-Neuronen konnte jedoch nur

1 Gruppe (LSO-Neurone = 2 Gruppen) Kainat-evozierter Ströme in der Präsenz von GYKI 52466 nachgewiesen werden (Abb. 18A).

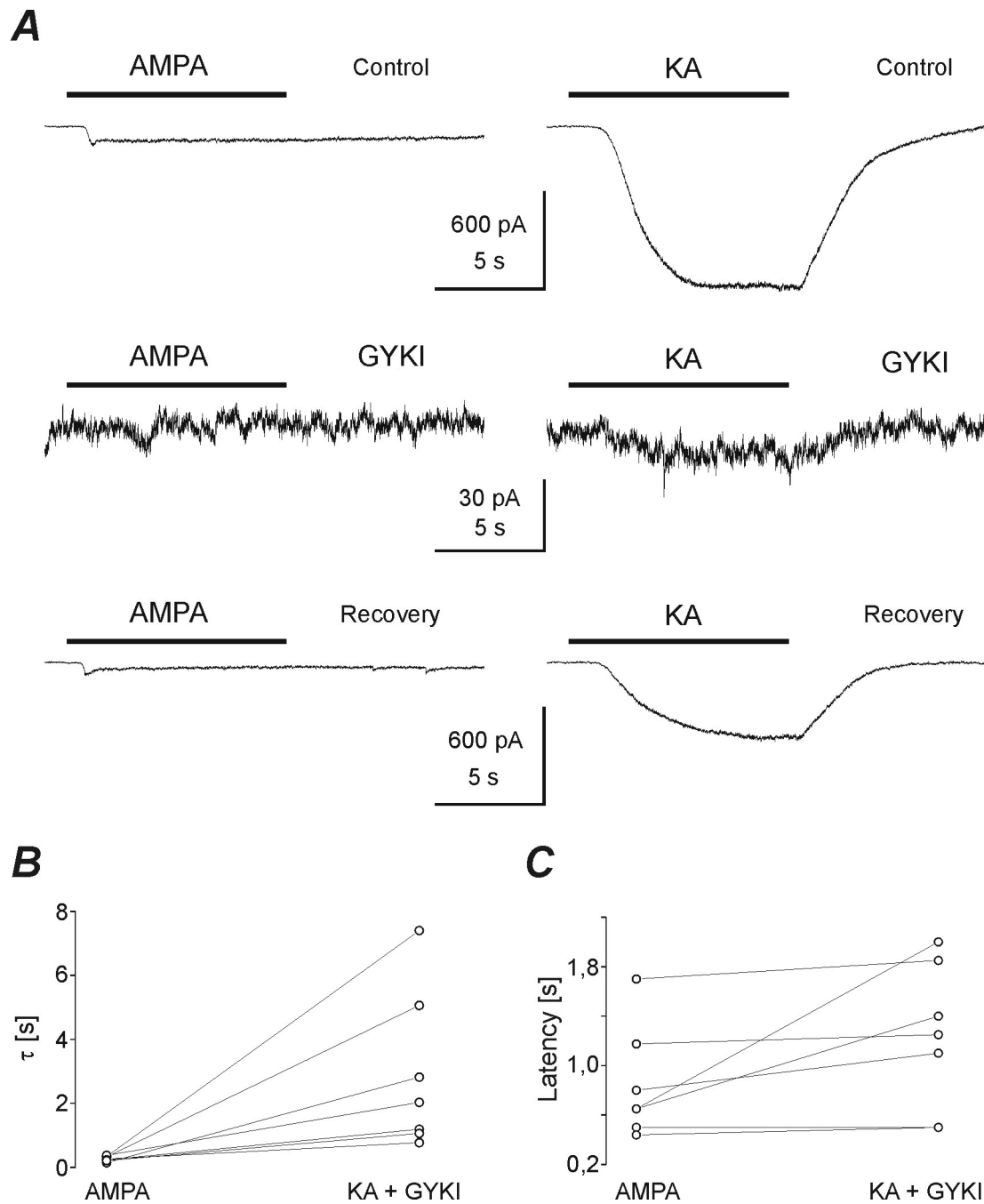


Abb. 17: AMPA- und Kainat-evozierte Ströme bei MNTB-Neuronen. **A:** AMPA-evozierte Ströme ($200\mu\text{M}$) werden vollständig durch GYKI 52466 ($100\mu\text{M}$) blockiert. Im Gegensatz dazu löst Kainat ($100\mu\text{M}$) auch in der Anwesenheit von GYKI 52466 noch Ströme aus. **B:** Vergleich der Aktivierungszeitkonstanten (τ -Werte) von AMPA-evozierten Strömen und GYKI-resistenten Kainat-evozierten Strömen. **C:** GYKI-resistente Kainat-evozierte Ströme im Vergleich mit AMPA-evozierten Strömen anhand der Latenzen.

Hinsichtlich der Stromamplituden zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen AMPA- und GYKI-resistenten Kainat-evozierten Antworten ($p < 0,05$, Abb. 18B). Die mittlere Amplitude der AMPA-Antworten betrug 76 ± 34 pA ($n = 7$), die Amplitude der in der Gegenwart von GYKI 52466 durch Kainat hervorgerufenen Antworten hatte einen mittleren Wert von 20 ± 13 pA ($n = 7$).

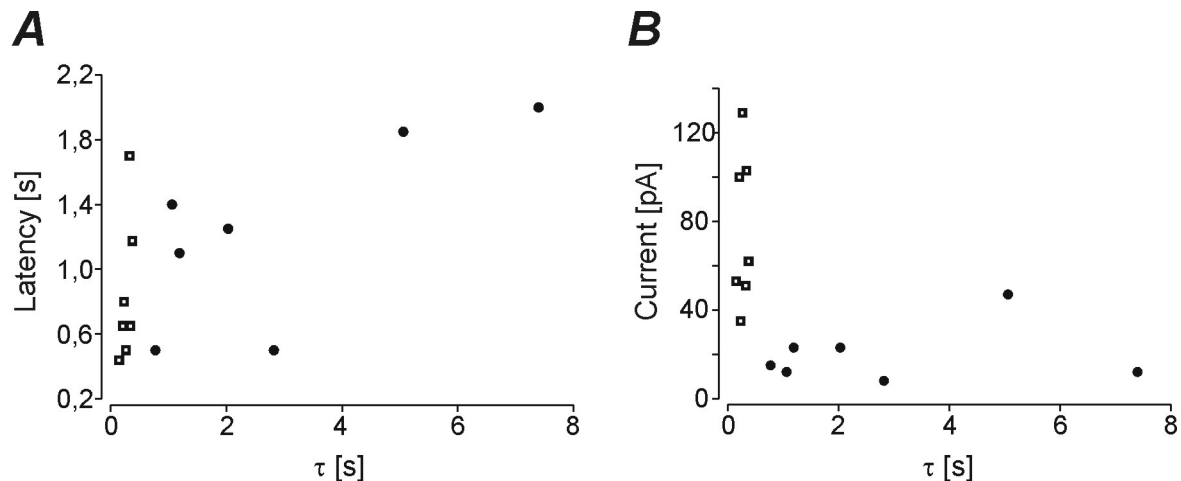


Abb. 18: Eigenschaften der AMPA- und Kainat-evozierten Ströme bei MNTB-Neuronen. **A:** Die AMPA-evozierten Ströme (\square) und die GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme (\bullet) unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Latenzen ($p > 0,05$). Die mittleren τ -Werte der Kainat-evozierten Ströme waren jedoch signifikant größer als die der AMPA-evozierten Ströme ($p < 0,05$). **B:** Die Amplitude der AMPA-evozierten Ströme war signifikant größer als die der GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme ($p < 0,05$).

3.3.2 Altersabhängigkeit von AMPA-evozierten Strömen und GYKI-resistenten Kainat-evozierten Strömen

Zwischen P 3 und P 9 zeigten sich für AMPA-evozierte Ströme (\square) und GYKI-resistente Kainat-evozierte Ströme (\bullet) weder signifikante Korrelationen zwischen τ und dem Alter (\square , $r = 0,34$; \bullet , $r = -0,35$; je $p > 0,05$) noch zwischen der Latenz und dem Alter (\square , $r = 0,22$; \bullet , $r = -0,41$; je $p > 0,05$; Abb. 19A u. B). Auch die Kapazität der Neurone war im Untersuchungszeitraum unabhängig vom Alter verteilt ($r = 0,41$; $p > 0,05$; Abb. 19C). Im Durchschnitt hatten die Zellen eine Membrankapazität von 26 ± 10 pF ($n = 8$).

Die Analyse der Stromamplituden in Abhängigkeit vom Alter der Tiere ergab ein mit den LSO-Neuronen vergleichbares Bild. Es zeigte sich, dass weder die Amplitude der AMPA-evozierten Ströme ($r = 0,47$; $p > 0,05$) noch die Amplitude der GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme ($r = 0,02$; $p > 0,05$) vom Alter der Tiere abhängig war (Abb. 19D).

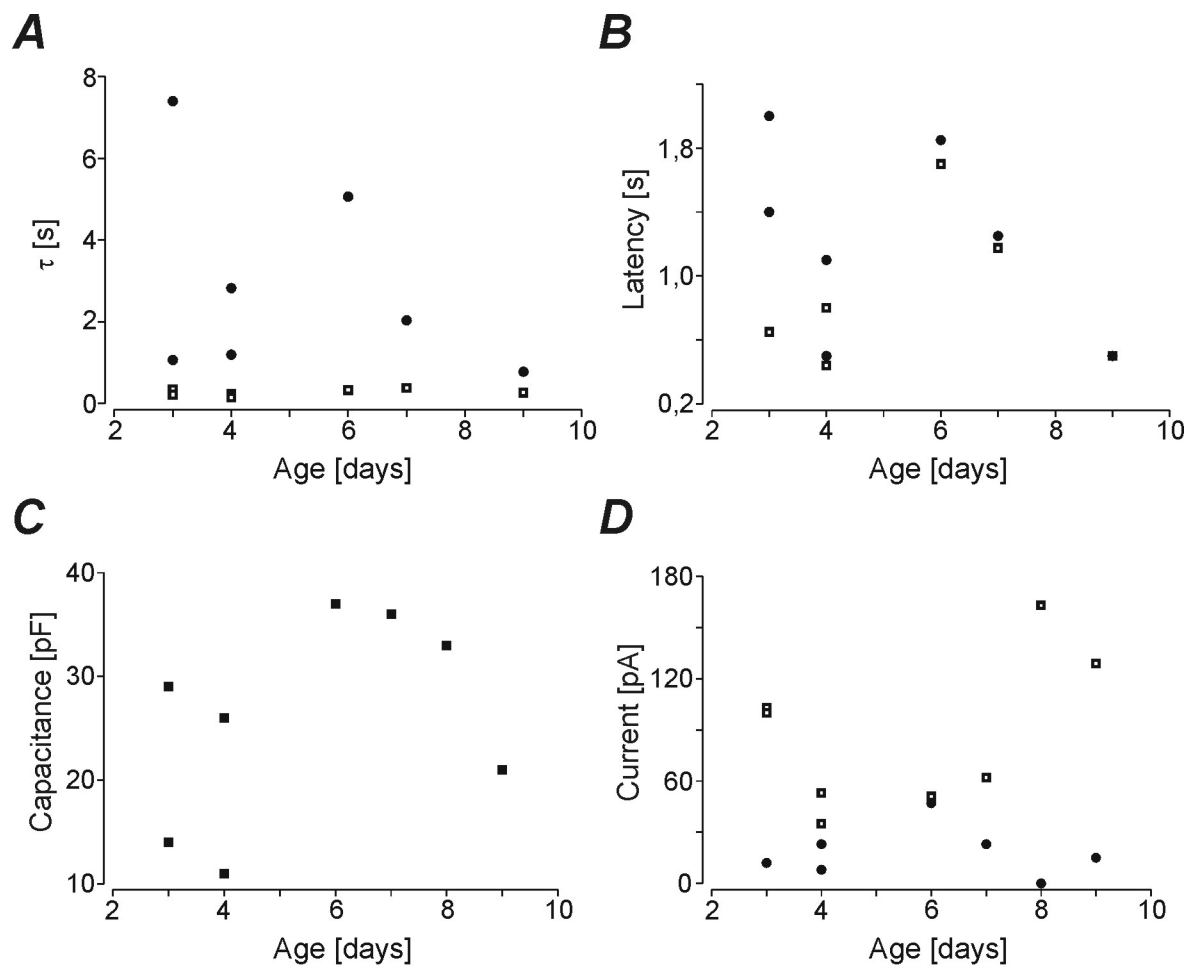


Abb. 19: Altersabhängigkeit der AMPA- und Kainat-evozierten Ströme bei MNTB-Neuronen. **A:** Die Aktivierungszeitkonstanten der AMPA-evozierten (□) und GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme (●) zeigten keine Abhängigkeit vom Alter (□, $r = 0,34$; ●, $r = -0,35$; je $p > 0,05$). **B:** Die Latenzen von AMPA-evozierten und GYKI-resistenten Kainat-evozierten Strömen waren nicht signifikant mit dem Alter korreliert (□, $r = 0,22$; ●, $r = -0,41$; je $p > 0,05$). **C:** Die Membrankapazität der Neurone war unabhängig vom Alter ($r = 0,41$; $p > 0,05$). **D:** Sowohl die Amplituden der AMPA-evozierten Ströme als auch die Amplituden der GYKI-resistenten Kainat-evozierten Ströme waren unabhängig vom Alter (□, $r = 0,47$; ●, $r = 0,02$; je $p > 0,05$).

3.3.3 Die Wirkung des spezifischen Kainat-Rezeptor Agonisten ATPA

Der spezifische Kainat-Rezeptor Agonist ATPA führte bei 4 untersuchten MNTB-Neuronen (P4 – P9) zu schnellen Einwärtsströmen, die nach einem Spitzenstrom eine Desensibilisierung zeigten (Abb. 20). Mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ löste ATPA Ströme aus, die im Durchschnitt eine Spitzen-Amplitude von $28 \pm 10 \text{ pA}$ erreichten ($n = 4$).

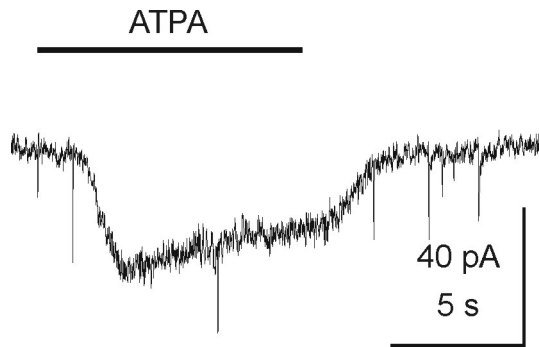


Abb. 20: ATPA-evozierter [10 μ M] Strom in einem P11 MNTB-Neuron.

3.3.4 Der Einfluss von Concanavalin A auf Glutamat-evozierte Ströme

Glutamat löste bei 18 untersuchten MNTB-Neuronen (P4 – P11) sehr variable einwärts gerichtete Ströme aus (Abb. 21). Ebenso wie in den Versuchen an LSO-Neuronen wurde in dieser Versuchsreihe Glutamat appliziert, um zu gewährleisten, dass Kainat- und AMPA-Rezeptoren annähernd zu gleichen Teilen aktiviert wurden und es zu keinen Unterschieden bezüglich der Desensibilisierung der Rezeptoren kommen konnte. Aufgrund der hohen Variabilität des Stromverlaufs und einem zudem hohen Anteil biphasischer Antworten (50%), wurde die über die Membran verschobene Ladungsmenge (Q) als Maß für die Größe der Antworten bestimmt.

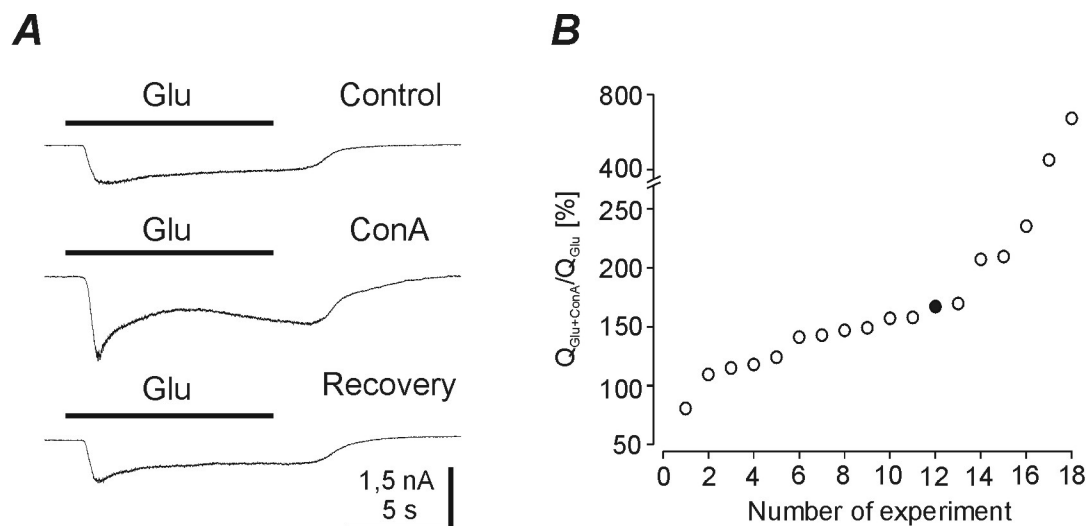


Abb. 21: Concanavalin A potenziert Glutamat-evozierte Ströme bei MNTB-Neuronen. **A:** Glutamat-evozierte Ströme vor, während und nach der Applikation von 0,3 mg/ml Con A bei einem P4 Neuron. **B:** Con A potenzierte in der Mehrzahl der untersuchten Neurone die durch Glutamat ausgelösten Antworten. (● = Wert des in A gezeigten Neurons)

Im Mittel wurde mit einer Applikation von 1 mM Glutamat eine Ladungsverschiebung von 10 ± 5 nC ($n = 18$) ausgelöst. Concanavalin A (0,3 mg/ml) hatte, mit Ausnahme von einer Zelle, eine potenzierende Wirkung auf die durch Glutamat ausgelösten Antworten (Abb. 21A u. B). In der Gegenwart von Con A führte die Applikation von Glutamat zu einer durchschnittlichen Ladungsverschiebung von 18 ± 14 nC ($n = 18$). Dies entspricht einer mittleren Potenzierung von $198 \pm 144\%$ ($n = 18$; Abb. 21B). Der Anteil biphasischer Antworten stieg in Con A-haltiger Lösung auf 78% ($n = 18$) an.

4 Diskussion

4.1 Das Applikationssystem

Die Überprüfung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Applikationssystems zeigte eindeutig, dass es sich um ein zuverlässig und akkurat schaltendes System handelt. Bis zu 7 verschiedene Kanäle können für die Applikation von Pharmaka verwendet werden, wobei ein zusätzlicher zentral angeordneter Spülkanal (i.d.R. Badlösung) gewährleistet, dass zwischen den einzelnen Kanälen, ohne Vermischung der jeweiligen Substanzen, gewechselt werden kann. Mit den Liquid-Junction-Potential Messungen konnte klar gezeigt werden, dass sich die einzelnen Kanäle in Bezug auf ihr Schaltverhalten nicht unterscheiden. Es zeigten sich weder signifikante Unterschiede bezüglich der Geschwindigkeit des Konzentrationsaufbaus (gemessen als Zeitkonstante τ der Aktivierung) noch hinsichtlich der Latenzen oder der erreichten Amplituden der Antworten.

Das Applikationssystem bietet zwei Möglichkeiten der Applikation. Zum einen besteht die Möglichkeit der sogenannten Puls-Applikation. Die Puls-Applikation zeichnet sich dadurch aus, dass stets ein Kanal des Systems geöffnet ist. Um hintereinander verschiedene Substanzen zu applizieren, wird zwischen den jeweils gewünschten Kanälen hin und wieder zurück gewechselt. Der Wechsel zwischen den Kanälen geschieht dabei ohne Pause und dementsprechend ohne Schaltartefakte.

Die zweite Möglichkeit der Applikation wurde von uns als Spitzen-Applikation bezeichnet. Bei der Spitzen-Applikation wird die Substanz eines bestimmten Kanals bis an die Spitze der Applikationspipette vorgeladen und durch Öffnen und Schließen des jeweiligen Kanals appliziert. Ein Wechsel zu einem der anderen Kanäle erfolgt durch das Entfernen der Substanz des aktiven Kanals aus der Spitze der Pipette mit Hilfe des zentralen Spülkanals. Anschließend wird die Substanz des gewünschten Kanals bis an die Spitze des Ausführganges vorgeladen.

Die erwarteten Unterschiede zwischen den beiden Formen der Applikation bezüglich des Konzentrationsaufbaus wurden durch die Liquid-Junction-Potential Messungen bestätigt. Die Spitzen-Applikation erwies sich mit einem durchschnittlichen τ -Wert von 22 ms als fast 20fach schneller im Konzentrationsaufbau als die Puls-Applikation mit einem mittleren

τ -Wert von 395 ms. Dieses Ergebnis lässt sich auf die unterschiedlichen Anfangsbedingungen der beiden Applikations-Formen zurückführen. Zu Beginn der Puls-Applikation befindet sich in dem gemeinsamen Ausführgang der Pipette Bad-Lösung und nicht wie bei der Spitzen-Applikation die zu applizierende Substanz. Dieser Vorlauf an Bad-Lösung wird durch die zu applizierende Substanz aus der Pipette gedrückt, wobei sich die Substanz an der Grenzfläche zur Bad-Lösung verdünnt. Dies hat zur Folge, dass nicht sofort die volle Konzentration an der Messpipette anliegt, wie es bei der Spitzen-Applikation der Fall ist.

Die zunächst im gemeinsamen Ausführgang befindliche Bad-Lösung ist auch die Ursache für die etwas größeren Latenzen der Puls-Applikation verglichen mit der Spitzen-Applikation. Die Latenz der Spitzen-Applikation ist auf den Abstand zwischen der Messpipette und der Öffnung der Applikationspipette zurückzuführen. Die zusätzliche Latenz der Puls-Applikation entspricht der Zeit, die benötigt wird, um die Bad-Lösung auszustoßen.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Applikationsformen gab es hinsichtlich der erreichten Amplituden, was darauf schließen lässt, dass es auch keine Unterschiede bezüglich der im Bad erreichten Konzentrationen gab. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da sich die beiden Applikations-Formen, bei entsprechend langer Applikationszeit, in ihren Eigenschaften nicht unterscheiden. Unterschiede zeigen sich nur beim Ein- bzw. Ausschalten einzelner Kanäle. In beiden Fällen bildet sich nach dem Einschalten der Applikation ein kontinuierlicher "Flüssigkeitsstrom" aus, der die Lösung des Badkreislaufes verdrängt. Die Bildung dieses "Flüssigkeitsstroms" gewährleistet, dass die Pharmaka unverdünnt appliziert werden können. Die Konzentration der applizierten Substanzen entspricht damit zu 100% der Ausgangs-Konzentration der jeweiligen Reservoirs.

Es wurde jedoch deutlich, dass die Puls-Applikation aufgrund des langsameren Konzentrationsaufbaus hinsichtlich der kürzest möglichen Applikationszeit limitiert ist. Mit kürzeren Applikationszeiten als 5 s wird nicht die volle Konzentration des zu applizierenden Pharmakons erreicht. Im Vergleich dazu wird mit der Spitzenapplikation bereits nach weniger als 1 s die der im Reservoir entsprechende Konzentration erreicht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die oben angegebenen Zeiten im Rahmen der Liquid-Junction-Potential Messungen mit einer Messpipette direkt vor der Öffnung der Applikationspipette bestimmt wurden. Dementsprechend sind diese Zeit-Angaben nur übertragbar auf Zellen oder Membranen unmittelbar vor der Applikationspipette ohne zusätzliche Diffusionsbarrieren, wie sie z.B. bei Experimenten an Hirnschnitten vorkommen.

Die sehr schnelle Spitzen-Applikation empfiehlt sich demzufolge für Versuche an Zell-Kulturen, einzelnen Zellen und einzelnen Membranstücken. Ein Nachteil dieser Form der Applikation ist das mögliche Auftreten von Artefakten aufgrund des Ein- bzw. Ausschaltens der Applikation. Durch die Druckschwankungen an der Oberfläche der Zellen könnten z.B. mechanisch-aktivierbare Ionenkanäle aktiviert werden. Denkbar ist auch eine Verschlechterung der Ableitqualität bis hin zum Verlust der Zelle durch die auftretenden Erschütterungen.

Dieser Nachteil existiert bei der Puls-Applikation nicht. Bei dieser Form der Applikation werden die Pharmaka, wie oben beschrieben, in einen kontinuierlichen Strom von Bad-Lösung gepulst. Da die Badlösung bereits vor Beginn der Messung appliziert wird, gibt es dementsprechend nur einmal, vor Beginn der Messung, eine Druckschwankung an den Zellen. Mit dem weiteren Vorteil des einfachen, schnellen Wechsels zwischen verschiedenen Kanälen eignet sich die Puls-Applikation daher ideal für Experimente an Hirnschnitten, bei denen auch mehrere Pharmaka appliziert werden sollen.

Darüber hinaus zeigten die Versuche an akut isolierten Hirnschnitten, bei denen eine 30 mM Kalium-Lösung appliziert wurde, dass die Vorteile der Spitzen-Applikation, also der schnellere Konzentrationsaufbau sowie die möglichen kürzeren Applikationszeiten, bei Experimenten an Hirnschnitten nicht gegeben sind. Im wesentlichen ist das auf das Gewebe des Schnittes zurückzuführen, welches eine erhebliche Diffusionsbarriere darstellt.

Vergleicht man die Spitzen-Applikation mit der Puls-Applikation von Kalium-Lösung, so fällt auf, dass die jeweils 1 Sekunde dauernden Applikationen unterschiedliche Effekte auf das Membranpotential des LSO-Neurons hatten (Abb. 8 A u. B). Die durch die Spitzen-Applikation hervorgerufene Änderung des Membranpotentials war mit 33 mV deutlich größer und mit einer Dauer von 21 s auch deutlich länger anhaltend als die durch die Puls-Applikation hervorgerufene (11 mV; 3,9 s). Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die Kalium-Lösung nach Abschluss der Spitzen-Applikation nur langsam aus dem Schnitt diffundiert bzw. durch den Bad-Kreislauf ausgewaschen wird. Bei der Puls-Applikation hingegen wird sie durch die direkt nachfolgende Bad-Lösung der Applikationspipette verdrängt. Mit der Puls-Applikation werden dementsprechend in Hirnschnitten deutlich kürzere Auswasch-Zeiten erreicht.

Bezüglich der Latenzen gab es, im Gegensatz zu den Liquid-Junction-Potential Messungen, keine großen Unterschiede zwischen den beiden Applikationsformen. Die Depolarisation nach der gepulsten Kalium-Applikation setzte nach 600 ms ein und war damit sogar 25 ms

schneller als die nach der Spitzen-Applikation (625 ms). Ebenfalls schneller war die Puls-Applikation im Hinblick auf die Geschwindigkeit der De- und Repolarisation, was sich in deutlich kleineren Zeitkonstanten ausdrückte. Die etwas geringere Latenz sowie die schnelleren Aktivierungs- und Deaktivierungs-Zeitkonstanten lassen sich darauf zurückführen, dass bei der Puls-Applikation nach einer Drogen-Applikation ständig Bad-Lösung durch den zentralen Spülkanal nachfließt. So wird bei der Puls-Applikation das applizierte Pharmakon förmlich in das Gewebe hinein und auch wieder hinaus gedrückt, was dazu führt, dass bei kurzen Applikationszeiten mit der Puls-Applikation ein schnellerer Konzentrationsaufbau und Abbau erreicht wird als mit der Spitzen-Applikation. Bei längeren Applikationszeiten werden sich, aufgrund der bei der Spitzen-Applikation nun ebenfalls länger nachschiebenden Droge, die Zeiten für die Latenz sowie für den Konzentrationsaufbau angleichen, nicht jedoch die Werte für den Konzentrationsabbau.

Um abschätzen zu können, welche Applikationszeit benötigt wird, um die volle Konzentration einer applizierten Substanz im Schnitt sicher zu erreichen, wurde die Kalium-Lösung über mehrere Sekunden kontinuierlich mittels der Puls-Applikation appliziert. Diese Applikation führte nach ca. 7 s zu einer anhaltenden Depolarisation von 49 mV (Abb. 8 C). Dementsprechend änderte sich nach 7 s die im Schnitt erreichte Kalium Konzentration nicht mehr. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass bei diesem Experiment keine Blocker von spannungssensitiven Kanälen oder Transportern zur Anwendung kamen. Folglich wird der passive Prozess der Membranpotentialänderung aufgrund der Verschiebung des Kaliumgleichgewichtspotentials durch aktive Prozesse, wie z.B. die Aktivierung spannungsgesteuerter Kanäle, überlagert. Durch diesen Umstand wird die Zeit bis zum Erreichen eines neuen, stabilen Membranpotentials (*Steady State*), was als grobes Maß für das Erreichen einer konstanten Konzentration der 30 mM Kalium-Lösung angesehen werden kann, aber allenfalls verlängert. Demnach kann allgemein davon ausgegangen werden, dass nach einer Applikation von 10 s in jedem Fall eine konstante Konzentration einer applizierten Droge im Hirnschnitt erreicht ist.

4.1.1 Vergleich mit anderen Applikationssystemen

Im Vergleich mit anderen Applikationssystemen (z.B.: Bad-, Pikospritzer-, Concentration-Clamp-Applikations-Systeme) wird deutlich, dass es sich bei dem von uns entwickelten

System um eine Kombination aus langsamer, großvolumiger Bad-Applikation und schneller, kleinvolumiger Pikospritzen- bzw. Concentration-Clamp-Applikation handelt.

Die klassische Bad-Applikation zeichnet sich durch relativ lange Applikationszeiten und einen verhältnismäßig langsamen Badaustausch aus. Die entsprechenden Zeiten liegen in der Größenordnung von Minuten. Im Vergleich zur Bad-Applikation zeichnet sich unser System durch folgende Vorteile aus: Es ist wesentlich schneller und bietet die Möglichkeit, nur bestimmte Areale eines Hirnschnittes oder einer Kultur zu beeinflussen. Außerdem werden aufgrund der geringen Dimensionen (siehe 3.1.2) erheblich geringere Mengen an Pharmaka benötigt.

Noch geringere Mengen an Drogen-Lösungen werden für Pikospritzen-Applikations-Systeme benötigt. Bei diesen Systemen werden die Pharmaka mittels Druck aus einzelnen Elektroden oder aus sogenannten Multi-Barrel-Elektroden appliziert. Die geringen Dimensionen (die Spitze der Elektroden hat i.d.R. einen Durchmesser von 2–5 μm) bewirken, dass die Applikation sehr fokal ist, was je nach Versuchsansatz ein Vorteil, aber auch ein Nachteil sein kann. Die Systeme bieten die Möglichkeit, im Minuten-, Sekunden- und im Millisekunden-Bereich zu applizieren. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Drogen aufgrund der kleinen applizierten Volumina nach der Applikation stark verdünnt werden, was zur Folge hat, dass keine genaue Angabe der Konzentration der applizierten Substanzen möglich ist. Die Stärke der Verdünnung ist direkt abhängig von der Applikationszeit und der Entfernung der Elektrode von der Zelle. Ein weiterer Nachteil dieser Systeme liegt im Prinzip der Druckapplikation begründet. Durch die Druckschwankungen kann es zu Messartefakten kommen. Multi-Barrel-Elektroden erlauben die Applikation mehrerer Substanzen während eines Experimentes. Sie haben aber den Nachteil, keinen gemeinsamen Ausführgang zu besitzen, was dazu führen kann, dass die Substanzen, je nach Zustand der Spitzen, in unterschiedlichen Richtungen ausgestoßen werden.

Concentration-Clamp- oder auch Concentration-Jump-Applikationssysteme zeichnen sich durch sehr schnelle Applikationszeiten aus (Jonas, 1995; Pidoplichko, 1996). Mit den verschiedensten Methoden können Lösungswechsel innerhalb von weniger als einer bis einigen Millisekunden erreicht werden. Allen Verfahren ist jedoch gemeinsam, dass sie nicht für Experimente an Hirnschnitten geeignet sind. Dies ist ein konstruktionsbedingter Nachteil, da das Prinzip der meisten Verfahren darauf beruht, einzelne Zellen oder auch nur einzelne

Membranstücke mittels einer Patch-Pipette sehr schnell in unterschiedliche Testlösungen einzubringen.

4.2 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen

4.2.1 Funktionelle AMPA-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen

Die Applikation von 200 μ M AMPA führte im gesamten Untersuchungszeitraum (P3 – P10) bei allen untersuchten LSO- und MNTB-Neuronen zu einwärts gerichteten Strömen. AMPA ist in der verwendeten Konzentration ein starker Agonist an AMPA-Rezeptoren und nur ein relativ schwacher Agonist an bestimmten Kainat-Rezeptoren (z.B.: GluR5 Homomere; Egebjerg et al., 1991; Stein et al., 1992; Übersicht in: Hollmann und Heinemann, 1994; siehe auch Tab. 1). Zusammen mit dem Befund, dass die AMPA-evozierten Ströme durch den hoch spezifischen AMPA-Rezeptor Blocker GYKI 52466 (Paternain et al., 1995; Wilding und Huettner, 1995; Bleakman et al., 1996; siehe auch Tab. 1) vollkommen und reversibel blockiert wurden, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Neurone beider Nuclei funktionelle Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ besitzen.

Im Gegensatz zu GYKI 52466 hatte Joro-Spider-Toxin keinen Einfluss auf die AMPA-evozierten Ströme bei LSO-Neuronen. Aufgrund der Untereinheiten-spezifischen Wirkung von JSTX lässt dieses Ergebnis Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren zu. Joro-Spider-Toxin, das Gift der Spinne *Nephila clavata*, ist ein potenter Antagonist an AMPA-Rezeptoren, die keine GluR2 Untereinheit besitzen (Hollmann et al., 1991; Blaschke et al., 1993). Demzufolge sind die nachgewiesenen AMPA-Rezeptoren sehr wahrscheinlich aus einer oder mehreren GluR2 Untereinheiten aufgebaut. AMPA-Rezeptoren, die diese Untereinheiten besitzen, zeichnen sich durch lineare Strom-Spannungs-Kennlinien und eine relative Impermeabilität für Kalziumionen aus (Burnashev et al., 1992; Burnashev, 1998). Daraus folgt, dass AMPA-Rezeptoren auf LSO-Neuronen zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung (P 8) impermeabel für Kalziumionen sind. Dieses Ergebnis ist konsistent mit einer früheren Arbeit, die zeigte, dass Neurone in den meisten auditorischen Kernen, darunter auch LSO und MNTB, Kalzium-permeable nonNMDA-Rezeptoren erst ca. 12 Tage nach der Geburt exprimieren (Caicedo et al., 1998).

Dies ist auch der Zeitpunkt des Hörbeginns der Tiere, der sich u.a. dadurch auszeichnet, dass evozierte, exzitatorische, postsynaptische Potentiale (EPSPs) an Dauer und Latenz abnehmen (Kandler und Friauf, 1995a). Zeitgleich mit diesen Veränderungen findet eine drastische Veränderung in der Expression einzelner AMPA-Rezeptor Untereinheiten in LSO-Neuronen statt (Caicedo und Eybalin, 1999). Während z.B. die Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluR2 bis zum Zeitpunkt P8 kontinuierlich exprimiert wird, danach jedoch stark herunter reguliert wird, verhält es sich bei der Untereinheit GluR4 genau umgekehrt. Auch diese Ergebnisse stimmen folglich mit den oben angestellten Überlegungen überein.

An MNTB-Neuronen wurde die Wirkung von JSTX auf AMPA-evozierte Ströme nicht untersucht. Die bereits erwähnte Studie von Caicedo (Caicedo et al, 1998) weist auf einen ähnlichen Verlauf der Glutamat-Rezeptor Entwicklung bei MNTB-Neuronen hin. Kalzium-permeable nonNMDA-Rezeptoren wurden erst kurz vor dem Hörbeginn der Ratten (P12) nachgewiesen, wobei die Stärke der Expression im Laufe der Entwicklung weiter zunahm. In diesem Zusammenhang wäre der Einsatz von Untereinheiten-spezifischen AMPA-Rezeptor Agonisten sehr vielversprechend. Solche spezifischen AMPA-Rezeptor Agonisten, wie es sie z.T. schon für Kainat-Rezeptoren gibt (siehe Diskussion der Kainat-Rezeptor Agonisten), sind jedoch leider noch nicht erhältlich. Diese Substanzen sind z.Z. Gegenstand intensiver Forschung (Coquelle et al., 2000) und versprechen für die Zukunft große Fortschritte.

Die AMPA-evozierten Ströme zeigten einen charakteristischen Verlauf, wobei es keine wesentlichen Unterschiede zwischen LSO- und MNTB-Neuronen gab. Nach einer relativ schnellen Aktivierung zeigten die Ströme während der weiteren Applikation eine konstante Amplitude und nach Beendigung der Applikation eine sehr langsame Deaktivierung. Vergleicht man die erhaltenen Werte mit den Literaturangaben für AMPA-Rezeptoren, so wird deutlich, dass die für die LSO- bzw MNTB-Neurone bestimmten Zeiten sehr viel langsamer sind. So stehen den gemessenen Aktivierungszeiten im Bereich von mehreren Hundert Millisekunden Literaturwerte im Bereich von Bruchteilen von Millisekunden gegenüber (Colquhoun et al., 1992; Hestrin, 1992; Seeburg, 1993). Weiterhin ist zu bemerken, dass die Ströme keine, für AMPA-Rezeptoren charakteristische, schnelle Desensibilisierung (Kiskin et al., 1986; Colquhoun et al., 1992; Partin et al., 1996) zeigten. Die im Vergleich zur Literatur langsameren Aktivierungs- und Deaktivierungs-Zeiten sowie die fehlende Desensibilisierung lassen sich durch den relativ langsamen Konzentrationsaufbau an den Zellen erklären. Dieser ist erstens auf die Art der Applikation, die im ersten Teil der Arbeit ausführlich beschrieben wurde, und zweitens auf den Umstand, dass die Messungen an

Hirnschnitten erfolgten, zurückzuführen. Da schon geringste Mengen der Agonisten genügen, um AMPA-Rezeptoren zu desensibilisieren (Trussell und Fischbach, 1989), befindet sich dementsprechend sehr wahrscheinlich der größte Teil der AMPA-Rezeptoren bereits in einem desensibilisierten Zustand, noch bevor die endgültige Konzentration von AMPA im Schnitt erreicht wird. Die mit dem von uns entwickelten Applikationssystem erreichten Geschwindigkeiten des Konzentrationsaufbaus in einem Hirnschnitt sind deutlich schneller als die einer Bad-Applikation, reichen jedoch nicht aus, um Rezeptoreigenschaften wie Aktivierungszeitkonstanten etc. bestimmen zu können. Für die Analyse solcher Eigenschaften müsste der Konzentrationsaufbau schneller sein als der schnellste zu messende Prozess. Bei den hier gemessenen Zeiten handelt es sich demzufolge um Werte, die sich aus der Überlagerung von Rezeptoreigenschaften und der Geschwindigkeit des Konzentrationsaufbaus ergeben.

Die weitere Analyse der AMPA-evozierten Ströme bei LSO-Neuronen zeigte eine hoch signifikante Korrelation zwischen der Latenz und der Aktivierungszeitkonstanten τ . Ströme mit kleiner Latenz aktivierten schneller als solche mit größeren Latenz-Werten. Dieser Zusammenhang ist sehr wahrscheinlich auf minimal unterschiedliche Tiefen der abgeleiteten Zellen im Schnitt, und damit auf Unterschiede im Konzentrationsaufbau zurückzuführen. Zellen, die tiefer im Schnitt liegen, werden aufgrund der größeren Diffusionsstrecke von der applizierten Substanz erst später erreicht als Zellen, die nahe der Oberfläche des Schnittes liegen. Demzufolge zeichnen sich die evozierten Ströme durch größere Latenzen aus. Die größere Diffusionsstrecke ist auch für einen langsameren Konzentrationsaufbau verantwortlich, so dass Zellen, die tief im Schnitt liegen, nicht nur mit größerer Verzögerung (Latenz) auf Applikationen reagieren sondern auch langsamer aktivieren. Im Gegensatz dazu erreicht die applizierte Substanz die Zellen, die nah an der Oberfläche des Schnittes liegen vergleichsweise schnell, so dass sich kurze Latenzen und schnelle Aktivierungszeiten ergeben.

Ebenfalls eine geringe, jedoch statistisch signifikante Korrelation zeigte sich zwischen der Amplitude und den jeweiligen Aktivierungsgeschwindigkeiten der AMPA-evozierten Ströme. Ströme, die langsamer aktivierten, zeichneten sich durch vergleichsweise große Stromamplituden aus, während schnell aktivierende Ströme geringere Amplituden aufwiesen. Mit τ als grobem Maß für die Lage einer Zelle im Schnitt ergibt sich somit, dass tiefer im Schnitt liegende Zellen mit etwas größeren Stromamplituden auf die Applikation von AMPA

reagieren als Zellen, die sich nahe an der Oberfläche befinden. Dies kann möglicherweise auf den, aufgrund der geschützten Lage im Schnitt, besseren "allgemeinen Zustand" der tiefer liegenden Neurone zurückgeführt werden. Ein statistisch nachweisbarer Unterschied hinsichtlich des Ruhemembranpotentials der Zellen bestand jedoch nicht.

Eine weitere Erklärung für die etwas geringeren Stromamplituden von nahe an der Oberfläche liegenden Zellen könnten mögliche Schäden an den Dendriten-Bäumen dieser Neurone sein. Glutamaterge Synapsen wurden, im Gegensatz zu glycinergen Synapsen, hauptsächlich auf den Dendriten der LSO-Neurone nachgewiesen (Helfert et al, 1992). Setzt man eine entsprechende Verteilung der Rezeptoren voraus, könnten durch das Schneiden gekappte Dendritenbäume somit zu geringeren Stromamplituden führen. Die möglichen Schädigungen der Dendriten-Bäume führten jedoch nicht zu messbaren Veränderungen in der Membrankapazität der Neurone, da zwischen der Kapazität der Zellen und den τ -Werten der AMPA-evozierten Ströme keine Korrelation nachgewiesen werden konnte.

Die oben beschriebene mögliche Abhängigkeit der Amplitude AMPA-evozierter Ströme von der Lage der Neurone im Hirnschnitt machte es notwendig, vor einer Analyse der Stromamplituden im Hinblick auf mögliche Altersabhängigkeiten, die entsprechenden Parameter (Latenz, τ) bezüglich ihrer Entwicklung zu überprüfen. Es zeigte sich, dass sowohl bei LSO- als auch bei MNTB-Neuronen die Latenzen wie auch die τ -Werte, und damit die Verteilung der Zellen im Schnitt, unabhängig vom Alter der Tiere waren. Demzufolge war eine Analyse der Stromamplituden im Hinblick auf das Alter der Tiere in beiden Nuclei möglich. Die Amplituden der AMPA-evozierten Ströme zeigten weder für LSO- noch für MNTB-Neurone im Untersuchungszeitraum eine Abhängigkeit vom Alter der Tiere. Das heißt, im Zeitraum zwischen P3 und P10 gab es keine entwicklungsbedingten Einflüsse auf die Amplituden der AMPA-Rezeptor vermittelten Ströme.

In beiden Nuclei gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und der Membrankapazität der Neurone. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass LSO-Neurone zwischen P0 und P10 durch Soma- und Dendritenwachstum eine deutliche Oberflächenvergrößerung erfahren (Kandler und Friauf, 1995b; Rietzel und Friauf, 1998), was "normalerweise" eine Zunahme der Kapazität zur Folge hätte. Die dennoch gleichbleibende Kapazität der Neurone ist auf sinkende Membraneingangswiderstände sowie Membranzeitkonstanten und daraus resultierend, auf eine verringerte spezifische

Membrankapazität zurückzuführen (Kandler und Friauf, 1995b). Für MNTB-Neurone gelten entsprechende Überlegungen. Auch Zellen des MNTB wachsen während dieser Periode in der Entwicklung, bei gleichbleibender Membrankapazität und konstanter Amplitude der AMPA-evozierten Ströme.

Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den bereits erwähnten Veränderungen in der Expression einzelner AMPA-Rezeptor Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren überein. Die häufigsten und stärksten Veränderungen finden ab dem Zeitpunkt des Hörbeginns (P12) statt (Caicedo et al., 1998; Caicedo et al., 1999). Damit scheint sich die Entwicklung der Glutamat-Rezeptoren in eine relativ konstante "präadulte" Phase vor P12 und in eine Phase nach P12 zu unterteilen, die durch die Reifung der Rezeptoren charakterisiert ist. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden demnach im Zeitraum zwischen P3 und P10 "präadulte" AMPA-Rezeptoren untersucht, die wahrscheinlich keinen größeren Veränderungen ausgesetzt waren. Die "präadulten" AMPA-Rezeptoren zeichneten sich sehr wahrscheinlich durch die Präsenz der GluR2 Untereinheit und somit durch eine relative Impermeabilität für Kalzium aus. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die adulten Formen der AMPA-Rezeptoren in den meisten auditorischen Kernen durch die Dominanz der Untereinheit GluR4_{flap} und nur geringe Anteile an GluR2, und dementsprechend durch sehr schnelle Kinetiken und eine relativ hohe Kalzium-Permeabilität aus (Geiger et al., 1995; Otis et al., 1995; Trussell, 1997).

4.2.2 Funktionelle Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen

Das Neurotoxin Kainat evozierte in allen untersuchten LSO- und MNTB-Neuronen sehr starke Einwärtsströme. Die evozierten Ströme waren z.T. biphasisch (LSO: 38%, MNTB: 10%), was möglicherweise auf zusätzlich aktivierte Leitfähigkeiten zurückgeführt werden kann. Aufgrund der im Vergleich mit den AMPA-Applikationen sehr großen Ströme ist es denkbar, dass trotz der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten geringen Kalzium-Permeabilität der nonNMDA-Rezeptoren (Caicedo, 1998), eine zur Aktivierung von Leitfähigkeiten ausreichende Menge Kalzium in die Zellen gelangt sein könnte. Der Anteil der Kalzium-Ionen am Gesamtstrom durch "Kalzium-impermeable" nonNMDA-Rezeptoren beträgt, je nach Untereinheiten-Komposition der Rezeptoren, bis zu 0,5% (Egebjerg und Heinemann, 1993; Burnashev, 1998). Durch das einströmende Kalzium könnten z.B. Kalzium-aktivierte, nichtselektive Kationen-Kanäle aktiviert werden (Haj-Dahmane und

Andrade, 1997). Deren zusätzlich aktivierte Leitfähigkeit könnte zu der biphasischen Charakteristik der evozierten Ströme führen.

Der Befund, dass die Applikation von Kainat starke Einwärtsströme evozierte, lässt alleine noch keine Aussage über eventuell vorhandene Kainat-Rezeptoren zu, da Kainat in der verwendeten Konzentration sowohl Agonist an Kainat-Rezeptoren als auch an AMPA-Rezeptoren ist (Seeburg, 1992; Hollmann und Heinemann, 1994; siehe auch Tab. 1). Zusammen mit dem Befund, dass der AMPA-Rezeptor Blocker GYKI 52466 - mit der Ausnahme eines MNTB-Neurons - in keiner der untersuchten Zellen die Kainat-evozierten Ströme vollständig blockierte, ergeben sich jedoch starke Argumente für die Existenz funktioneller Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen. GYKI 52466 ist ein hochselektiver, nicht-kompetitiver Blocker an den AMPA-Rezeptor Untereinheiten GluR1 bis GluR4 (Paternain et al., 1995; Wilding und Huettner, 1995; Bleakman et al., 1996). Mit IC_{50} -Werten von $18 \mu\text{M}$ an AMPA-Rezeptoren und $> 200 \mu\text{M}$ an nativen Kainat-Rezeptoren (Wilding und Huettner, 1995) und einer verwendeten Konzentration von $100 \mu\text{M}$ kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass nahezu alle AMPA-Rezeptoren blockiert waren. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass bei den gleichen Neuronen in der Anwesenheit von GYKI 52466 auch mit $200 \mu\text{M}$ AMPA keine Ströme mehr ausgelöst werden konnten. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass Kainat aufgrund der nicht desensitisierenden Antwort an AMPA-Rezeptoren (Kiskin et al., 1986; Mayer und Vyklicky, 1989; Huettner, 1990) zwar größere Ströme als AMPA evoziert, AMPA aber dennoch die größere Affinität zu den AMPA-Rezeptoren besitzt (Sommer, 1992; Hollmann und Heinemann, 1994). Demzufolge sind in der Gegenwart von GYKI 52466 die AMPA-Rezeptoren mit großer Wahrscheinlichkeit vollständig blockiert. Die GYKI-resistenten, Kainat-evozierten Ströme müssen folglich von Kainat-Rezeptoren vermittelt worden sein. Die Ergebnisse weisen somit funktionelle Kainat-Rezeptoren sowohl bei LSO- als auch bei MNTB-Neuronen nach.

Die Tatsache, dass Kainat-evozierte Ströme in einem MNTB-Neuron vollständig durch GYKI 52466 blockiert wurden, deutet darauf hin, dass möglicherweise eine Gruppe von MNTB-Neuronen existiert, die keine funktionellen Kainat-Rezeptoren besitzt. Da für die Experimente bei LSO-Neuronen aus den sieben bekannten Neuronen-Klassen (Rietzel und Friauf, 1998) gezielt die sogenannten Bipolar-Zellen (Haupt-Zelltyp) ausgewählt wurden, ist

es möglich, dass es auch in der LSO eine oder mehrere Neuronen-Gruppen gibt, die keine funktionellen Kainat-Rezeptoren exprimieren.

Die weitere Analyse der Kainat-evozierten Ströme in der Gegenwart von GYKI 52466 ließ zwei unterschiedliche Gruppen von LSO-Neuronen erkennen. Die eine Gruppe zeichnete sich durch schnelle Aktivierungsgeschwindigkeiten aus, vergleichbar mit den Werten der AMPA-evozierten Ströme. Bei der zweiten Gruppe erfolgte die Aktivierung dagegen deutlich langsamer. Die schnell aktivierenden Ströme hatten zudem im Mittel eine signifikant höhere Amplitude als die langsam aktivierenden Ströme. Hinsichtlich der Latenzen unterschieden sich die beiden Gruppen weder untereinander noch von den AMPA-evozierten Strömen. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Befund um ein Artefakt handelt, welches z.B. durch unterschiedliche Tiefen der Zellen im Schnitt entstehen könnte.

Eine plausible Möglichkeit das beobachtete Phänomen zu erklären, bietet die Annahme, dass es sich bei den beiden Gruppen um Neurone handelt, die sich durch einen unterschiedlichen Besatz an Kainat-Rezeptoren auszeichnen und/oder unterschiedliche Kainat-Rezeptor Untereinheiten besitzen. Zellen mit einer größeren Anzahl an Kainat-Rezeptoren werden auf die Applikation von Kainat (in der Gegenwart von GYKI 52466) mit einem größeren, schneller aktivierenden Strom reagieren als Neurone, die weniger Rezeptoren besitzen. Dies gilt analog für die Applikation unterschiedlicher Konzentrationen eines Agonisten bei gleichbleibender Rezeptordichte. Für diesen Versuchsansatz gilt, dass mit zunehmender Konzentration des Agonisten größere Amplituden und schnellere Aktivierungsgeschwindigkeiten erreicht werden (Clements et al., 1998). Damit ist alleine schon die Annahme unterschiedlicher Rezeptordichten ausreichend, um das Auftreten der beiden Gruppen erklären zu können. Des weiteren könnte das Phänomen durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Kainat-Rezeptoren hervorgerufen werden. So besitzen Kainat-Rezeptoren, je nach Untereinheitenzusammensetzung, unterschiedliche Kinetiken und auch unterschiedliche Affinitäten zu den Agonisten (Hollmann und Heinemann, 1994; Schiffer et al., 1997). Eine geringere Affinität zu einem gegebenen Agonisten führt, bei gleicher Agonisten-Konzentration, zu geringeren Amplituden und langsameren Aktivierungszeiten (Schiffer et al., 1997). Demzufolge könnten auch verschiedene Kainat-Rezeptor Untereinheiten für die Aufteilung der LSO-Neurone in die beiden Gruppen verantwortlich sein bzw. zusätzlich dazu beitragen.

Von den insgesamt 37 untersuchten LSO-Neuronen gehörten 9 Zellen zur Gruppe mit schnell aktivierenden Strömen und 28 Zellen zur Gruppe mit langsam aktivierenden Strömen. Diese

Gruppen könnten möglicherweise zwei der oben erwähnten Klassen von LSO-Neuronen repräsentieren. Einen Hinweis auf unterschiedliche Zelltypen könnten die jeweiligen Kapazitäten liefern. Im Hinblick auf die Kapazität der Neurone zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Weder in der LSO noch im MNTB zeigte sich eine altersabhängige Entwicklung der Kainat-Rezeptor vermittelten Ströme. Sowohl Latenz als auch τ -Wert waren im Zeitraum P3 bis P10 unabhängig vom Alter der Tiere verteilt. In beiden Nuclei war die Amplitude der Kainat-Rezeptor vermittelten Ströme während dieser Zeit der Entwicklung ebenfalls nicht abhängig vom Alter der Tiere. Auch zwischen der Membrankapazität der Neurone und dem Alter gab es keine signifikante Korrelation. Die trotz Zellwachstum der Neurone konstant bleibende Membrankapazität ist auf die im gleichen Zeitraum sinkenden Membranzeitkonstanten und Membraneingangswiderstände zurückzuführen (Kandler und Friauf, 1995b).

4.2.2.1 Versuche mit Concanavalin A

Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von funktionellen Kainat-Rezeptoren in den untersuchten Nuclei lieferten die Experimente mit Concanavalin A. Das Pflanzen-Lektin führte in der Mehrzahl der untersuchten Neurone zu einer Potenzierung von Glutamat-induzierten Strömen. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen LSO- und MNTB-Neuronen.

Die Wirkung von Con A auf Glutamat-Rezeptoren wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. So wurde von verschiedenen Gruppen nachgewiesen, dass Con A selektiv Kainat-Rezeptor vermittelte Ströme potenziert, indem es die Desensibilisierung der Rezeptoren verhindert (Partin et al., 1993; Wong et al., 1993). Andere Studien haben dagegen gezeigt, dass die Substanz auch potenzierend auf AMPA-Rezeptoren wirken kann (Yue et al., 1995; Everts et al., 1997). Dementsprechend kann mit Con A allein kein Nachweis von Kainat-Rezeptoren geführt werden, die gewonnenen Ergebnisse unterstützen jedoch den bereits mit dem AMPA-Rezeptor Blocker GYKI 52466 geführten Nachweis funktioneller Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen.

4.2.2.2 Versuche mit spezifischen Kainat-Rezeptor Agonisten

Sehr gewichtige Hinweise für die Existenz funktioneller Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen ergaben sich aus den Ergebnissen der Experimente mit den spezifischen Kainat-Rezeptor Agonisten SYM 2081, ATPA und (S)-5-Iodowillardiine (IW). Während SYM 2081 eine sehr hohe Affinität für die Kainat-Rezeptor Untereinheiten GluR5 und 6 aufweist, aktivieren sowohl ATPA als auch (S)-5-Iodowillardiine vorwiegend Rezeptoren mit der Untereinheit GluR5 (SYM: Zhou, 1997; Donevan et al., 1998; ATPA: Clarke et al., 1997; Vignes et al., 1998; IW: Wong et al., 1996; Swanson et al., 1998; Übersicht in: Chittajallu et al., 1999). Die EC_{50} -Werte für die Aktivierung von GluR5- und GluR6-Homomeren liegen für SYM 2081 bei 0,12 μ M bzw. 0,23 μ M (Donevan et al., 1998). ATPA aktiviert aus der Untereinheit GluR5 bestehende Kainat-Rezeptoren mit einem EC_{50} -Wert von 0,6 μ M (Clarke et al., 1997). Die Werte für die Aktivierung anderer Kainat-Rezeptoren oder gar AMPA-Rezeptoren liegen dagegen deutlich höher im Bereich von mehreren Hundert Mikromolar (siehe auch Tab. 1). Da sowohl SYM 2081 als auch ATPA in Konzentrationen von 10 μ M verwendet wurden, folgt daraus, dass die evozierten Ströme höchstwahrscheinlich ausschließlich durch Kainat-Rezeptoren vermittelt wurden. Bestätigt wird das durch die Experimente, bei denen die Applikation der Agonisten in der Gegenwart von GYKI 52466 erfolgte. GYKI 52466 blockiert in der verwendeten Konzentration hochselektiv AMPA-Rezeptoren, und hemmt bereits geringfügig die Kainat-Rezeptoren (Wilding und Huettner, 1995). Entsprechend zeigte sich nur ein geringfügiger Effekt von GYKI 52466 auf die SYM 2081- bzw. ATPA-evozierten Ströme, welcher sehr wahrscheinlich auf die Wirkung von GYKI 52466 auf die Kainat-Rezeptoren zurückgeführt werden kann.

Dagegen führte GYKI 52466 zu einer signifikanten Reduktion der (S)-5-Iodowillardiine-evozierten Ströme. Mit einem EC_{50} -Wert von 0,14 μ M ist (S)-5-Iodowillardiine selektiv für die Untereinheit GluR5, jedoch werden AMPA-Rezeptoren bereits mit einem EC_{50} -Wert von 19 μ M aktiviert (Wong et al., 1996; Chittajallu, 1999). Entsprechend der verwendeten Konzentration von 1 μ M, könnte der Effekt von GYKI 52466 auf die Blockade bereits aktivierter AMPA-Rezeptoren zurückzuführen sein. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit sind jedoch die durch (S)-5-Iodowillardiine evozierten Ströme in der Gegenwart von GYKI 52466 ausschließlich durch Kainat-Rezeptoren vermittelt.

Somit weisen alle Ergebnisse aus den Experimenten mit den spezifischen Agonisten auf die Existenz funktioneller Kainat-Rezeptoren in LSO- und MNTB-Neuronen hin. Aufgrund der

Untereinheiten-Selektivität der spezifischen Kainat-Rezeptor Agonisten erlauben die Experimente darüber hinaus, auf die Existenz einzelner Kainat-Rezeptor Untereinheiten zu schließen. Entsprechend der hohen Selektivität der Agonisten für die Untereinheiten GluR5 bzw. GluR5 und 6 ist mit großer Wahrscheinlichkeit jeweils mindestens eine GluR5 Untereinheit Teil der nachgewiesenen Kainat-Rezeptoren.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit Angaben aus der Literatur, so lassen sich weitere Eigenschaften der Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen deduzieren. Wird z.B. die in diesem Entwicklungsstadium geringe Kalzium-Permeabilität der nonNMDA-Rezeptoren in LSO und MNTB (Caicedo et al., 1998) berücksichtigt, ergibt sich die Forderung nach entsprechend editierten Kainat-Rezeptoren (Burnashev, 1998; Ozawa et al., 1998). So ist z.B. bekannt, dass die editierten Formen der Untereinheiten GluR5 und 6, die als GluR5(R) bzw. GluR6(R) bezeichnet werden, Homomere mit signifikant reduzierter Kalzium-Leitfähigkeit bilden (Egebjerg und Heinemann, 1993; Burnashev, 1995). Weiterhin wurden im Rahmen einer immunzytologischen Studie die Untereinheiten GluR6 bzw. 7 und KA2 nachgewiesen (Löhrke et al., 1999), was auf die Möglichkeit der Existenz von Kainat-Rezeptor Heteromeren hinweist (Hollmann und Heinemann, 1994; Bleakman und Lodge, 1998; Ozawa et al., 1998).

4.2.3 Abschließende Betrachtungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, funktionelle AMPA- und Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen nachzuweisen. Über das Verhältnis von AMPA- zu Kainat-Rezeptoren kann anhand der durchgeführten Experimente jedoch keine Aussage getroffen werden, da entweder unterschiedliche Agonisten oder unterschiedliches Desensitisierungsverhalten den direkten Vergleich der beiden Rezeptor-Typen unmöglich machen. Auch die Lokalisation der Rezeptoren kann aufgrund der relativ großvolumigen Applikation nicht näher bestimmt werden. So stellt sich z.B. die Frage, ob die nachgewiesenen Kainat-Rezeptoren an den Synapsen lokalisiert und dementsprechend an der synaptischen Transmission beteiligt sind. Diesbezüglich weisen neuere Untersuchungen aus unserem Labor darauf hin, dass Kainat-Rezeptoren an den Synapsen zwischen CN- und LSO-Neuronen präsent sind, wobei jedoch sehr wahrscheinlich der größte Teil der synaptischen Transmission von AMPA-Rezeptoren getragen wird (Reusch et al., 1999). Damit scheinen die Kainat-

Rezeptoren an diesen Synapsen eher eine modulierende Funktion zu besitzen. Ob sich die physiologische Bedeutung der Kainat-Rezeptoren mit einer solchen Funktion erschöpft, bleibt unklar. Es ist jedoch denkbar, dass der Anteil, den die Kainat-Rezeptoren an der synaptischen Transmission haben, in Abhängigkeit von der Phosphorylierung der Rezeptoren auch größer werden kann (Greengard et al., 1991; Wang et al., 1991; Wang et al., 1993). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass extrasynaptisch lokalisierte Kainat-Rezeptoren nach sehr starken Reizfolgen durch aus dem synaptischen Spalt austretendes Glutamat (*spill over*) aktiviert werden (Isaacson, 1999). Darüber hinaus könnten Kainat-Rezeptoren aber auch verstärkt an Synapsen vorkommen, die nicht Teil der CN-Projektion in die LSO sind.

5 Zusammenfassung

5.1 Das Applikationssystem

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein innovatives System für die Applikation von Pharmaka während elektrophysiologischer Experimente entwickelt und getestet. Das Achtkanal-Applikationssystem eignet sich hervorragend für Experimente an Hirnschnitten und kann durch folgende Eigenschaften charakterisiert werden:

- Das System ist durch die Verwendung von Druckluft-Ventilen nahezu frei von elektromagnetischen Störfeldern.
- Aufgrund der geringen Dimensionen der Applikationspipette (Spitzendurchmesser = 250 μM) können gezielt unterschiedliche Regionen einer Zellkultur oder eines Hirnschnittes beeinflusst werden.
- Die geringen Dimensionen des Systems ermöglichen einen kostengünstigen Betrieb, da nur kleine Mengen an Pharmaka benötigt werden.
- Das System schaltet exakt und zuverlässig. Alle 8 Kanäle schalten in guter Übereinstimmung, und zwischen den einzelnen Kanälen kann dank eines zentralen Spülkanals akkurat und sicher gewechselt werden.
- Mit dem System können Substanzen auf zwei Arten appliziert werden. Es besteht zum einen die Möglichkeit der sogenannten Spitzen-Applikation. Die Spitzen-Applikation eignet sich besonders für Experimente an Zellkulturen, isolierten Zellen oder Membranstücken, und zeichnet sich bei dieser Art der Anwendung durch einen schnellen Konzentrationsaufbau (< 1 s) aus. Weiterhin können Substanzen mittels der sogenannten Puls-Applikation appliziert werden. Die Puls-Applikation bietet einerseits den Vorteil einer kontinuierlichen Applikation ohne Druckschwankungen, und ermöglicht andererseits die schnell aufeinanderfolgende Applikation mehrerer Substanzen. Demgemäß eignet sich die Puls-Applikation hervorragend für Experimente an Hirnschnitten.

5.2 Iontrope Glutamat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war eine tiefere Beschreibung der ionotropen, nonNMDA-Rezeptoren bei Neuronen der LSO des auditorischen Hirnstammes der Ratte. Im Vergleich hierzu wurden entsprechende Untersuchungen auch an MNTB-Neuronen durchgeführt. Von besonderem Interesse war dabei der Nachweis funktioneller Kainat-Rezeptoren. Im Gegensatz zu RNA- oder Protein-Nachweisen einzelner Rezeptor Untereinheiten wurden funktionelle Rezeptoren elektrophysiologisch, mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik, charakterisiert. Mit Hilfe von spezifischen Agonisten, Antagonisten und Modulatoren konnten folgende Sachverhalte nachgewiesen werden:

- LSO- und MNTB-Neurone exprimieren funktionelle AMPA-Rezeptoren.
- Die Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluR2 ist Bestandteil von AMPA-Rezeptoren bei LSO-Neuronen.
- Funktionelle AMPA-Rezeptoren werden zwischen P3 und P10 von LSO- und MNTB-Neuronen exprimiert. In diesem Abschnitt der Entwicklung ist die Größe der AMPA-Rezeptor vermittelten Ströme unabhängig vom Alter der Tiere.
- LSO- und MNTB-Neurone exprimieren funktionelle Kainat-Rezeptoren.
- Im Hinblick auf die Kainat-Rezeptoren gibt es jeweils zwei Klassen von LSO- bzw. MNTB-Neuronen. LSO-Neurone lassen sich in eine Klasse, die sich durch schnelle Kainat-Rezeptor vermittelte Ströme auszeichnet, und eine Klasse, die sich durch langsame Kainat-Rezeptor vermittelte Ströme auszeichnet, unterteilen. Den beiden Klassen liegen sehr wahrscheinlich unterschiedliche Rezeptordichten und/oder Unterschiede in der Untereinheitenzusammensetzung zugrunde. MNTB-Neurone lassen sich in Zellen, die Kainat-Rezeptoren besitzen, und Zellen, die diesen Typ von Rezeptor nicht besitzen, unterscheiden.
- Die Glutamat-Rezeptor Untereinheit GluR5 ist Bestandteil von Kainat-Rezeptoren bei LSO- und MNTB-Neuronen.
- Funktionelle Kainat-Rezeptoren werden zwischen P3 und P10 von LSO- und MNTB-Neuronen exprimiert. In diesem Zeitraum ist die Größe der Kainat-Rezeptor vermittelten Ströme unabhängig vom Alter der Tiere.

6 Abkürzungen

ä. D.	:	äußerer Durchmesser
AMPA	:	(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APV	:	(+/-)-2-Amino-5-phosphonovaleric acid
ATPA	:	(RS)-2-Amino-3-(3-hydroxy-5- ^t butylisoxazol-4-yl)propanoic acid
CNQX	:	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CON A	:	Concanavalin A
EGTA	:	Ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GYKI 52466	:	1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7, 8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine hydrochloride
HEPES	:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
i. D.	:	innerer Durchmesser
i.p.	:	intraperitoneal
IW	:	(S)-5-Iodowillardiine = (S)-(-)- α -Amino-5-iodo-3,4-dihydro-2,4-dioxo-1(2H)pyridinepropanoic acid
JSTX	:	Joro-Spider-Toxin Tris(trifluoracetate)
Kainat	:	(2S, 3S, 4S)-3-Carboxy-methyl-4-isopropenylpyrrolidine-2-carboxylic acid
KG	:	Körpergewicht
LSO	:	Laterale Superiore Olive
MNTB	:	Medialer Nucleus des Trapezkörpers
NBQX	:	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f]quinoxaline
NMDA	:	N-Methyl-D-aspartic acid
SOC	:	Superiorer Oliven Komplex
SYM 2081	:	(2S, 4R)-4-Methylglutamate
TTX	:	Tetrodotoxin citrate

7 Literatur

- Barry H (1993) 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 Methods* 51:107-116
- Bettler B, Mülle C (1995) Neurotransmitter receptors II: AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacol* 34:123-139
- Blaschke M, Keller BU, Rivosecchi R, Hollmann M, Heinemann S, Konnerth A (1993) A single amino acid determines the subunit-specific spider toxin block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate/kainate receptor channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6528-6532
- Blatchley BJ, Cooper WA, Coleman JR (1987) Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Brain Res* 429:75-84
- Bleakman D, Ballyk BA, Schoepp DD, Palmer AJ, Bath CP, Sharpe EF, Woolley ML, Bufton HR, Kamboj RK, Tarnawa I, Lodge D (1996) Activity of 2,3-benzodiazepines at native rat and recombinant human glutamate receptors in vitro: stereospecificity and selectivity profiles. *Neuropharmacology* 35:1689-1702
- Bleakman D, Lodge D (1998) Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 37:1187-1204
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL (1999) Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402:297-301
- Bortolotto ZA, Clarke VRJ, Delany CM, Vignes M, Collingridge GL (2000) Kainate receptors and synaptic plasticity. *Nature* 406:957
- Boudreau JC, Tsuchitani C (1968) Binaural interaction in the cat superior olive S segment. *J Neurophysiol* 31:442-454
- Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, Mülle C (1999) Kainate receptor mediated responses in the CA1 field of wild type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* 19:653-663
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-198
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485:403-418
- Burnashev N (1998) Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium* 24:325-332
- Caicedo A, Eybalin M (1999) Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur J Neurosci* 11:51-74
- Caicedo A, Kungel M, Pujol R, Friauf E (1998) Glutamate-induced Co^{2+} uptake in rat auditory brainstem neurons reveals developmental changes in Ca^{2+} permeability of glutamate receptors. *Europ J Neurosci* 10:941-954
- Caspary DM, Faingold CL (1989) Non-N-methyl-D-aspartate receptors may mediate ipsilateral excitation at lateral superior olivary synapses. *Brain Res* 503:83-90

- Castillo PE, Weisskopf MG, Nicoll RA (1994) The role of Ca^{2+} channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* 12:261-269
- Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VRJ, Henley JM (1999) Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 20:26-35
- Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, Barnes JM, Collingridge GL, Henley JM (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379 :78-81
- Clarke VR, Ballyk BA, Hoo KH, Mandelzys A, Pellizzari A, Bath CP, Thomas J, Sharpe EF, Davies CH, Ornstein PL, Schoepp DD, Kamboj RK, Collingridge GL, Lodge D, Bleakman D (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* 389:599-603
- Clements JD, Feltz A, Sahara Y, Westbrook GL (1998) Activation kinetics of AMPA receptor channels reveal the number of functional agonist binding sites. *J Neurosci* 18:119-127
- Colquhoun D, Jonas P, Sakmann B (1992) Action of brief pulses of glutamate on AMPA/kainate receptors in patches from different neurones of rat hippocampal slices. *J Physiol* 458:261-287
- Coquelle T; Christensen JK; Banke TG; Madsen U; Schousboe A; Pickering DS (2000) Agonist discrimination between AMPA receptor subtypes. *Neuroreport* 12:2643-2648
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernhard C, Ben-Ari Y (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1:470-478
- Dana Alliance for Brain Initiatives (1996) Update 1996: the discoveries grow. Dana Press (New York) 36 pp.
- DeVries SH, Schwartz EA (1999) Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and 'off' bipolar cells in a mammalian retina. *Nature* 397:157-160
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61
- Donevan SD, Beg A, Gunther JM, Twyman RE (1998) The methylglutamate, SYM 2081, is a potent and highly selective agonist at kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 285:539-545
- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351:745-748
- Egebjerg J, Heinemann SF (1993) Ca^{2+} permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:755-759
- Everts I, Villmann C, Hollmann M (1997) N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52:861-873
- Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1:479-486
- Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10:342-351
- Frerking M, Petersen CCH, Nicoll RA (1999) Mechanisms underlying kainate receptor-mediated disinhibition in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 96:12917-12922

- Friauf E, Kandler K (1990) Auditory projections to the inferior colliculus of the rat are present by birth. *Neurosci Lett* 120:58-61
- Friauf E, Ostwald J (1988) Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intraaxonal injection of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 73:263-284
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204
- Greengard P, Jen J, Nairn AC, Stevens CF (1991) Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *Science* 253:1135-1138
- Guinan JJ Jr, Li RY (1990) Signal processing in brainstem auditory neurons which receive giant endings (calyces of Held) in the medial nucleus of the trapezoid body of the cat. *Hear Res* 49:321-334
- Haj-Dahmane S, Andrade R (1997) Calcium-activated cation nonselective current contributes to the fast afterdepolarization in rat prefrontal cortex neurons. *J Neurophysiol* 78:1983-1989
- 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 Eur J Physiol* 391:85-100
- Helfert RH, Snead CR, Altschuler RA (1991) The Ascending Auditory Pathways. In: *Neurobiology of Hearing: The Central Auditory System* (Altschuler RA, Bobbin RP, Clopton BM, Hoffman DW eds), pp 1-25. New York: Raven Press, Ltd.
- Helfert RH, Juiz JM, Bledsoe SC Jr, Bonneau JM, Wenthold RJ, Altschuler RA (1992) Patterns of glutamate, glycine, and GABA immunolabeling in four synaptic terminal classes in the lateral superior olive of the guinea pig. *J Comp Neurol* 323:305-325
- Hestrin S (1992) Activation and desensitization of glutamate-activated channels mediating fast excitatory synaptic currents in the visual cortex. *Neuron* 9:991-999
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108
- Hudspeth AJ (1997) How hearing happens. *Neuron* 19:947-950
- Huettner JE (1990) Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron* 5:255-266
- Huxley A (1928) *Point Counter Point*. Chapter 3, Harper Collings, New York
- Iino M, Koike M, Isa T, Ozawa S (1996) Voltage-dependent blockage of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors by joro spider toxin in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 496:431-437
- Irvine DRF (1986) *Progress in Sensory Physiology 7. The Auditory Brainstem*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Isaacson JS (1999) Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. *Neuron* 23:377-384

- Jonas P (1995) Fast application of agonists to isolated membrane patches. In: Single-Channel Recording. 2. Aufl. (Sakmann B, Neher E, eds), pp 231-243. Plenum, New York.
- Joris PX (1996) Envelope coding in the lateral superior olive. II. Characteristic delays and comparison with responses in the medial superior olive. *J Neurophysiol* 76:2137-2156
- Kandler K, Friauf E (1995a) Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *J Neurosci* 15:6890-6904
- Kandler K, Friauf E (1995b) Development of electrical membrane properties and discharge characteristics of superior olivary complex neurons in fetal and postnatal rats. *Europ J Neurosci* 7:1773-1790
- Kidd FL, Isaac JTR (1999) Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* 400:569-573
- Kiskin NI, Krishtal OA, Tsyndrenko AY (1986) Excitatory amino acid receptors in hippocampal neurons: kainate fails to desensitize them. *Neurosci Lett* 63:225-230
- Kotak VC, Sanes DH (1995) Synaptically evoked prolonged depolarizations in the developing auditory system. *J Neurophysiol* 74:1611-1620
- Li H, Rogawski MA (1998) GluR5 kainate receptor mediated synaptic transmission in rat basolateral amygdala in vitro. *Neuropharmacol* 37:1279-1286
- Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettner JE, Zhuo M (1999) Kainate receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397:161-164
- Liu Q-S, Patrylo PR, Gao X-B, Van Den Pol AN (1999) Kainate acts at presynaptic receptors to increase GABA release from hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 82:1059-1062
- Löhrke S, Brandstätter JH, Friauf E (1999) Developmental distribution of glutamate receptor subunits KA2, GluR6/7, and $\delta 1/2$ in the rat medial nucleus of the trapezoid body. *Soc Neurosci Abstr* 25, Part 1, p. 1236
- Masterton B, Thompson GC, Bechtold JK, RoBards MJ (1975) Neuroanatomical basis of binaural phase-difference analysis for sound localization: a comparative study. *J Comp Physiol Psychol* 89:379-386
- Mayer ML, Vyklicky L Jr (1989) Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1411-1415
- Nicoll RA, Mellor J, Frerking M, Schmitz D (2000) Kainate receptors and synaptic plasticity. *Nature* 406:957
- Oertel D (1997) Encoding of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Neuron* 19:959-962
- Otis TS, Raman IM, Trussell LO (1995) AMPA receptors with high Ca^{2+} permeability mediate synaptic transmission in the avian auditory pathway. *J Physiol* 482:309-315
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618
- Park TJ, Grothe B, Pollak GD, Schuller G, Koch U (1996) Neural delays shape selectivity to interaural intensity differences in the lateral superior olive. *J Neurosci* 16:6554-6566

- Park TJ, Monsivais P, Pollak GD (1997) Processing of interaural intensity differences in the LSO: role of interaural threshold differences. *Neurophysiol* 77:2863-2878
- Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 11:1069-1082
- Partin KM, Fleck MW, Mayer ML (1996) AMPA receptor flip/flop mutants affecting deactivation, desensitization, and modulation by cyclothiazide, aniracetam, and thiocyanate. *Neurosci* 16:6634-6647
- Paternain AV, Morales M, Lerma J (1995) Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* 14:185-189
- Perkinton MS, Sihra TS (1999) A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neurosci* 90:1281-1292
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994) Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J Comp Neurol* 349:85-110
- Pidoplichko VI (1996) Dependence of solution exchange time on cell or patch linear dimensions in concentration jump experiments using patch-clamped sensory neurones. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 432:1074-1079
- Rietzel HJ, Friauf E (1998) Neuron types in the rat lateral superior olive and developmental changes in the complexity of their dendritic arbors. *J Comp Neurol* 390:20-40
- Rodriguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J (1997) Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19:893-901
- Rodriguez-Moreno A, Lerma J (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 20:1211-1218
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599
- Sanes DH, Siverls V (1991) Development and specificity of inhibitory terminal arborizations in the central nervous system. *J Neurobiol* 22:837-854
- Sanes DH (1993) The development of synaptic function and integration in the central auditory system. *J Neurosci* 13:2627-2637
- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* 19:1141-1146
- Schmidt RF (1995) *Neuro- und Sinnesphysiologie*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Seeburg PH (1993) The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359-365
- Seeburg PH (1994) Functional diversity of glutamate receptor channels. In: *Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Higher Neural Functions* (Selverston AI, Ascher P, eds), pp 247-256. John Wiley & Sons, Ltd.
- Smith PH (1995) Structural and functional differences distinguish principal from nonprincipal cells in the guinea pig MSO slice. *J Neurophysiol* 73:1653-1667

- Sommer B, Seeburg PH (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* 13:291-296
- Stein E, Cox JA, Seeburg PH, Verdoorn TA (1992) Complex pharmacological properties of recombinant alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 42:864-871
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 423:511-518
- Swanson GT, Green T, Heinemann SF (1998) Kainate receptors exhibit differential sensitivities to (S)-5-iodowillardiine. *Mol Pharmacol* 53:942-949
- Tong G, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* 16:1147-1157
- Trussell LO, Fischbach GD (1989) Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron* 3:209-218
- Trussell LO (1997) Cellular mechanisms for preservation of timing in central auditory pathways. *Curr Opin Neurobiol* 7:487-492
- Trussell LO (1999) Synaptic mechanisms for coding timing in auditory neurons. *Annu Rev Physiol* 61:477-496
- Tsuchitani C (1977) Functional organization of lateral cell groups of cat superior olivary complex. *J Neurophysiol* 40:296-318
- Uziel A, Romand R, Marot M (1981) Development of cochlear potentials in rats. *Audiology* 20:89-100
- Vignes M, Clarke VRJ, Parry MJ, Bleakman D, Lodge D, Ornstein PL, Collingridge GL (1998) The GluR5 subtype of kainate receptor regulates excitatory synaptic transmission in areas CA1 and CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 37:1269-1277
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388:179-182
- Wang LY, Salter MW, MacDonald JF (1991) Regulation of kainate receptors by cAMP-dependent protein kinase and phosphatases. *Science* 253:1132-1135
- Wang LY, Taverna FA, Huang XP, MacDonald JF, Hampson DR (1993) Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science* 259:1173-1175
- Weisskopf MG, Nicoll RA (1995) Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature* 376:256-259
- Wilding TJ, Huettner JE (1995) Differential antagonism of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring and kainate-preferring receptors by 2,3-benzodiazepines. *Mol Pharmacol* 47:582-587
- Wong LA, Mayer ML (1993) Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 44:504-510
- Wong LA, Mayer ML, Jane DE, Watkins JC (1994) Willardiines differentiate agonist binding sites for kainate-versus AMPA-preferring glutamate receptors in DRG and hippocampal neurons. *J Neurosci* 14:3881-3897

- Wu SH, Fu XW (1998) Glutamate receptors underlying excitatory synaptic transmission in the rat's lateral superior olive studied in vitro. *Hearing Res* 122:47-59
- Wu SH, Kelly JB (1992a) NMDA, non-NMDA and glycine receptors mediate binaural interaction in the lateral superior olive: physiological evidence from mouse brain slice. *Neurosci Lett* 134:257-260
- Wu SH, Kelly JB (1992b) Synaptic pharmacology of the superior olivary complex studied in mouse brain slice. *J Neurosci* 12:3084-3097
- Yeckel MF, Kapur A, Johnston D (1999) Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nature Neurosci* 2:625-633
- Yue KT, MacDonald JF, Pekhletski R, Hampson DR (1995) Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *Eur J Pharmacol* 291:229-235
- Zhou LM, Gu ZQ, Costa AM, Yamada KA, Mansson PE, Giordano T, Skolnick P, Jones KA (1997) (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors. *Pharmacol Exp Ther* 280:422-427

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei:

- Prof. Dr. Eckhard Friauf für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu können sowie für die Bereitstellung finanzieller Mittel.
- Dr. Stephan Lührke für die Vergabe des Themas sowie für die gute Betreuung und Zusammenarbeit und die Gewährung finanzieller Mittel.
- Prof. Dr. Herbert Zimmermann für die Bereitschaft, als Mitglied des Fachbereiches Biologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt meine Arbeit zu begutachten.
- Allen Mitgliedern der AG Friauf.
- Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs “Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen”.
- Herrn Mittendorf von der Elektronikwerkstatt des Zentrums der Physiologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Applikationssystems.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 269 / Graduiertenkolleg “Neuronale Plastizität”) unterstützt.

Lebenslauf

Harald Vitten

Geboren: 05.03.1969 in Koblenz

Eltern: Dieter Vitten und Christa Vitten, geb. Posth

Familienstand: Verheiratet seit 18.08.2000 mit Carolin Vitten, geb. Fängewisch

Studium

- 1997 - 2000** Universität Frankfurt und Universität Kaiserslautern
Promotion im Labor von Prof. Dr. E. Friauf
- 1997 - 2000** Stipendiat des Graduiertenkollegs 'Neuronale Plastizität:
Moleküle, Strukturen, Funktionen', Universität Frankfurt
- 1995 - 1997** Universität Kaiserslautern
Studium der Biologie, Thema der Abschlussarbeit: Intrazelluläre
Calciumtransienten in kultivierten Astrocyten
Abschluss: Diplom in Biologie
- 1991 - 1995** Universität Koblenz
Studium der Biologie und der Physik, Thema der Abschlussarbeit:
Biometrie und Ortstreue von *Hyla arborea* auf der Schmidtenhöhe
Abschluss: 1. Staatsexamen für das Lehramt an Realschulen
- 1990 - 1991** Universität Kaiserslautern
Studium des Maschinenwesens und der Physik

Wehrdienst

- 1989 - 1990** Fernmeldeausbildungskompanie 4/III, Mayen

Schulbildung

- 1986 - 1989** Technisches Gymnasium, Neuwied
Abschluss: Abitur
- 1984 - 1986** Staatliche Realschule, Koblenz-Karthause
- 1979 - 1984** Bischöfliches Gymnasium, Koblenz
- 1975 - 1979** Grundschule, Koblenz