

**Einfluss gedächtnisrelevanter Prozesse auf die
Glutamat- und GABA-Freisetzung aus
hippocampalen Primärkulturzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der
Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

CHRISTIAN HUNZINGER
geboren in Frankfurt am Main

Mainz, 2001

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | iv |
| EINLEITUNG | 1 |
| 1 Grundlagen der synaptischen Signalübertragung..... | 1 |
| 1.1 Die chemische Synapse | 1 |
| 1.2 Neurotransmitterrezeptoren..... | 2 |
| 1.3 Termination der Signalübertragung | 6 |
| 2 Der Hippocampus | 7 |
| 2.1 Aufbau und funktionelle Organisation | 8 |
| 3 Die Langzeitpotenzierung – ein molekulares Gedächtnismodell | 10 |
| 4 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) | 13 |
| 4.1 Neuronale nAChR und Gedächtnis..... | 15 |
| 4.2 Neuronale nAChR im Hippocampus | 17 |
| 5 Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)..... | 19 |
| 5.1 Neurotransmitteranalyse mit HPLC | 21 |
| 6 Zielsetzung der Arbeit | 23 |
| MATERIAL UND METHODEN..... | 25 |
| 1 Allgemeine Chemikalien | 25 |
| 2 Präparation hippocampaler Synaptosomen | 25 |
| 2.1 Gewebepräparation | 25 |
| 2.2 Gewinnung der synaptosomalen Fraktion | 26 |
| 3 Primärkultur hippocampaler Zellen | 27 |
| 3.1 Gewebepräparation | 27 |
| 3.2 Enzymverdau und Vereinzelung..... | 27 |
| 3.3 Ermittlung der Zellzahl und Ausplattierung | 28 |
| 4 Proteinbestimmung mit BCA-Assay | 29 |
| 4.1 Vorbereitende Maßnahmen | 29 |
| 4.2 Durchführung..... | 29 |
| 5 Experimente mit hippocampalen Synaptosomen | 30 |
| 5.1 Extraktion von intrasynaptosomalem Glutamat und GABA..... | 30 |
| 5.2 Stimulation mit K^+ (Depolarisation)..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 6 Experimente mit hippocampalen Primärkulturzellen | 31 |
| 6.1 Stimulation mit K^+ und nikotinischen (Ant-)Agonisten | 31 |
| 6.2 Glutamat-Potenzierung | 31 |
| 7 Modifikation der Überstände aus Abschnitt 5 und 6 | 32 |
| 8 Abtrennung von Proteinen durch Acetonfällung | 32 |
| 9 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) | 32 |
| 10 Silberfärbung | 33 |
| 11 Derivatisierung von Aminosäuren | 34 |
| 11.1 Derivatisierung mit <i>ortho</i> -Phthaldialdehyd (OPA) | 34 |
| 11.2 Derivatisierung mit 6-Aminochinolyl-N-hydroxy-succinimidylcarbammat (AQC) | 35 |
| 12 Chromatographische Trennung und Nachweis derivatisierter Aminosäuren | 36 |
| 12.1 Trennung und Nachweis OPA-derivatisierter Aminosäuren | 36 |
| 12.2 Trennung und Nachweis AQC-derivatisierter Aminosäuren | 38 |
| 13 Auswertung der Chromatogramme | 39 |
| 13.1 Identifizierung und Quantifizierung von OPA-derivatisiertem Glutamat und GABA | 39 |
| 13.2 Identifizierung und Quantifizierung des AQC-GABA-Derivates | 41 |
| 13.3 Darstellung der Versuchsergebnisse | 41 |
| 13.4 Statistik | 41 |
| ERGEBNISSE | 42 |
| 1 Etablierung des Testsystems | 42 |
| 1.1 Derivatisierung von Glutamat und GABA mit <i>ortho</i> -Phthaldialdehyd | 42 |
| 1.1.1 <i>Optimale Derivatisierungsdauer</i> | 43 |
| 1.1.2 <i>Optimale Exzitations- und Emissionswellenlänge für die Fluoreszenzdetektion</i> | 44 |
| 1.1.3 <i>Absolute Nachweisgrenze</i> | 46 |
| 1.1.4 <i>Reproduzierbarkeit der Methode</i> | 47 |
| 1.2 Beseitigung von Proteinverunreinigungen aus biologischen Proben | 48 |
| 1.3 Freisetzung von Glutamat und GABA aus neuronalem Gewebe | 51 |
| 1.3.1 <i>Modifikation des Elutionsgradienten</i> | 51 |
| 1.3.2 <i>K^+-stimulierte Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen</i> | 53 |
| 1.3.3 <i>K^+-stimulierte Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen – Vergleich zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultur</i> | 56 |
| 2 Modulation der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen durch nikotinische (Ant-) Agonisten | 61 |
| 2.1 Modulation durch Nikotin und Galanthamin – Vorversuche | 61 |
| 2.2 Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin- und Galanthamin-modulierte Freisetzung von Glutamat und GABA | 64 |
| 2.3 Einfluss des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin | 68 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3 | Glutamat-Potenzierung in hippocampalen Primärkulturzellen – Einfluss auf die GABA-Freisetzung | 72 |
| | DISKUSSION | 77 |
| 1 | Etablierung des Testsystems | 77 |
| 1.1 | Reversed-Phase-HPLC als Analysemethode zum Nachweis von Glutamat und GABA..... | 77 |
| 1.2 | K ⁺ -stimulierte Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen und Primärkulturzellen | 78 |
| 2 | Modulation der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen durch Nikotin und Galanthamin | 81 |
| 3 | Auswirkungen einer Glutamat-Potenzierung auf die GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen | 87 |
| 4 | Ausblick | 89 |
| | ZUSAMMENFASSUNG | 91 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 93 |
| | ANHANG | 106 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) |
| Ach | Acetylcholin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPA | (S)- α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolpropionsäure |
| AMPAR | (S)- α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor |
| AP-5 | D-2-Amino-5-phosphonopentanonsäure |
| APL | allosterisch potenzierender Ligand |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AQC | 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbamat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUC | Area under curve (Peakfläche) |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BSA | Rinderserum-Albumin |
| CA1-3 | Felder CA1-3 des Ammonshorns |
| CNQX | 6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion |
| CSF | (artifizielle) cerebrospinale Flüssigkeit |
| DABSYL-Cl | Dimethylaminoazobenzol-sulfonylchlorid |
| DG | Gyrus dentatus |
| Dh β E | Dihydro- β -erythroidin |
| DPE | 1,2-Diphenylethylendiamin |
| DTT | Dithiothreitol |
| EC | Entorhinaler Cortex |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EGTA | [Ethylen-bis(oxyethylennitrilo)] tetraessigsäure |
| EPSP | exzitatorisches postsynaptisches Potenzial |
| FCS | fötales Kälberserum |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GABAR | γ -Aminobuttersäure-Rezeptor |
| Gal | Galanthamin |
| GluR | Glutamatrezeptor |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure |
| hil | Hilus |
| HiPK | hippocampale Primärkultur(zellen) |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie |
| IPSP | inhibitorisches postsynaptisches Potenzial |

| | |
|-------------------|---|
| K _D | Dissoziationskonstante |
| LTP | Langzeitpotenzierung |
| mAChR | muskarinischer Acetylcholinrezeptor |
| MCPG | (S)- α -Methyl-carboxyphenylglycin |
| mGluR | metabotroper Glutamatrezeptor |
| MLA | Methyllycaconitin |
| MS-ESI | Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation |
| nAChR | nikotinischer Acetylcholinrezeptor |
| NaTES | Natriumsalz der N-Tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure |
| NCA | nicht-kompetitiver Agonist |
| Nik | Nikotin |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| NMDAR | N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor |
| OPA | <i>ortho</i> -Phthaldialdehyd |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PITC | Phenylisothiocyanat |
| PLL | Poly-L-Lysin |
| PNS | peripheres Nervensystem |
| RP-HPLC-FLD | Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Subiculum |
| sd | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sem | Standardfehler des Mittelwertes |
| sg | Stratum granulare |
| sm | Stratum molekulare |
| so | Stratum oriens |
| sp | Stratum pyramidale |
| Stat. Sig. | Statistische Signifikanz |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| ZNS | zentrales Nervensystem |
| α -Bgt | α -Bungarotoxin |
| α -Cnt-MII | α -Conotoxin-MII |

Einleitung

1 Grundlagen der synaptischen Signalübertragung

1.1 Die chemische Synapse

Die synaptische Signalübertragung kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen, elektrisch und chemisch. Bei der elektrischen Synapse liegen die Membranen der prä- und der postsynaptischen Zelle dicht beieinander und bilden ‚Gap junctions‘ aus, über die das elektrische Signal direkt und ohne Verzögerung weitergeleitet werden kann.

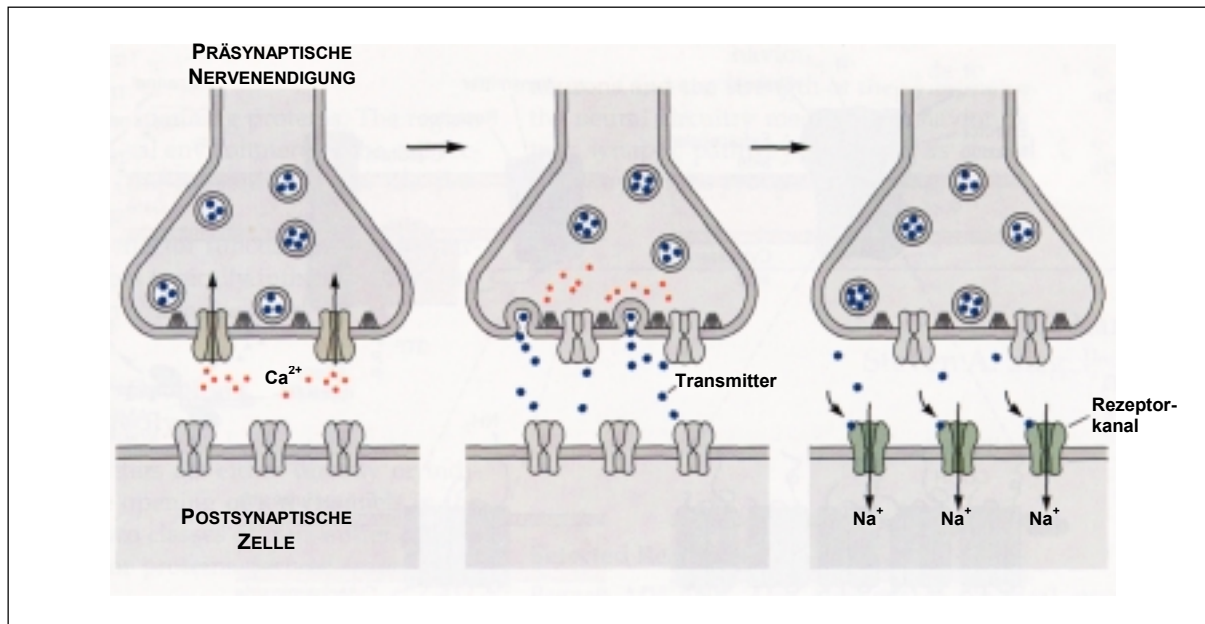


Abb. 1: Signalübertragung an einer chemischen Synapse. Durch ein eintreffendes elektrisches Signal (Aktionspotential) wird die präsynaptische Membran depolarisiert, was zur Öffnung spannungabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und damit zu einem massiven Ca^{2+} -Einstrom in die präsynaptische Nervenendigung führt (links). Durch den Anstieg des präsynaptischen Ca^{2+} -Spiegels kommt es zur Freisetzung des Neurotransmitters via Exocytose (mitte). Durch die Bindung des Neurotransmitters an seine spezifischen Rezeptoren wird die postsynaptische Membran entweder direkt (über ionotrope Rezeptoren) oder indirekt (über metabotrope Rezeptoren) depolarisiert (rechts) (nach Kandel et al., 2000).

Das Prinzip der chemischen Signalübertragung (Abb. 1) besteht darin, daß ein in der präsynaptischen Nervenendigung ankommendes elektrisches Signal – das Aktionspotential – die Ausschüttung eines chemischen Botenstoffes (Neurotransmitter) auslöst, also in ein chemisches Signal umgewandelt wird. Die entscheidende Rolle bei der Signalumwandlung kommt dabei den spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen zu, die geöffnet werden, wenn das Potential der präsynaptischen Membran (-60 bis -90 mV) durch ein ankommendes

Aktionspotenzial erhöht wird (Depolarisation). Durch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum steigt der cytosolische Ca^{2+} -Spiegel auf 0,5 - 1 μM an. Erst durch diesen Anstieg kommt es zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels, die schließlich in der Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran und damit der Freisetzung der in den Vesikeln enthaltenen Neurotransmitter mündet. Der freigesetzte Neurotransmitter diffundiert durch den zwischen den beiden Zellen liegenden extrazellulären Raum (synaptischer Spalt) und bindet an seinen spezifischen Rezeptor in der subsynaptischen Membran der postsynaptischen Zelle. Je nach Art des postsynaptischen Rezeptors wird durch dessen Aktivierung direkt (ionotrope Rezeptoren) oder indirekt (metabotrope Rezeptoren) ein transmembranöser Ionenstrom bewirkt, der das lokale Membranpotential der postsynaptischen Zelle ändert. Somit wird das chemische Signal wieder in ein elektrisches umgewandelt. Dabei wird das Membranpotential entweder erhöht (Depolarisation) und damit die postsynaptische Zelle aktiviert oder gesenkt (Hyperpolarisation), was eine Hemmung der postsynaptischen Zelle zur Folge hat.

1.2 Neurotransmitterrezeptoren

Neurotransmitterrezeptoren werden in zwei Superfamilien unterteilt. Die erste Superfamilie bilden die ligandengesteuerten Ionenkanäle, die ionotropen Rezeptoren. Hierbei handelt es sich um glykosilierte Transmembranproteine, die gleichzeitig eine Transmitterbindestelle und einen Ionenkanal besitzen. Dadurch kann über die Bindung des Botenstoffes das Öffnen und Schließen des Kanals sehr schnell und direkt reguliert werden. Einige dieser Ionenkanäle sind permeabel für Anionen, wie z.B. die GABA_A - (Pritchett et al., 1989) und die Glycin-Rezeptoren (Betz, 1987). Diese Rezeptoren bewirken im aktivierten Zustand eine Hyperpolarisierung und damit eine Hemmung der postsynaptischen Zelle. Andere Rezeptoren sind permeabel für Kationen und erreichen dadurch eine Depolarisation, also eine Erregung der postsynaptischen Zelle. Zu diesen zählen die NMDA-, die 5-HT_3 - (Maricq et al., 1991) sowie die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) (Maelicke, 1992).

Der nAChR der neuromuskulären Endplatte des Säugers oder der Elektrocyte elektrischer Fische stellt den am besten charakterisierten Neurorezeptor dar. Darüberhinaus gilt er als Prototyp eines ionotropen Rezeptors, dessen Grundstruktur auf die meisten Mitglieder dieser Superfamilie übertragbar ist. Der neuromuskuläre nAChR (Abb. 2) ist ein pentameres, integrales Membranprotein, das aus vier verschiedenen Untereinheiten mit der Stöchiometrie $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ zusammengesetzt ist (Raferty et al., 1980). Alle Untereinheiten besitzen den gleichen Grundaufbau: Eine extrazelluläre N-terminale Domäne, nachfolgend drei hydrophobe Regionen M1-M3, die membrandurchspannende α -Helices bilden, eine größere

intrazelluläre Domäne, den sog. großen cytoplasmatischen ‚Loop‘, und schließlich eine weitere transmembrane Region M4, sodaß der C-Terminus ebenfalls extrazellulär liegt. Die Untereinheiten sind in der Membran in einer pentagonalen Symmetrie angeordnet, so daß in ihrer Mitte ein Ionenkanal (\varnothing ca. 6,5 nm) entsteht, an dessen Auskleidung vermutlich die M2-Region einer jeden Untereinheit beteiligt ist (Brisson et al., 1985; Imoto et al., 1986; Revah et al., 1990). Die Kationenselektivität dieses Kanals beruht auf der Ausbildung dreier negativ geladener Ringe, die von den Aminosäuren Glutamat und Asparagin gebildet werden (Imoto et al., 1988). Die Bindungsstellen für den Neurotransmitter Acetylcholin sowie für weitere Agonisten und kompetitive Antagonisten befinden sich innerhalb der extrazellulären N-terminalen Domäne der beiden α -Untereinheiten (Maelicke, 1988; Changeux, 1990; Galzi et al., 1991).

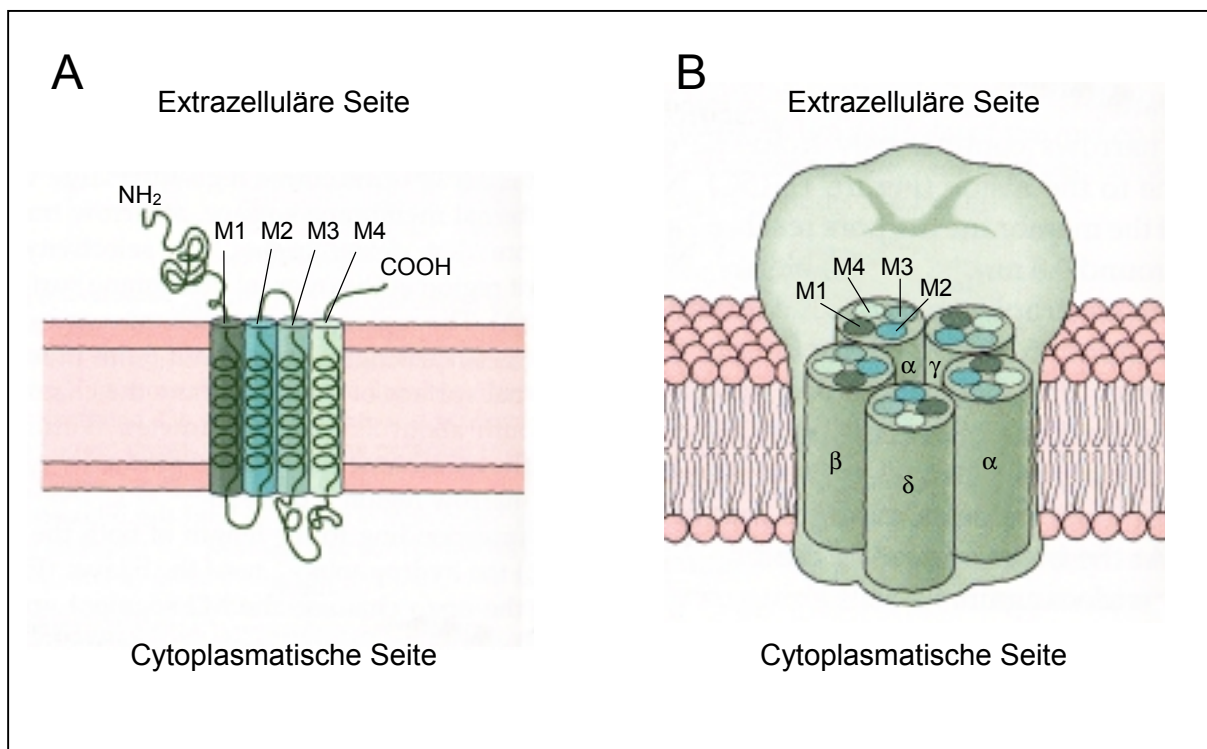


Abb. 2: Modell des muskulären nikotinischen AChR. In **A** sind die für die Neurotransmitterbindung verantwortliche N-terminale Domäne sowie die vier α -helikalen Transmembransegmente M1-4 einer einzelnen Untereinheit abgebildet. **B** zeigt die transmembrane Organisation der Segmente M1-4 sowie die Anordnung aller fünf Untereinheiten des Rezeptors in der Lipidmembran unter Ausbildung eines Ionenkanals (nach Kandel et al., 2000).

Die zweite Superfamilie bilden die G-Protein gekoppelten, metabotropen Rezeptoren (Abb. 3). Hierzu gehören u.a. die dopaminergen und adrenergen Rezeptoren sowie die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Der typische metabotrope Rezeptor besteht aus einer einzigen Untereinheit mit sieben membrandurchspannenden, α -helikalen Abschnitten,

wobei der N-Terminus im extrazellulären Raum, der C-Terminus im Cytoplasma liegt (Lefkowitz & Caron, 1988). Allen Rezeptoren dieser Superfamilie ist die intrazelluläre Kopplung an ein GTP-bindendes Protein, das sog. G-Protein, gemeinsam. Dieses G-Protein ist das Bindeglied zwischen dem Rezeptor und den Signalkaskaden, auf deren Aktivierung hin die vielen verschiedenen intrazellulären Antworten ablaufen (Friessmuth et al., 1989). Dabei folgen alle Signalkaskaden einem gemeinsamen Grundschema (Allende, 1988) (Abb.4). Aufgrund der Tatsache, dass die über metabotrope Rezeptoren vermittelte Signalübertragung um mehrere Größenordnungen langsamer ist als die über ionotrope Rezeptoren, ist sie weniger für die unmittelbare Reizweiterleitung als vielmehr für die Langzeitregulierung der Transmitterwirkung von Bedeutung (ibid.). Der vergleichsweise langsamen Signalübertragung steht allerdings eine äußerst hohe Effektivität gegenüber, die sich aus der erheblichen Verstärkung des ursprünglichen Signals über die mehrstufigen Kaskaden ergibt (ibid.).

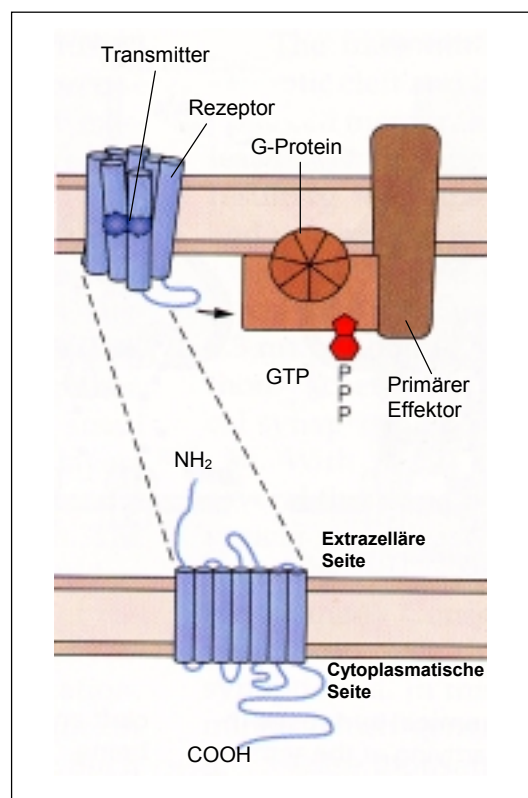


Abb.3: Aufbau metabotroper Neurotransmitterrezeptoren. Metabotrope Neurotransmitterrezeptoren sind Monomere und besitzen sieben α -helikale, membrandurchspannende Segmente. Der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus hingegen intrazellulär. Die Neurotransmitterbindungsstelle liegt im transmembranen Abschnitt. Auf der cytoplasmatischen Seite ist ein GTP-bindendes (G-)Protein assoziiert, welches mit dem primären Effektor, einem membranständigen Enzym, interagiert (nach Kandel et al., 2000).

Die Unterschiede in Wirkmechanismus und Funktion von metabotropen und ionotropen Rezeptoren spiegeln sich auch in der Verteilung auf der Oberfläche der postsynaptischen Membran wider: ionotrope Rezeptoren sind in großer Zahl genau gegenüber der präsynaptischen Membran lokalisiert, während die metabotropen weiter verstreut liegen (Nicholls, 1995).

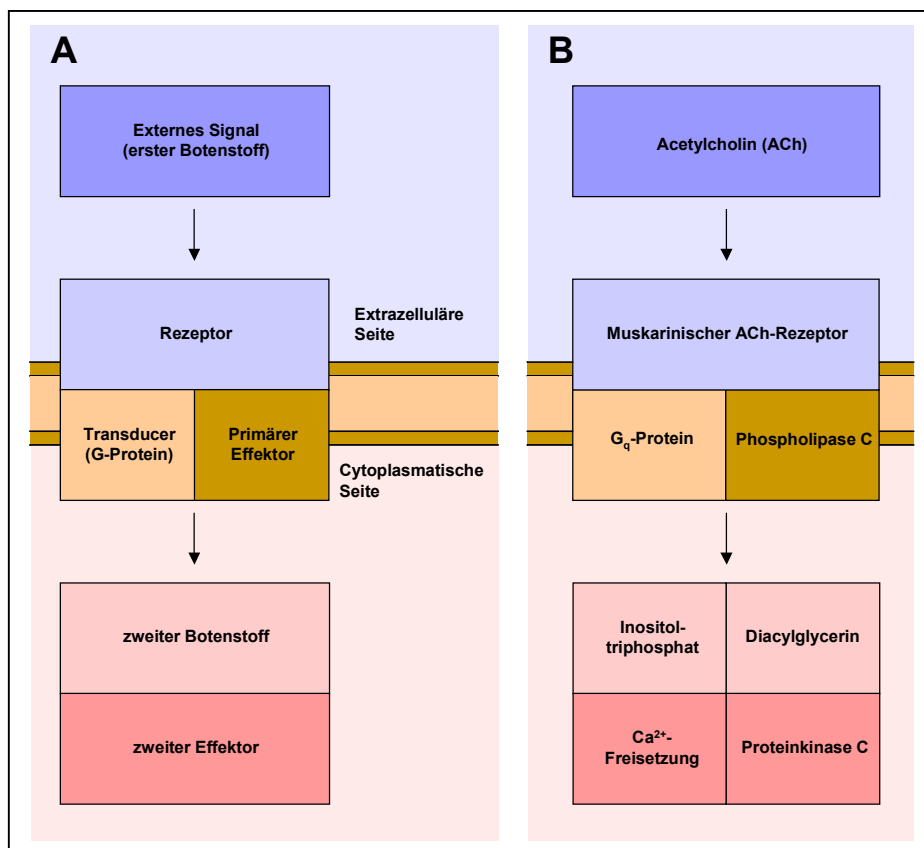


Abb. 4: Wirkmechanismus metabotroper Rezeptoren. A: Schematische Darstellung des generellen Wirkmechanismus (Signalkaskade), in B am Beispiel des muskarinischen Acetylcholinrezeptors verdeutlicht (nach Kandel et al., 2000).

Neurotransmitterrezeptoren sind nicht nur auf die postsynaptische Membran beschränkt, sondern können darüber hinaus auch präterminal und präsynaptisch vorkommen (Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass über die Aktivierung verschiedener metabotroper sowie ionotroper Rezeptoren in diesen Bereichen die Transmitterfreisetzung und somit die synaptische Signalübertragung im ZNS und PNS moduliert werden kann (zusammengefasst und begutachtet von Miller, 1998).

Für die metabotropen Rezeptoren werden dabei folgende Mechanismen diskutiert: (a) Inhibition spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle in der präsynaptischen Membran; (b) Aktivierung von Kationen- (K^+ , Na^+) oder Anionen-Kanälen (Cl^-) und daraus resultierend eine

Verstärkung oder Abschwächung des in der präsynaptischen Endigung ankommenden elektrischen Signals; und (c) direkte Modulation einer oder mehrerer Komponenten des Neurotransmitter-Vesikel freisetzenden Apparates (ibid.). Im Falle der ionotropen Rezeptoren scheint die Modulation zum einen ebenfalls über die Aktivierung von Kationen- oder Anionen-Kanälen zu erfolgen, zum anderen ist auch eine direkte Beeinflussung der Transmitterfreisetzung durch Rezeptoren mit hoher Ca^{2+} -Permeabilität wie etwa den NMDA-Subtyp der Glutamaterezeptoren oder den $\alpha 7$ -nAChR möglich (ibid.).

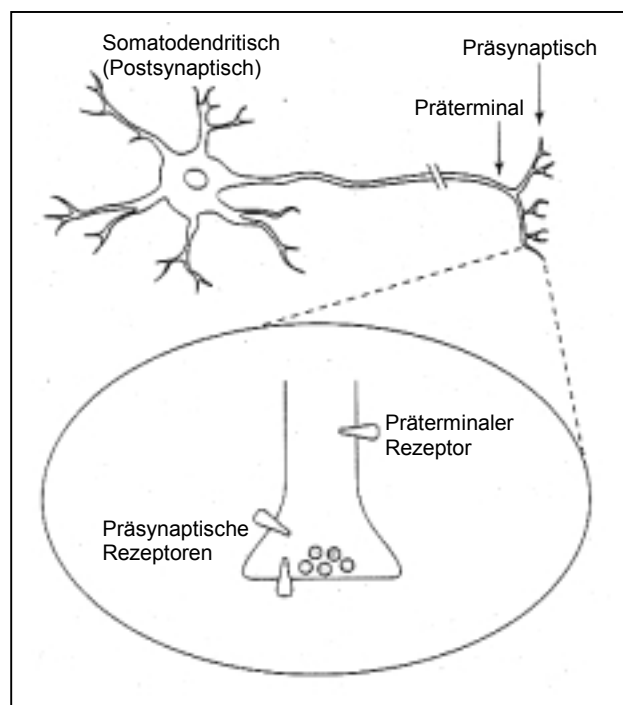


Abb. 5: Mögliche Lokalisation von Neurotransmitterrezeptoren. Durch Aktivierung präterminaler und/oder präsynaptischer Rezeptoren kann die Transmitterausschüttung an der Synapse moduliert werden (nach S. Wonnacott, 1997).

1.3 Termination der Signalübertragung

Zur Termination der Signalübertragung an einer chemischen Synapse muss die Neurotransmitteraktivität an den Rezeptoren der prä- und postsynaptischen Membranen beendet werden. Dafür sorgen drei Mechanismen: Diffusion, enzymatischer Abbau und Wiederaufnahme von Neurotransmittern. Die Diffusion stellt in diesem Zusammenhang einen allgemeinen, unspezifischen Mechanismus dar, durch den ein gewisser Teil aller chemischer Transmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt wird.

Enzymatischer Abbau findet in erster Linie an cholinergen Synapsen statt. Acetylcholin wird durch die im synaptischen Spalt vorhandene Acetylcholinesterase in Acetat und Cholin

gespalten, wobei letzteres zur Neusynthese von Acetylcholin über spezifische Transporter wieder in die präsynaptische Endigung gebracht wird (Taylor et al., 1987). Auch neuroaktive Peptide, wie z. B. die Endorphine, werden zum Teil durch extrazelluläre Proteasen abgebaut und somit inaktiviert (Kandel et al., 2000). Viele andere enzymatische Systeme, die freigesetzte Neurotransmitter spalten, sind nicht an der Termination der synaptischen Signalübertragung beteiligt, können aber von großer Bedeutung sein für die Neurotransmitterkonzentration innerhalb eines Neurons oder die Inaktivierung von Neurotransmittern, die aus dem Bereich des synaptischen Spaltes diffundiert sind.

Die Wiederaufnahme von Neurotransmittern ist der am weitesten verbreitete Mechanismus. Dieser Mechanismus dient dabei nicht nur zur Termination der synaptischen Aktivität des Neurotransmitters sondern auch zur Wiedergewinnung desselben. Diese Wiederaufnahme wird von spezifischen, hochaffinen Transportermolekülen vermittelt, die in den Membranen von präsynaptischen Nervenendigungen und Gliazellen lokalisiert sind. Bezüglich Struktur und Wirkungsweise können zwei Gruppen von Wiederaufnahme-Transportern unterschieden werden: Die eine Gruppe besteht aus den Glutamat-Transportern, die andere beinhaltet die Transporter für die Neurotransmitter GABA, Glycin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin sowie für das Acetylcholin-Abbauprodukt Cholin (Sonders & Amara, 1996).

2 Der Hippocampus

Der Hippocampus gehört zu den Hauptkomponenten des limbischen Systems und ist eine der am besten charakterisierten corticalen Strukturen. Seinen Namen hat er aufgrund der Ähnlichkeit zum Seepferdchen erhalten (griechisch: *hippo* = Pferd, *kamos* = Seeungeheuer). Das große Interesse an dieser Gehirnregion liegt in der Vermutung begründet, daß ihr eine Schlüsselrolle bei kognitiven Prozessen wie Lernen und Gedächtnis zukommt. So konnte in zahlreichen neuropsychologischen und -physiologischen Experimenten eine essentielle Rolle des Hippocampus bei bestimmten Gedächtnisformen (deklaratives Gedächtnis) und räumlichen Fähigkeiten nachgewiesen werden. Auch auf zellulärer Ebene sprechen viele Indizien für eine entscheidenden Funktion des Hippocampus bei kognitiven Prozessen. Bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Zellen hippocampaler Gewebeschnitte zeigten einige Synapsen eine bemerkenswerte Form der Plastizität. Dieses als Langzeitpotenzierung (engl. *Long Term Potentiation*, LTP) bezeichnete Phänomen ist bis heute eines der am besten untersuchten Modelle für Lernen und Gedächtnis (s.u.).

2.1 Aufbau und funktionelle Organisation

Der Hippocampus (Abb.6 B und C) kann unterteilt werden in die Felder CA1-CA3 des Ammonshorns (lat.: *cornu ammonis*, aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem Horn eines Widders) und den Gyrus dentatus. Beiden Regionen ist eine dreischichtige Grundstruktur gemeinsam, die aus einer polymorphen (1), einer pyramidalen (2) und einer molekularen (3) Schicht besteht (Amaral & Witter, 1995).

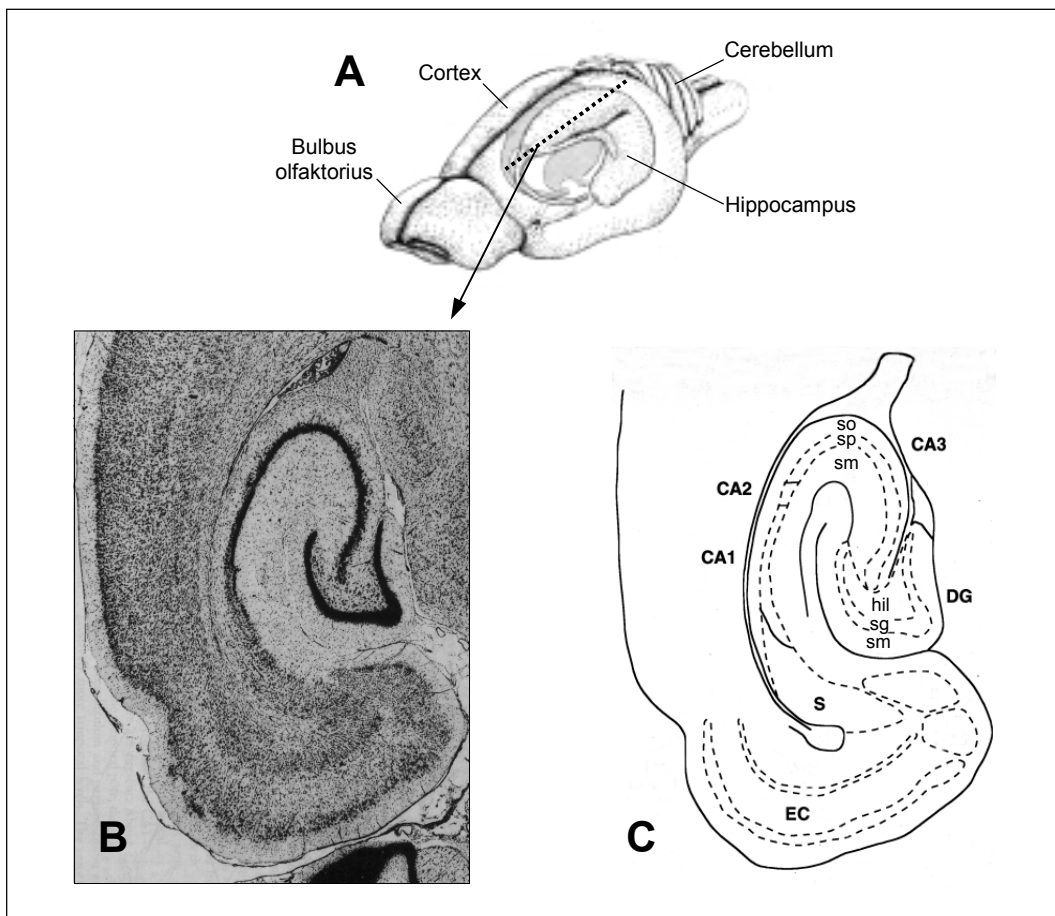


Abb. 6: Aufbau und Struktur des Hippocampus. A: Schematische Darstellung eines adulten Rattengehirnes. Die Abbildung zeigt die ungefähre Lage des Hippocampus innerhalb des Cortex sowie die Schnittebene von B und C (gestrichelte Linie). B: Horizontalschnitt, Nissl-Färbung. Zu sehen sind zum einen die vier Regionen der Hippocampus-Formation (EC, S sowie CA1-CA3 und DG als Hippocampus i. e. S.) und zum anderen die dreischichtige Grundstruktur der Felder CA1-CA3 des Ammonshorns (so, sp und sm) und des Gyrus dentatus (hil, sg und sm). C: Schemazeichnung zu a. DG: Gyrus dentatus, EC: Entorhinaler Cortex, hil: Hilus, S: Subiculum, sg: Stratum granulare, sm: Stratum molekulare, so: Stratum oriens, sp: Stratum pyramidale (nach Amaral & Witter, 1995).

Im Ammonshorn sind dies die *Strata oriens* (1), *pyramidale* (2) und *molekulare* (3, nochmals unterteilt in *Stratum radiatum* und *lacunosum-molekulare*), im Gyrus dentatus bezeichnet man die drei Schichten als *Hilus* (1), *Stratum granulare* (2) und *Stratum molekulare* (3). Das

Erscheinungsbild des Hippocampus wird von den beiden pyramidalen Schichten bestimmt, in denen hauptsächlich die Somata der großen Pyramidalzellen (Ammonshorn) bzw. der etwas kleineren Granulärzellen (Gyrus dentatus) liegen. Diese beiden Zelltypen stellen die überwiegende Mehrheit der hippocampalen Neuronen (Shepherd, 1998). In den umliegenden, zellarmen Schichten befinden sich im wesentlichen die Ausläufer der Pyramidal- und Granulärzellen sowie verschiedene Interneuronen.

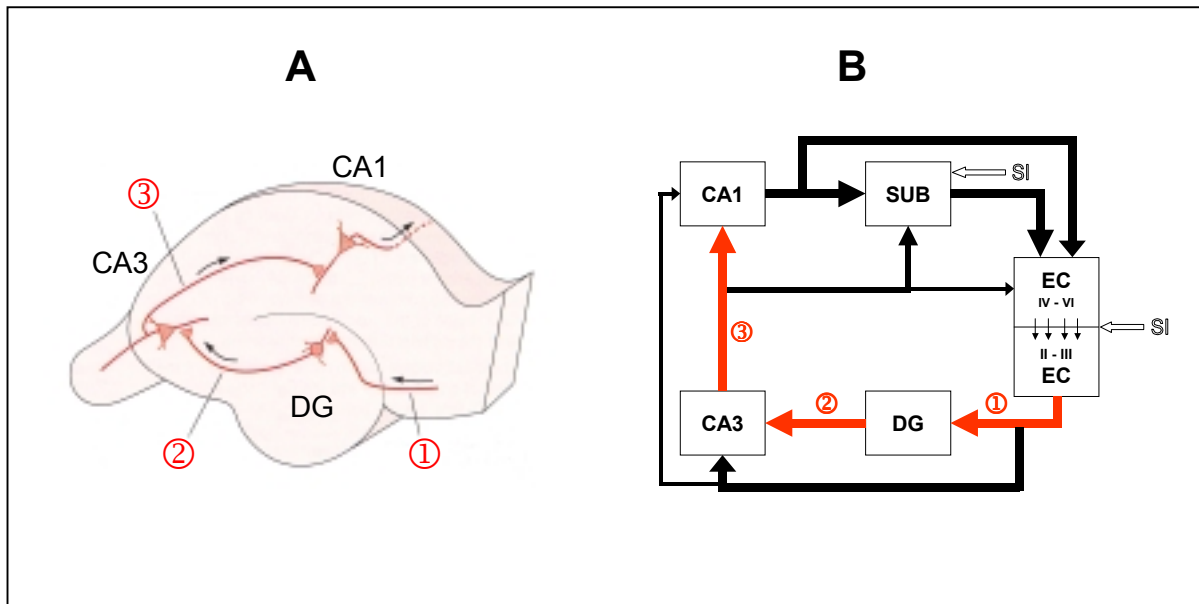


Abb. 7: Funktionelle Organisation des Hippocampus. A zeigt eine Schemazeichnung des Hippocampus mit dem trisynaptischen Schaltkreis. B: Schematischer Schaltkreis (vereinfacht) des Hippocampus. Der trisynaptische Schaltkreis ist rot hervorgehoben. ①: ‚perforant pathway‘ ②: ‚mossy fiber pathway‘ ③: ‚Schaffer collateral pathway‘; CA1, CA3: Felder CA1 und CA3 des Ammonshorns; DG: Gyrus dentatus; EC I-VI: Schichten I-VI des entorhinalen Cortex; SI: sensorischer Input; SUB: Subiculum (A nach Kandel et al., 2000; B nach Brown & Zador, 1990).

Der Hippocampus besitzt drei Hauptleitungsbahnen (engl. *pathways*) (Abb. 7): (1) den ‚perforant pathway‘, der vom benachbarten entorhinalen Cortex auf die Granulärzellen des Gyrus dentatus projiziert; (2) den ‚mossy fiber pathway‘, der die Axone der Granulärzellen enthält und zu den Pyramidalzellen der CA3-Region des Ammonshorns führt; und (3) den ‚Schaffer collateral pathway‘, der aus den exzitatorischen Kollateralen der Pyramidalzellen der CA3-Region besteht und auf den Pyramidalzellen der CA1-Region endet. Diese Sequenz exzitatorischer synaptischer Verschaltungen des Hippocampus ist traditionell als trisynaptischer Schaltkreis beschrieben worden (Andersen, 1975). Alle beteiligten Zellen sind glutamaterg, wobei der NMDA-Subtyp der ionotropen Glutamaterezeptoren besonders häufig in den Zonen vorkommt, die die Dendriten der Granulärzellen des Gyrus dentatus und der Pyramidalzellen der CA1-Region enthalten (Ikonovic et al., 1999). Neben diesen drei

Hauptleitungsbahnen existieren noch weitere exzitatorische Bahnen, die vor allem auf die benachbarten Regionen – den entorhinalen Cortex und das Subiculum – projizieren, von denen der Hippocampus im wesentlichen seinen sensorischen Input erhält (Abb. 7 B). Hippocampus, entorhinaler Cortex und Subiculum, die zusammen auch als ‚Hippocampale Formation‘ bezeichnet werden, sind somit über einen geschlossenen, unidirektionalen Schaltkreis miteinander verbunden. Inhibitorische hippocampale Schaltkreise bestehen über kollaterale Projektionen der Granulär- und Pyramidalzellen auf die in den zellarmen Schichten gelegenen GABAergen Interneuronen, deren efferente Fasern wiederum zahlreich und in unterschiedlicher Weise auf die granulären und pyramidalen Zellen projizieren. Über afferente Fasern via entorhinalen Cortex und ‚perforant pathway‘ sowie efferente Fasern der CA1-Pyramidalzellen steht der Hippocampus schließlich in einem größeren neuronalen Schaltkreis mit dem assoziativen Neocortex in Verbindung.

3 Die Langzeitpotenzierung – ein molekulares Gedächtnismodell

Der Begriff der Langzeitpotenzierung (LTP) wurde in den siebziger Jahren von T. Bliss, T. Lomø und A.K. Gardner-Medwin geprägt und beschreibt ein Phänomen, welches für alle Synapsen des trisynaptischen Schaltkreises im Hippocampus zutrifft (Bliss & Lomø, 1970, 1973; Bliss & Gardner-Medwin, 1973). Stimuliert man die Fasern der Hauptleitungsbahnen mit einer Serie kurzer, hoch-frequenter elektrischer Impulse (sog. Tetanus), führt dies zu einer dauerhaft verstärkten Erregung in den jeweiligen Zielzellen (Abb. 8). Diese Potenzierung kann in anästhesierten Tieren und *in vitro* (hippocampale Gewebeschnitte, Primärkultur) einige Stunden, in freilaufenden Tieren sogar mehrere Tage andauern. Die Bedeutung dieses Phänomens für gedächtnisrelevante Prozesse ergibt sich unter anderem aus der Beobachtung, dass das bei der Erkundung einer neuen Umgebung im Hippocampus von Ratten erzeugte Erregungsmuster in sehr effektiver Weise LTP erzeugen kann. Dieses Erregungsmuster, welches in seiner Art einem tetanischen Reiz sehr ähnlich ist, wird als Theta Rhythmus bezeichnet und entsteht im Septalen Nukleus, der über extensive Projektionen mit dem Hippocampus verbunden ist.

Die dieser Langzeitpotenzierung zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind in den einzelnen Synapsen des trisynaptischen Schaltkreises unterschiedlich. Wie oben bereits erwähnt, sind alle Neuronen des trisynaptischen Schaltkreises glutamaterg. Glutamatrezeptoren können generell in zwei Klassen aufgeteilt werden: (a) Ligandengesteuerte (ionotropen) und (b) metabotrope Rezeptoren. Bei den ionotropen Rezeptoren unterscheidet man nach ihren spezifischen Liganden den NMDA-, AMPA- und Kainat-

Subtyp. NMDA-Rezeptoren (NMDAR) zeigen zwei besondere Eigenschaften: zum einen weisen sie eine hohe Ca^{2+} -Permeabilität auf, zum anderen besitzen sie einen spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block, der erst bei genügend hoher Depolarisation aufgehoben wird (Collingridge & Lester, 1989; Hollmann & Heinemann, 1994). Für alle Rezeptortypen konnte eine Beteiligung an LTP-Prozessen gezeigt werden, wobei ihre spezifische Funktion vom involvierten LTP-Typ abhängt.

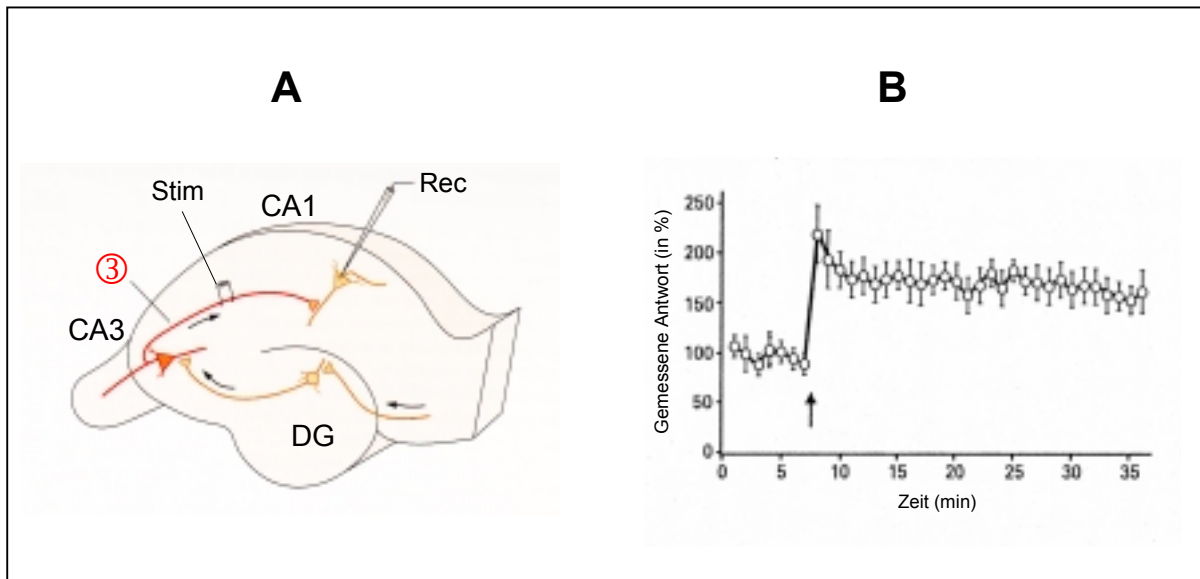


Abb. 8: Elektrische LTP-Stimulation. **A** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für LTP Stimulation und Ableitung an einem hippocampalen Gewebeschnitt. **B** Auftragung der gemessenen Antwort gegen die Zeit. Nach kurzer tetanischer Stimulation (Pfeil) ist die abgeleitete Antwort über einen Zeitraum von mehr als 30 Minuten um ca. 100 % erhöht. ③: ;Schaffer collateral pathway'; CA1, CA3: Felder CA1 und CA3 des Ammonshorns; Rec: Ableitungselektrode; Stim: Stimulationselektrode (nach Kandel et al., 2000).

Prinzipiell unterscheidet man die assoziative von der nicht-assoziativen LTP (Kandel et al., 2000). Dabei ist die assoziative Form üblicherweise (aber nicht zwingend) NMDAR-abhängig, die nicht-assoziative NMDAR-unabhängig. Beide Formen kommen im Hippocampus vor, allerdings findet man größtenteils die assoziative LTP. Die in Abb. 9 gezeigte LTP an den hippocampalen CA3-CA1-Synapsen ist ebenfalls assoziativ und stellt die bis heute am besten verstandene Form dar. Darüberhinaus ist LTP auch in anderen Gehirnbereichen, wie etwa dem Corpus geniculatum laterale, gut dokumentiert.

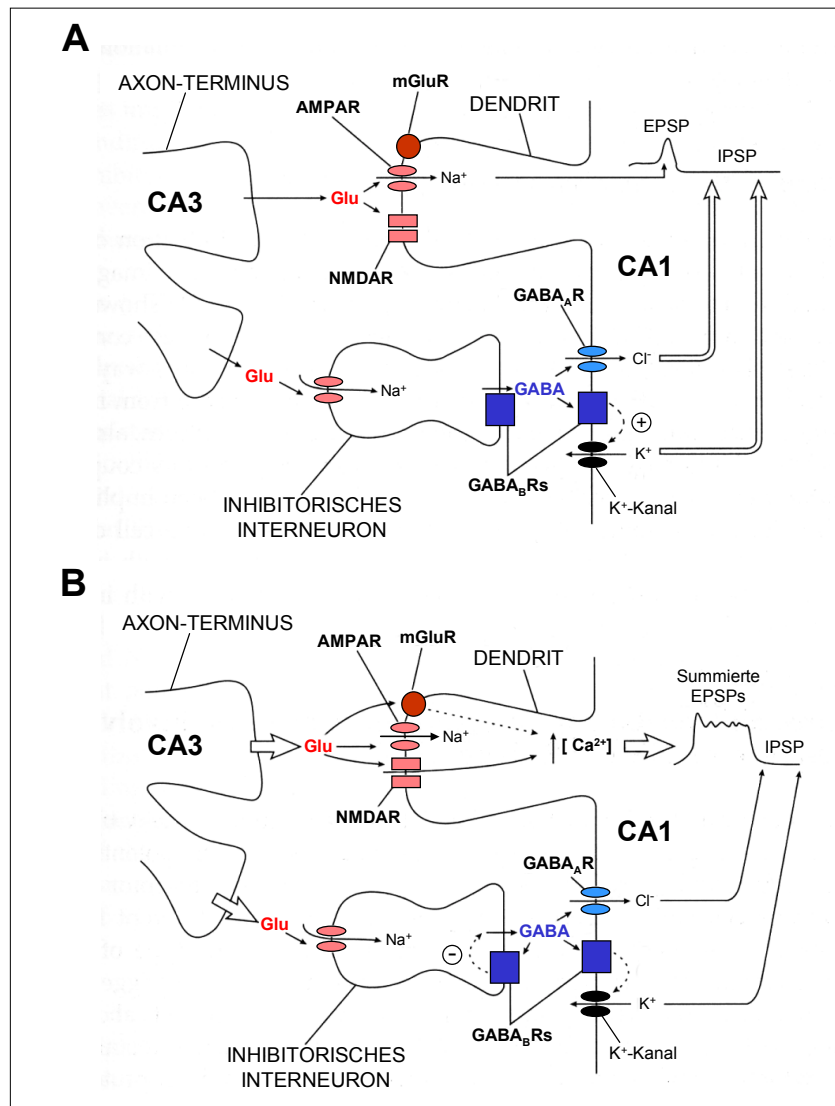


Abb. 9: Molekulare Mechanismen der Langzeitpotenzierung an CA3-CA1-Synapsen des Hippocampus. A: niederfrequente Stimulation. Ein einzelner Stimulus bewirkt ein im wesentlichen über AMPAR vermitteltes exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP). Dieses wird nach kurzer Zeit durch ein biphasisches inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP) beendet, welches über eine Erregung GABAerger Interneuronen und anschließender, zeitlich versetzter Aktivierung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren generiert wird. Eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ist unwahrscheinlich, da eine kurze Depolarisation nicht ausreicht, die Mg²⁺-Blockade des Rezeptors aufzuheben. **B: Eine hochfrequente Stimulation** bewirkt eine erhöhte Glutamat-Freisetzung und daraus resultierend eine starke, langandauernde Depolarisation, die auf Veränderungen sowohl an exzitatorischen als auch an inhibitorischen Synapsen zurückzuführen ist. An exzitatorischen Synapsen kommt es zu einer Aktivierung aller Glutamaterezeptortypen. Neben dem Na⁺-Einstrom durch AMPAR kommt es zu einem NMDAR-vermittelten, starken Ca²⁺-Einstrom. Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wird durch Aktivierung metabotroper GluR zusätzlich erhöht (Freisetzung aus intrazellulären Speichern). Über die mGluR-induzierte Signalkaskade kommt es fernerhin zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Sensibilisierung von AMPAR sowie zur Erzeugung retrograder Botenstoffe (z.B. NO). An den inhibitorischen Synapsen wird deren hemmender Einfluß durch zwei Faktoren vermindert. Zum einen verursacht die langanhaltende Aktivierung der postsynaptischen GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren eine Umkehr des Gleichgewichtspotentials von Cl⁻ und K⁺ in Richtung Depolarisation, zum anderen erfolgt eine Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Autorezeptoren, die eine Verringerung der GABA-Ausschüttung bewirkt. AMPAR, NMDAR: ionotrope Glutamaterezeptoren des AMPA/Kainat bzw. NMDA-Typs; CA1, CA3: Pyramidalzellen der Felder CA1 bzw. CA3 des Ammonshorns; GABA_AR, GABA_BR: GABA-Rezeptor des Typs A (ionotrop) bzw. B (metabotrop); Glu: Glutamat; mGluR: metabotroper Glutamaterezeptor (nach Revest & Longstaff, 1998).

4 Neuronale nikotinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Die neuronalen nikotinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChR) gehören wie die muskulären nAChR der motorischen Endplatte zu der Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Wie aus zahlreichen Studien in heterologen Expressionssystemen wie Oocyten, Fibroblasten oder HEK-Zellen hervorgeht (zusammengefasst und begutachtet von Role & Berg, 1996), besitzen die neuronalen nAChR vermutlich ebenfalls eine pentamere Struktur, wobei sie jedoch aus nur einem (α) oder höchstens zwei verschiedenen Typen von Untereinheiten (α und β) mit der Stöchiometrie $(\alpha)_5$ oder $(\alpha)_2(\beta)_3$ aufgebaut sind (Abb. 10). Im Gegensatz zum muskulären nAChR existieren für beide Typen der neuronalen Untereinheiten mehrere Varianten, die von verschiedenen Genen codiert und als 'Isoformen' bezeichnet werden. So sind z.B. in der Ratte derzeit acht neuronale α -Isoformen ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) und drei neuronale β -Isoformen ($\beta 2$ - $\beta 4$) bekannt. Viele (aber nicht alle) der α - und β -Isoformen können zu funktionellen Rezeptoren koassemblieren, wobei die verschiedenen Kombinationen spezifische kinetische und pharmakologische Eigenschaften aufweisen (siehe Tabelle 1).

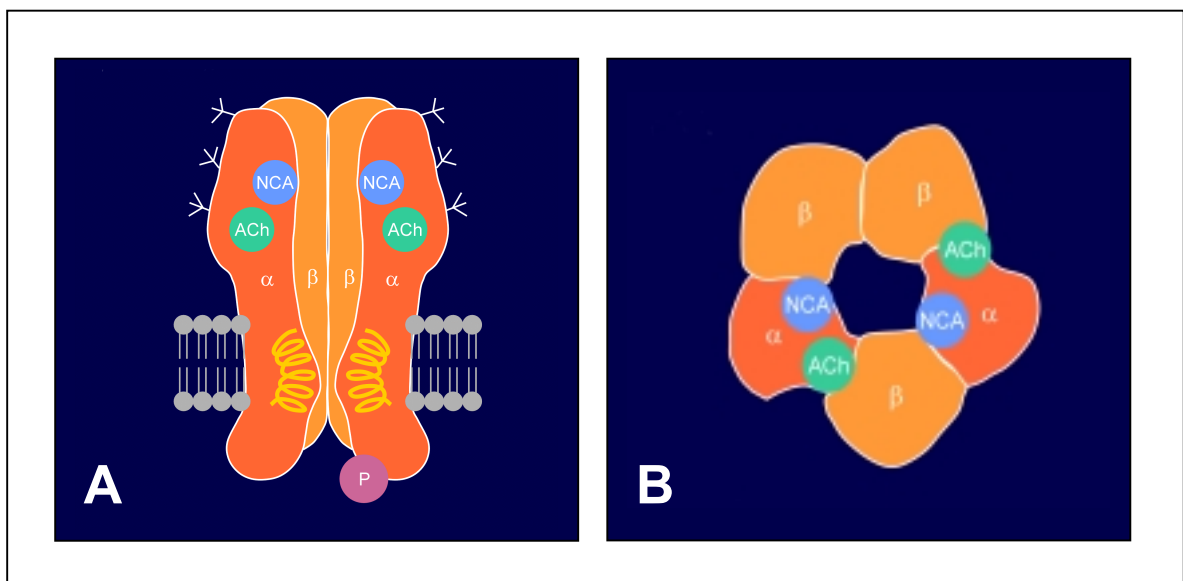


Abb. 10: Modell eines heterooligomeren neuronalen nAChR. A: Seitenansicht. Zu sehen sind die transmembrane Organisation der Untereinheiten in der Lipidmembran, die Bindungsstellen für Acetylcholin (ACh) und nichtkompetitive Agonisten (NCA) sowie eine intrazelluläre Phosphorylierungsdomäne (P). **B: Aufsicht** mit pentagonaler Anordnung aus zwei α - und drei β -Untereinheiten sowie den Bindungsstellen für Acetylcholin und nichtkompetitive Agonisten (nach A. Maelicke).

Anhand von Ligandenbindungs- und histochemischen Studien *in situ* konnte gezeigt werden, daß mRNA und Protein der verschiedenen neuronalen α - und β -Isoformen im Nervensystem unterschiedlich stark und vor allem regionalspezifisch exprimiert werden (Whiting et al.,

1987; Couturier et al., 1990 a, b; Schoepfer et al., 1990; Wada et al., 1989, 1990; Deneris et al., 1991; Dineley-Miller et al., 1992; Seguela et al., 1993; Keyser et al., 1993; Dominguez Del Toro et al., 1994; Eloyghen et al., 1994). Während der $\alpha 4\beta 2$ - und möglicherweise auch der $\alpha 7$ -Rezeptor die am häufigsten auftretenden Subtypen des ZNS sind, ist der $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptor dagegen der vorherrschende ganglionäre nAChR im peripheren Nervensystem.

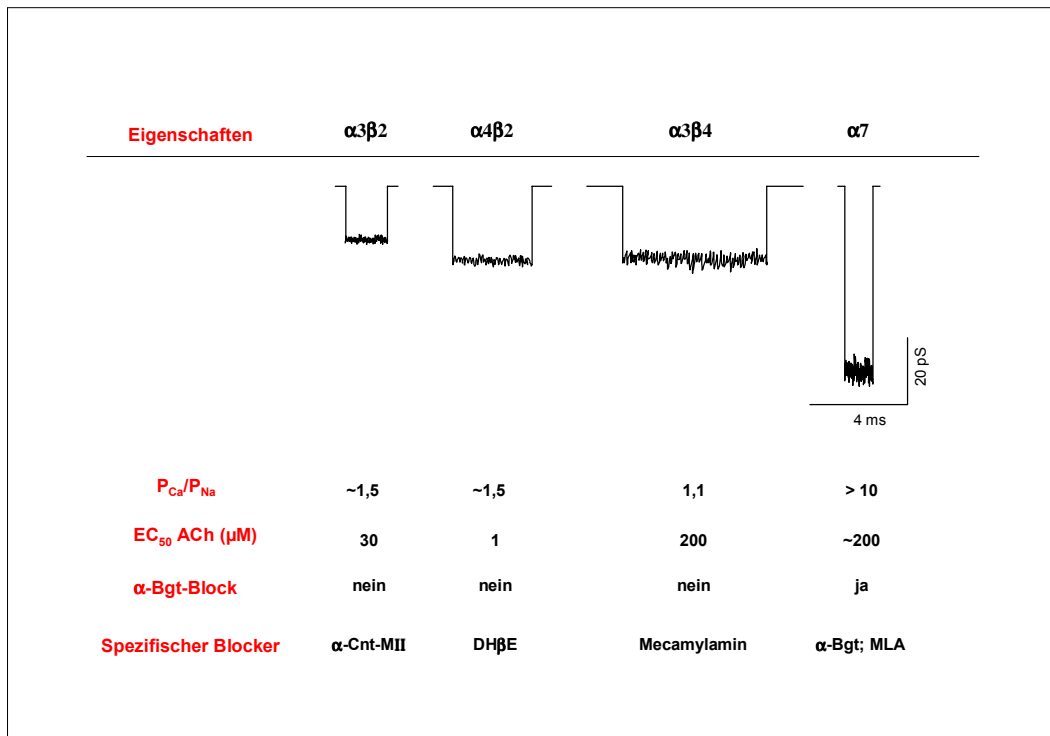


Tabelle 1: Eigenschaften ektopisch exprimierter neuronaler nAChR. Alle aufgeführten Daten stammen aus heterologen Expressionen der nAChR in *Xenopus*-Oocyten. α -Bgt: α -Bungarotoxin; Ach: Acetylcholin; α -Cnt-MII: α -Conotoxin-MII; Dh β E: Dihydro- β -erythroidin; MLA: Methyllycaconitin; P_{Ca}/P_{Na} : Ca^{2+} -Permeabilität gegen Na^{+} -Permeabilität (nach Role & Berg, 1996).

Der $\alpha 7$ -Rezeptor gehört zur evolutionär ältesten Gruppe der nAChR (Le Novère & Changeux., 1995) und weist einige strukturelle, pharmakologische und physiologische Besonderheiten auf, die ihn von den meisten anderen neuronalen nAChR unterscheiden und ihm so eine gewisse Ausnahmestellung eingebracht haben. Wie aus der Bezeichnung schon hervorgeht, setzt er sich aus nur einer Isoform zusammen und stellt somit ein Homopentamer dar. Die Fähigkeit zur Bildung eines funktionellen homopentameren Rezeptors ist ansonsten nur noch für die Untereinheiten $\alpha 8$ und $\alpha 9$ beschrieben worden (Gotti et al., 1994; Elgoyhen et al., 1994). Ein weiteres Charakteristikum des $\alpha 7$ -nAChR ist seine hohe Bindungsaffinität ($K_D = 2nM$) für den muskelrezeptorspezifischen Antagonisten α -Bungarotoxin. Auch $\alpha 8$ - und $\alpha 9$ -Rezeptoren sind in der Lage, α -Bungarotoxin zu binden,

allerdings mit einer wesentlich geringeren Affinität ($K_D = 20\text{nM}$) (Keyser et al., 1993; Eloyghen et al., 1994). Die für die neurobiologische Forschung interessanteste Eigenschaft des $\alpha 7$ -nAChR ist seine hohe Calcium-Permeabilität (Seguela et al., 1993). Der Calcium-Anteil am Gesamtstrom beträgt ungefähr 20% und ist in seiner Höhe mit dem der NMDA-Rezeptoren vergleichbar.

Im Gegensatz zu der Fülle an Daten über die Expressionsmuster und Eigenschaften der einzelnen neuronalen nAChR ist über deren physiologische Funktion im ZNS vergleichsweise wenig bekannt. Vielfach wurde die Hypothese vertreten, dass diese möglicherweise wie die nAChR in den autonomen Ganglien des PNS und an den motorischen Endplatten schnelle exzitatorische Erregungsleitung zwischen den Neuronen des ZNS vermitteln. Doch bisher sind nur wenige Beispiele einer solchen nikotinischen Transmission über postsynaptische nAChR im ZNS dokumentiert (Phelan & Gallagher, 1992; Clarke 1993; Zhang et al., 1993; Frazier et al., 1998 b). Demgegenüber konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass präsynaptisch und/oder präterminal lokalisierte nAChR sowohl die Freisetzung anderer Neurotransmitter wie Glutamat, GABA, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin als auch die von Acetylcholin selbst beeinflussen können (Role & Berg, 1996; Brioni et al., 1997; Lena & Changeux, 1997; Fu et al., 1998; Li et al., 1998; Radcliffe & Dani, 1998; Gioanni et al., 1999; Zhu & Chiappinelli, 1999; Kaiser & Wonnacott, 2000; Reid et al., 2000; López et al., 2001). Aus diesem Grunde vermutet man die entscheidende Funktion der neuronalen nAChR im ZNS in der Modulation und nicht in der Mediation der synaptischen Signalübertragung.

4.1 Neuronale nAChR und Gedächtnis

Die enge Verbindung zwischen neuronalen nAChR und Lern- und Gedächtnisprozessen ist experimentell gut dokumentiert. So konnte in mehreren *in vivo* Studien an Mensch und Tier eine gedächtnisverstärkende Wirkung des nAChR-spezifischen Liganden Nikotin beobachtet werden (Levin, 1992; Arendash et al., 1995; Socci et al., 1995; Felix & Levin, 1997; Radcliffe & Dani, 1998; Gamberino & Gold, 1999). Fernerhin konnte anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen *in vitro* gezeigt werden, dass die Aktivierung von nAChR die LTP-Induktion in verschiedenen Bereichen des Hippocampus erleichtert (Hunter et al., 1994; Sawada et al., 1994; Chen & Chen, 1999). Fujii et al. (2000 a,b) konnten nachweisen, dass die nikotinische Modulation der LTP an CA3-CA1 Synapsen des Hippocampus über eine Verringerung der GABAergen Inhibition erfolgt (vgl. Abb. 9). Sie vermuten dabei zwei unabhängige, über verschiedene nAChR ($\alpha 7$ und nicht- $\alpha 7$) vermittelte Mechanismen. Auch in anderen Bereichen des ZNS konnte eine Modulation der LTP über

nikotinische Rezeptoren beobachtet werden. Im ventralen Tegmentum z.B. wird eine Modulation über präsynaptische $\alpha 7$ -Rezeptoren an glutamatergen Synapsen diskutiert (Mansfelder & McGehee, 2000).

Der spektakulärste Beleg für die Beteiligung neuronaler nAChR an kognitiven Prozessen ergibt sich aus der Pathophysiologie des Morbus Alzheimer. Die Alzheimer'sche Demenz ist mit einer Häufigkeit von mehr als 20 % bei den über 80jährigen die am weitesten verbreitete Form von Demenz in der älteren Bevölkerung (Hoyert & Rosenberg 1997, 1999; Witthaus et al., 1999). Sie ist gekennzeichnet durch fortschreitenden Gedächtnisverlust – insbesondere im Bereich des Kurzzeitgedächtnisses – und Reduktion anderer kognitiver Fähigkeiten, häufig begleitet von Parkinson-ähnlichen Symptomen, Sprachstörungen und emotionaler Instabilität. All diese Symptome sind auf eine dramatische Abnahme der Neuronenzahl in kortikalen und subkortikalen Regionen zurückzuführen (Hof et al., 1990 a, b; West et al., 1994). Dabei scheint der Schwund an cholinergen Neuronen von besonderer Bedeutung zu sein. So konnte z.B. in autoradiographischen und histochemischen Studien an *post mortem* Gehirngewebe (Nordberg & Winblad, 1986; Whitehouse et al., 1986; Schröder et al., 1991; Perry et al., 1995; Wevers et al., 1999) sowie in PET-Imaging-Studien *in vivo* (Nordberg et al., 1995) gezeigt werden, dass der selektive Schwund an nAChR der biochemische Parameter ist, der am engsten mit der Schwere der Krankheit assoziiert ist. Weitere Indizien für eine kritische Rolle nikotinischer Rezeptoren bei der Alzheimer'schen Demenz stammen zum einen aus Untersuchungen über die (positiven) Auswirkungen chronischer Nikotin-Exposition durch Rauchen auf Beginn und Verlauf der Krankheit (van Dujin & Hofman, 1991); zum anderen konnten Kihara et al. (1997, 1998) *in vitro* nachweisen, dass die Stimulation von nAChR (vermutlich $\alpha 7$ und $\alpha 4\beta 2$) die β -Amyloid-Toxizität hemmt, welche in erheblichem Maße für den starken Verlust an Neuronen verantwortlich ist.

Die Bedeutung der nAChR spiegelt sich auch in der Therapie der Alzheimer'schen Demenz wider. Alle bis heute zugelassenen Medikamente – Tacrin (Qizilbash et al., 2000), E2020 (Donepezil) (Birks & Melzer, 2000) und Galanthamin (Fulton & Benfield, 1996) – sind nicht-kovalente Hemmer der Acetylcholinesterase. Das Pflanzenalkaloid Galanthamin besitzt darüberhinaus noch eine weitere interessante Eigenschaft: Es wirkt – analog zu den Benzodiazepinen an $GABA_A$ -Rezeptoren – als ‚allosterisch potenzierender Ligand‘ (*allosterically potentiating ligand*, APL) an nAChR (Pereira et al., 1993; Schrattenholz et al., 1996). Diese Entdeckung führte dazu, dass allosterische Modulation von nikotinischen Rezeptoren als neues Therapiekonzept für die Alzheimer'sche Demenz diskutiert wird (Maelicke & Albuquerque, 2000; Maelicke et al., 2001).

4.2 Neuronale nAChR im Hippocampus

Aufgrund der Tatsache, dass der Hippocampus als Gehirnregion einerseits und das nikotinsche System andererseits eine bedeutende Rolle bei kognitiven Prozessen spielen, ist die Charakterisierung der nAChR im Hippocampus in den Focus der neurobiologischen Forschung gelangt. Die bis heute vorliegenden Daten wurden aus zahlreichen histochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen an Gewebeschnitten (*in situ*) und Kulturzellen (*in vitro*) erhalten.

In situ konnten Transkripte der nAChR-Untereinheiten $\alpha 2-4$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ detektiert werden, wobei $\alpha 7$ und $\beta 2$ besonders stark exprimiert sind (Wada et al., 1989; Seguela et al., 1993; Breeze et al., 1997). Während die $\beta 2$ -Untereinheit relativ gleichmäßig über alle Zellschichten verteilt ist, ergaben genauere Untersuchungen zur Lokalisation der $\alpha 7$ -Untereinheit, dass diese zum größten Teil in den GABAergen Interneuronen der zellarmen Schichten vorkommt (Freedman et al., 1993; Frazier et al., 1998 a; Hunzinger 1998). Nur wenige Transkripte findet man dagegen in den Pyramidalzellen des Ammonshorns (*ibid.*). Diese histochemischen Befunde stehen in Einklang mit elektrophysiologischen Experimenten an Gewebeschnitten, in denen die für $\alpha 7$ -nAChR typischen Ströme (schnell densibilisierend; blockierbar durch α -Bungarotoxin und Methyllycaconitin) mit Ausnahme einzelner Pyramidalzellen nur in Interneuronen gemessen werden konnten (Jones & Yakel, 1997; Frazier et al., 1998 a, b; McQuiston & Madison, 1999). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die nikotinischen Ströme der Interneuronen durch direkte Aktivierung postsynaptischer $\alpha 7$ -nAChR hervorgerufen werden (*ibid.*). Die Interneuronen des Hippocampus sind somit die ersten Zellen des ZNS, für die funktionelle cholinerge Synapsen mit postsynaptischen $\alpha 7$ -nAChR nachgewiesen werden konnten. Über diese postsynaptischen nikotinischen Rezeptoren können Interneuronen selektiv erregt und schließlich nachgeschaltete Pyramidalzellen sowohl positiv als auch negativ moduliert werden (Ji & Dani, 2000). Hinweise auf postsynaptische nikotinische Rezeptoren anderer Zusammensetzung (z.B. $\alpha 4\beta 2$) sind bisher äußerst spärlich. So konnten in Interneuronen und Pyramidalzellen postsynaptische nikotinische Ströme gemessen werden, die nicht über Rezeptoren des $\alpha 7$ -Typs vermittelt werden, eine Zuordnung zu bisher bekannten funktionellen Rezeptoren (siehe Tabelle 1) erfolgte aber nicht (Albuquerque et al., 1997; McQuiston & Madison, 1999; Ji & Dani, 2000).

Auch im Hippocampus sind präsynaptisch lokalisierte nAChR an der Modulation anderer Neurotransmittersysteme beteiligt. Gray et al. (1996) konnten zeigen, dass die Aktivierung präsynaptischer $\alpha 7$ -Rezeptoren eine Verstärkung der exzitatorischen glutamatergen Transmission in Pyramidalzellen der CA3-Region hervorruft. Die nikotinische Modulation GABAerger Interneuronen der CA1-Region kann sowohl über den oben erwähnten

postsynaptischen Mechanismus als auch über präterminale $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren erfolgen (Alkondon et al., 1997, 1999).

Expressionsmuster und Funktionalität nikotinischer Rezeptoren in hippocampalen Primärkulturzellen sind ebenfalls gut dokumentiert. Alkondon et al. (1994) konnten in hippocampalen Kulturen mRNA-Transkripte der Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ detektieren. Aus autoradiographischen und histochemischen Studien geht hervor, dass zwischen 65 und 85 % der Zellen das $\alpha 7$ -Protein exprimieren (Barrantes et al. 1995; Samuel et al., 1997), wobei es oft in präsynaptischen Bereichen konzentriert ist (Zarei et al., 1999). Die $\beta 2$ -Untereinheit ist uniform verteilt in nahezu allen Zellen zu finden (ibid). Die $\alpha 4$ Untereinheit konnte dagegen auf Proteinebene nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen werden (Barrantes et al., 1995).

Im Unterschied zu den Verhältnissen *in situ* scheinen hippocampale Zellen in Kultur unabhängig von ihrer Morphologie mehrere verschiedene postsynaptische nAChR zu besitzen. In elektrophysiologischen Studien mit hippocampalen Primärkulturzellen konnten Albuquerque und seine Mitarbeiter drei kinetisch und pharmakologisch unterschiedliche nikotinsche Ströme messen und spezifischen nAChR zuordnen (Alkondon & Albuquerque 1993, 1995; Ishihara et al., 1995; Albuquerque et al., 1997): Der bei weitem größte Teil der Zellen zeigte schnell desensibilisierende und durch α -Bungarotoxin und Methyllycaconitin blockierbare Ströme des Typs IA. Von etwa 5- 10 % der Zellen konnten langsam desensibilisierende Ströme des Typs II aufgenommen werden, die durch Dihydro- β -erythroidin blockiert werden konnten. Nikotinsche Ströme des Typs III – ebenfalls langsam desensibilisierend und blockierbar durch Mecamylamin – konnten nur selten (in ca. 2 % der Zellen) gemessen werden. Vergleiche mit den Eigenschaften ektopisch exprimierter nAChR (siehe Tabelle 1) veranlassten Albuquerque zu der Schlussfolgerung, dass Ströme des Typs IA über $\alpha 7$ -nAChR, Ströme des Typs II über $\alpha 4\beta 2$ -nAChR und Ströme des Typs III über $\alpha 3\beta 4$ -nAChR vermittelt werden.

Exzitatorische (glutamaterge) und inhibitorische (GABAerge) Transmission können auch *in vitro* über präsynaptische nAChR moduliert werden. Dabei scheint die Modulation – in Übereinstimmung mit den histochemischen Daten (s.o.) – im wesentlichen über präsynaptische $\alpha 7$ -nAChR und damit über eine direkte Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in der präsynaptischen Endigung zu erfolgen (Radcliffe & Dani, 1998; Radcliffe et al., 1999).

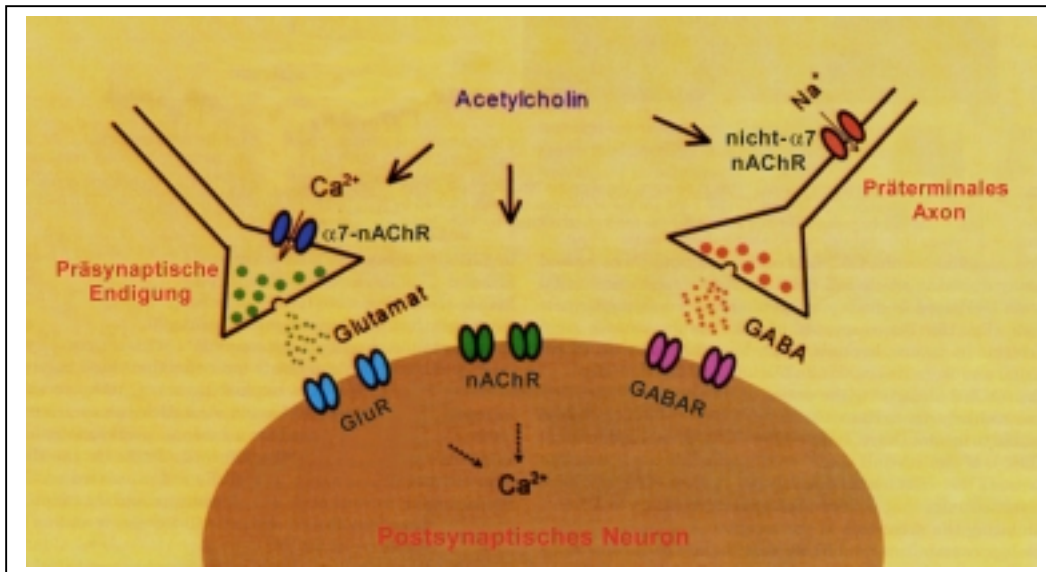


Abb. 11: Modell für die nikotinische Modulation der exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmission in hippocampalen Neuronen. Die nAChR-vermittelte Modulation der hippocampalen Neurotransmission kann präterminal, prä- und postsynaptisch erfolgen. Während die präsynaptische Modulation der exzitatorischen glutamatergen Transmission über $\alpha 7$ -nAChR vermittelt wird, sind an der präterminalen Modulation der inhibitorischen GABAergen Transmission nicht- $\alpha 7$ -nAChR (im wesentlichen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR) beteiligt. Postsynaptisch sind sowohl $\alpha 7$ - als auch nicht- $\alpha 7$ -nAChR (z.B. des $\alpha 4\beta 2$ - oder $\alpha 3\beta 4$ -Typs) zu finden. GABAR: GABA-Rezeptoren; GluR: Glutamat-Rezeptoren (nach Albuquerque et al., 1997)

Zusammenfassend (Abb. 11) kann festgehalten werden, dass das cholinerge System sowohl über postsynaptische als auch präsynaptische bzw. präterminale nAChR entscheidend an der Modulation der exzitatorischen und inhibitorischen Transmission im Hippocampus und somit an der Regulation seines Schaltkreises beteiligt ist.

5 Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenflüssigkeits-Chromatographie dar und ist im Verlaufe der letzten Jahrzehnte zur dominierenden analytischen Trennmethode in der pharmazeutischen und chemischen Industrie sowie in der Umweltanalytik geworden. Abb. 12 zeigt den schematischen Aufbau eines modernen HPLC-Systems.

Das Herzstück eines jeden HPLC-Systems ist die Trennsäule. Hier erfolgt der wesentliche Schritt, die Auftrennung eines Substanzgemisches in seine einzelnen Komponenten. Die Säule besteht aus einem Rohr, das an beiden Enden mit porösen Fritten oder Sieben durch entsprechende Anschlüsse verschlossen ist. Die Säulenpackung (Säulenbett) besteht aus einem dichten Verband von porösen Teilchen (= stationäre Phase). Das Fließmittel (= mobile

Phase) strömt durch das Volumen zwischen den Teilchen (Zwischenvolumen) und befindet sich darüberhinaus in den Hohlräumen der porösen Partikel. Substanzen, die nicht in die Partikelporen eindringen können, werden mit dem Volumen V_0 , dem Zwischenvolumen der Säule, eluiert. Substanzen, die das gesamte Volumen (Zwischen- und Porenvolumen) durchdringen und nicht zurückgehalten werden, werden mit V_m eluiert. Substanzen, die zurückgehalten werden, werden mit $V_R > V_m$ eluiert. Die Trennung zweier Substanzen erfolgt nun dadurch, dass sie unterschiedlich lange in der stationären Phase der Säule verweilen. Die Verweilzeit in der mobilen Phase ist dagegen für alle Substanzen gleich. Die Retention von Substanzen wird durch die Wahl der stationären Phase und des Fließmittels (mobile Phase) bestimmt. Stationäre und mobile Phase bilden das sog. Phasensystem. In der Säulenflüssigkeits-Chromatographie unterscheidet man je nach der Zusammensetzung verschiedene Phasensysteme und somit verschiedene Methoden, nach denen eine Trennung durchgeführt werden kann (siehe Tabelle 2).

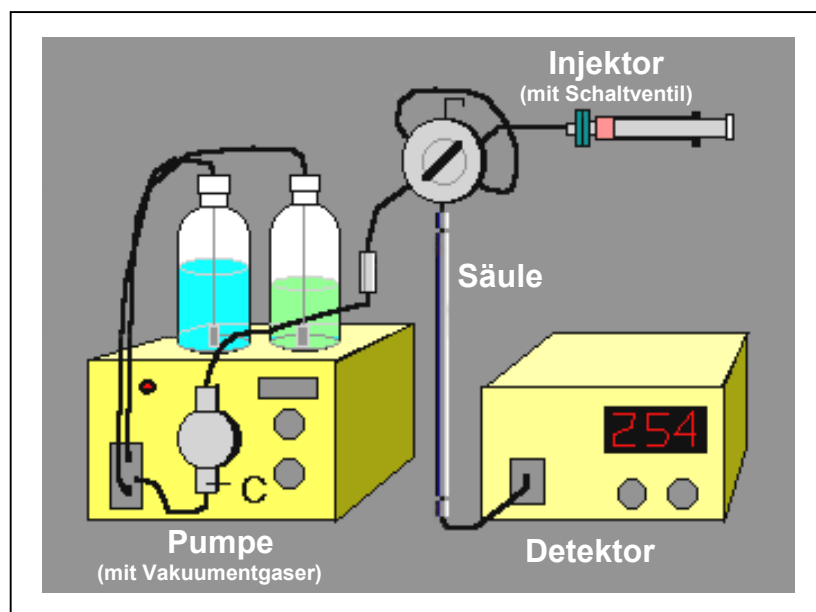


Abb. 12: Komponenten eines HPLC-Systems. Die aufzutrennende Probe wird über den Injektor auf die Säule (stationäre Phase) gebracht. Die mobile Phase wird nach vollständiger Entgasung mit Hilfe einer leistungsstarken Pumpe unter hohem Druck durch das System befördert. Die in der Säule aufgetrennten Komponenten werden daraufhin sukzessive eluiert und schließlich im Detektor nachgewiesen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Detektion der aufgetrennten Substanzen. Auch sie kann auf mehreren Wegen erfolgen. So unterscheidet man elektrochemische, UV-, Fluoreszenz- und Massenspektrometrische Detektion. Die heutzutage am weitesten verbreitete und vor allem empfindlichste Methode ist die Fluoreszenzdetektion. Da die wenigsten Substanzen eine genügend hohe Eigenfluoreszenz besitzen, müssen sie vor der Detektion derivatisiert, d.h. an eine fluoreszierende Verbindung gekoppelt werden. In den letzten Jahren hat die

Massenspektrometrie als Detektionsmethode in der HPLC, insbesondere in der Aminosäure-Analytik, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der grosse Vorteil dieser Detektionsmethode liegt darin, dass prinzipiell jede Substanz eines aufgetrennten Gemisches anhand seiner spezifischen Masse bzw. des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z) identifiziert werden kann. Auf diesem Wege können Überlagerungseffekte umgangen und im Unterschied zu den übrigen Detektionsmethoden auch Substanzen nachgewiesen werden, deren Retentionszeit vorher nicht durch Testläufe mit Standards bestimmt wurde.

| 5.1.1.1 Stationäre Phase | Mobile Phase | Art der Chromatographie |
|---|---|--|
| Adsorbens wie Kieselgel, Aluminiumoxid, Dextrangel | Organische Lösemittelgemische | Adsorptions-Chromatographie |
| Silanisiertes Kieselgel (Reversed-Phase-Material) | Gemische aus organischen Lösemitteln und Wasser bzw. Puffer | Reversed Phase Adsorptions-Chromatographie |
| Flüssige stationäre Phase (hydrophil bzw. lipophil) | Organische Lösemittelgemische | Verteilungs-Chromatographie |
| Ionenaustauscher | Pufferlösung | Ionenaustausch-Chromatographie |
| Affinitätsträger mit spezifischen Liganden | Pufferlösung | Affinitäts-Chromatographie |

Tabelle 2: Verschiedene Formen der Säulenflüssigkeits-Chromatographie (nach K.K. Unger, 1989).

Weitere Bestandteile eines HPLC-Systems sind der Probeninjektor sowie die Pumpe, welche das Flußmittel mit hohem Druck durch das System befördert und somit die im Vergleich zur klassischen Flüssigkeits-Chromatographie extrem hohe Trennleistung ermöglicht.

5.2 Neurotransmitteranalyse mit HPLC

Seit Mitte der 80er Jahre wird die HPLC zur Analyse von Neurotransmittern aus biologischen Proben verwendet. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, wird dabei zum größten Teil Reversed-Phase-HPLC (RP-HPLC) eingesetzt. Das Phasensystem der RP-HPLC besteht aus einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase (s.o.). Als stationäre Phasen werden in der Regel poröse Kieselgele verwendet, an deren Oberfläche Alkylgruppen mit unterschiedlichen Kettenlängen chemisch gebunden sind. Die am häufigsten eingesetzten RP-Phasen sind Trägermaterialien mit n-Octyl- (C_8 -Typen) oder n-Octadecylgruppen (C_{18} -Typen). Als mobile Phasen werden Wasser/Methanol-, Wasser/Acetonitril- oder

Wasser/Dioxan-Systeme eingesetzt. An einem RP-Kieselgel werden die Substanzen mit zunehmendem hydrophoben Charakter zurückgehalten. Bei Verbindungen mit funktionellen Gruppen läßt sich im allgemeinen folgende Retentionsreihenfolge für Moleküle vergleichbarer Größe beobachten:

Säuren < Amine/Alkohole/Phenole/Ester < Ether/Aldehyde/Ketone < Aromaten < Aliphaten.

| Neurotransmitter (-klasse) | Derivatisierung | Art der Chromatographie | Detektion | Referenz |
|--|-------------------|-------------------------|-----------------|--|
| Catecholamine (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin) | -- | Reversed Phase | Elektrochemisch | Middlemiss & Hutson (1990); Hu et al. (1999) |
| | DPE | Reversed Phase | Fluoreszenz | Nohta et al. (1997); Alberts et al. (1999) |
| | Benzylamin | Reversed Phase | Fluoreszenz | Nohta et al. (1997) |
| Serotonin | DPE | Reversed Phase | Fluoreszenz | Kai et al. (1998) |
| | Benzylamin | Reversed Phase | Fluoreszenz | Ishida et al. (1998) |
| Aminosäuren (Glutamat, GABA) | OPA | Reversed Phase | Fluoreszenz | Verhage et al. (1991); Kamisaki et al. (1996); Bianchi et al. (1999) |
| | | | Elektrochemisch | Rowley et al. (1995) |
| | PITC | Reversed Phase | Absorption | Davey & Ersser (1990) |
| | DABSYL-Cl | Reversed Phase | Absorption | Marquez et al. (1986) Herrero et al. (1998) |
| | AQC | Reversed Phase | Fluoreszenz | Liu et al. (1998) |
| ATP | Chloroacetaldehyd | Reversed Phase | Fluoreszenz | Todorov et al. (1996) |
| Acetylcholin | -- | Ionenaustausch | Elektrochemisch | Klapproth et al. (1997) |
| | -- | Affinität | Elektrochemisch | Takei et al. (1990) |

Tabelle 3: Neurotransmitteranalyse mit HPLC. AQC: 6-Aminochinolyln-N-hydroxy-succinimidylcarbamate; DABSYL-Cl: Dimethylaminoazobenzol-sulfonylchlorid; DPE: 1,2-Diphenylethylendiemin; OPA: ortho-Phthaldialdehyd; PITC: Phenylisothiocyanat.

Veränderungen der Retentionszeiten können sowohl über die stationäre als auch die mobile Phase erreicht werden. Dabei steigt die Retentionszeit mit zunehmender n-Alkylkettenlänge der stationären Phase und zunehmendem Wassergehalt der mobilen Phase. Wie aus Tabelle 3 weiterhin ersichtlich, wird bei der Neurotransmitteranalyse zur Detektion überwiegend die Fluoreszenzmethode eingesetzt. Ungeachtet dessen wird für alle aufgeführten Detektionsarten eine Nachweisgrenze im fmol-Bereich beschrieben.

6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit gedächtnisrelevante Prozesse wie die Aktivierung nikotinischer Rezeptoren oder die Glutamat-vermittelte Langzeitpotenzierung die exzitatorische (glutamaterge) und inhibitorische (GABAerge) Neurotransmission im Hippocampus beeinflussen. Die dazu bis heute vorliegenden Erkenntnisse wurden im wesentlichen durch elektrophysiologische und Ca^{2+} -Imaging-Experimente gewonnen und beschreiben somit nur Veränderungen von Ionenströmen auf dem Niveau von einzelnen Zellen bzw. Zellgruppen. Im Gegensatz dazu sollten die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit Aufschluss über Veränderungen bezüglich der Freisetzung von Glutamat und GABA auf dem Vielzellniveau geben.

Im ersten Schritt musste daher ein Testsystem etabliert werden, mit dem es möglich ist, Neurotransmitterfreisetzung aus neuronalem Gewebe sowohl qualitativ als auch quantitativ zu erfassen. Als Analysemethode sollte die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit anschließender Fluoreszenzdetektion eingesetzt werden. Bevor Neurotransmitterfreisetzungsstudien durchgeführt werden konnten, mussten die Parameter für Trennung und Detektion der nachzuweisenden Neurotransmitter Glutamat und GABA optimiert werden. Im Anschluß daran sollte die Anwendbarkeit der HPLC-Methode durch Depolarisationsexperimente mit zwei verschiedenen hippocampalen Präparationen – Synaptosomen und Primärkulturzellen – überprüft werden. In diesem Schritt sollte zugleich untersucht werden, welche der Präparationen am besten für die nachfolgenden Experimente geeignet ist.

Nach dieser ersten Etablierungsphase sollten Stimulationen mit dem unspezifischen nAChR-Agonisten Nikotin und dem nicht-kompetitiven Coagonisten und Alzheimer-Medikament Galanthamin durchgeführt werden. Dabei sollte zunächst der Fragestellung nachgegangen werden, ob und inwieweit die auf elektrophysiologischer Ebene nachgewiesenen Effekte von Nikotin auf die glutamaterge und GABAerge Neurotransmission auch in diesem System zu beobachten sind. Darüberhinaus sollte der modulatorische Effekt von Galanthamin untersucht werden, dessen potenzierende Wirkung an nAChR bisher ebenfalls nur anhand von Messungen nikotinischer Ströme gezeigt werden konnte. Da im Zusammenhang mit der nikotinischen Modulation anderer Neurotransmittersysteme der $\alpha 7$ -nAChR aufgrund seiner hohen Ca^{2+} -Permeabilität eine besondere Rolle einnimmt, sollte untersucht werden, in welchem Maße die modulatorischen Effekte von Nikotin und Galanthamin auf die hippocampale Glutamat- und GABA-Freisetzung auf Rezeptoren dieses Typs zurückzuführen sind. Dazu sollten Stimulationen in Anwesenheit des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin durchgeführt werden.

Unter Verwendung des gleichen Testsystems sollten im zweiten Teil der Arbeit die Auswirkungen einer chemisch induzierten Langzeitpotenzierung auf die GABA-Freisetzung in hippocampalen Primärkulturzellen untersucht werden. Zusätzlich zur Fluoreszenzdetektion sollte dabei eine alternative Detektionsform, die Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI), angewendet werden. Um eine Aussage darüber machen zu können, inwieweit der beobachtete Effekt von bestimmten Glutamatrezeptortypen abhängig ist, sollten darüberhinaus Stimulationen in Anwesenheit spezifischer Antagonisten für die einzelnen Glutamatrezeptoren durchgeführt werden.

Material und Methoden

1 Allgemeine Chemikalien

Soweit nicht gesondert vermerkt, waren alle Chemikalien und Substanzen, einschließlich anorganischer Salze, Säuren, Basen und organischer Lösungsmittel von p.a. Qualität und wurden von den Firmen Merck, Sigma, Fluka, Serva und Roth bezogen. Es wurde grundsätzlich Millipore-Wasser (18 M Ω) verwendet.

2 Präparation hippocampaler Synaptosomen

Sucrose Lösung (SL): in mM: 320 Sucrose, 100 EDTA und 20 Tris/HCl; pH 7,5

Artifizielle CSF I: in mM: 125 NaCl, 3,1 KCl, 0,4 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 1,5 MgSO₄, 20 NaTES und 10 D-Glucose; pH 7,4

Als Grundlage für die im Folgenden beschriebene Präparation diente eine Vorschrift von Kamisaki et al. (1996) für die Gewinnung von corticalen Rattenhirn-Synaptosomen. Die hier verwendeten Hippocampi wurden 21-25 Tage alten weiblichen Ratten des Inzuchtstammes *Sprague Dawley* entnommen.

2.1 Gewebepräparation

Die Tiere wurden zunächst mit CO₂ betäubt und daraufhin durch Genickbruch getötet und dekapitiert. Nachdem die Kopfhaut mit einem Medianschnitt aufgetrennt und zur Seite weggeklappt worden war, konnte die Schädeldecke mit einem medianen und zwei seitlichen longitudinalen Schnitten eröffnet und anschließend mit einer Pinzette entfernt werden. Mit einer feinen Schere wurden vorsichtig die Hirnnerven an der Schädelbasis durchtrennt und das Gehirn mit einer stumpfen Pinzette in eiskalte SL überführt. Sodann wurden die *Bulbi olfactorii* sowie das Cerebellum abgetrennt und das verbleibende Dien- und Telencephalon longitudinal in zwei symmetrische, laterale Hälften geteilt. Nach Entfernung der Basalganglien konnte der freigelegte Hippocampus mit zwei feinen Pinzetten isoliert werden. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verarbeitung in eiskalter SL gelagert.

2.2 Gewinnung der synaptosomalen Fraktion

Die isolierten Hippocampi wurden mit einer Schere zerkleinert, in einen Homogenisator überführt und in 5 ml eiskalter SL mit 12 Schlägen homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Homogenisator mit 7,5 ml SL ausgespült. Im darauf folgenden Zentrifugationsschritt (3000 rpm, 10 min bei 4 °C; SS 34 Sorvall) erfolgte die Sedimentierung von Zellfragmenten, Kernen, Blutgefäßen u.ä.. Der Überstand S1 (inkl. Membranvesikel und -fragmente) wurde abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde noch einmal in 5 ml SL resuspendiert und im Homogenisator mit 3 Schlägen homogenisiert. Nachdem die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Homogenisator mit 2,5 ml SL ausgespült worden war, wurde erneut mit 3000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nun verworfen, während der Überstand (S2) mit S1 vereinigt und ein weiteres Mal wie oben beschrieben zentrifugiert wurde.

Der so gewonnene Überstand (S3) wurde daraufhin einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (10.000 rpm, 20 min bei 4 °C), wodurch die Pelletierung der Membranvesikel und -fragmente erreicht wurde. Der Überstand wurde verworfen und der hellere Teil des Pellets, welcher die nicht myelinisierten Membranen – die Synaptosomen – enthielt und als Ring um den dunkleren Teil herumlag, wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt, in 10 ml SL resuspendiert und mit 3 Schlägen homogenisiert (der dunklere Teil des Pellets wurde verworfen). Dieser Isolationschritt - Zentrifugation mit 10.000 rpm, Absaugen des helleren Teils des Pellets – wurde noch einmal wiederholt und die synaptosomale Fraktion darauf erneut in 5 ml SL resuspendiert und mit einem Schlag homogenisiert.

Im letzten Abschnitt erfolgte die Äquibrierung der Synaptosomen in artifizieller CSF I: Zunächst wurde der Suspension 5 x 1ml (alle 2-3 min) eiskalte CSF I unter leichtem Schwenken des Homogenisators zugegeben. Daraufhin wurden die Synaptosomen durch Zentrifugation mit 10.000 rpm für 15 min bei 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml artifizieller CSF I resuspendiert. Die auf diese Weise gewonnene synaptosomale Fraktion war nun gebrauchsfertig.

Bevor die nachfolgenden Experimente durchgeführt wurden, erfolgte eine Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA-Testes der Firma Pierce (siehe Abschnitt 4). Die Präparation von 12 Hippocampi ergab eine Konzentration von 0,4 - 0,5 mg Protein/ml Synaptosomen-Suspension.

3 Primärkultur hippocampaler Zellen

HibA-Medium: 98,25 % Hibernata, 1 % B27 supplement, 0,25 % 200 mM L-Gln Lösung, 0,5 % 100x Penicillin-Streptomycin Lösung (jeweils v/v); alles von Gibco

NeurobasalA-Medium: 98,25 % NeurobasalA, 1 % B27 Supplement, 0,25 % 200 mM L-Gln Lösung, 0,5 % 100x Penicillin-Streptomycin Lösung (jeweils v/v); alles von Gibco

Die hier beschriebene Methode ist eine Modifikation der Vorschrift von Brewer et al. 1993. Für die Herstellung der Primärkultur wurden Hippocampi 1-3 Tage alter weiblicher Ratten des Inzuchtstammes *Sprague Dawley* verwendet. Die gesamte Präparation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.1 Gewebepreparation

Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitieren. Von der Schnittstelle aus (Spinalöffnung) wurde der Schädel mit zwei seitlichen Schnitten bis zu den Ohren und einem medianen Schnitt fast bis zur Nase eröffnet. Danach wurden Kopfhaut und Schädeldecke zur Seite weggeklappt, das Gehirn vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette von der Schädelbasis abgehoben und in eiskaltes HibA-Medium überführt. Die Isolation der Hippocampi erfolgte wie unter 2.1 beschrieben. Schließlich wurden Hirnhaut sowie größere Blutgefäße entfernt und die Hippocampi transversal zu ihrer Längsachse in ca. 0,5 mm dicke Stücke/Scheiben geschnitten.

3.2 Enzymverdau und Vereinzelung

Die Gewebestücke von maximal 4 Hippocampi wurden mit einem feinen Pinsel in 2 ml Papain enthaltendes (20 U/mL, Sigma) HibA-Medium überführt und für 20–30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette (\varnothing ca. 1mm) in 1,5 ml frisches HibA-Medium überführt und durch vorsichtiges Auf- und Abziehen (ca. 5-7 Zyklen) in Suspension gebracht. Nach 5–10 min wurden Gewebestücke, die sich am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, in frischem HibA-Medium (1,5 ml) vollständig vereinzelt.

Alle so erhaltenen Zellsuspensionen (2 x 1,5 ml pro 4 Hippocampi) wurden auf zwei Gefäße verteilt und für 6 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Resuspendieren und

Waschen in HibA-Medium wurden die Zellpellets in je 2 ml NeurobasalA-Medium resuspendiert und schließlich in einem Gefäß vereinigt (\Rightarrow 4 ml Zellsuspension).

3.3 Ermittlung der Zellzahl und Ausplattierung

30 μ l der Suspension wurden 1:1 mit Trypanblau Lösung verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Nach dem Auszählen der vier Quadranten wurde die Gesamtzellzahl (N_T) nach folgender Formel ermittelt:

$$N_T = \frac{x_n}{n \cdot F_Q \cdot h} \cdot D_T \cdot V_S$$

Hierbei ist x_n die Summe der gezählten Zellen in den Quadranten, n die Anzahl der Quadranten, F_Q die Fläche eines Quadranten, h die Kammerhöhe, D_T der Verdünnungsfaktor durch Trypanblau und V_S das Volumen der Zellsuspension. Vereinfacht ergibt sich:

$$N_T = x_n \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ Zellen/ml Suspension}$$

Üblicherweise erhielt man ca. 5.000.000 Zellen aus 12 Hippocampi. Um eine Zellzahl von \sim 400.000/ml zu erhalten, wurde die Suspension mit NeurobasalA-Medium auf 12 ml aufgefüllt.

Vor der Ausplattierung der Zellen auf 24-Well Platten (Greiner) wurden die Wells mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dazu wurden 0.5 ml PLL (MW 70 – 150 kDa, Sigma) Lösung (50 μ g/ml in Wasser) in jedes Well pipettiert. Nach ca. 1 h Inkubation wurde die Lösung entfernt und jedes Well zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Platte(n) zum Trocknen unter der Sterilbank offen stehen gelassen.

Die 12 ml Zellsuspension wurden auf 24 Wells verteilt, d.h. pro Well ($d = 19$ mm) wurden \sim 200.000 Zellen ($\sim 100.000/\text{cm}^2$) ausgesät. Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 . Nach 12 – 24 h wurden die Überstände in den Wells vollständig abgesaugt und durch frisches NeurobasalA-Medium (0,6 ml pro Well) ersetzt. Danach erfolgte alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel, indem ca. 50 % des alten Mediums abgesaugt und 0,3 – 0,4 ml frisches Medium hinzugegeben wurden.

Nach zwei Wochen in Kultur wurden die Zellen für die unten beschriebenen Experimente verwendet.

4 Proteinbestimmung mit BCA-Assay

Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten mit Hilfe der BCA-(bicinhonic acid)-Methode, Fa. Pierce, Oud Beijerland (Niederlande). Das Prinzip der Methode ist die photometrische Konzentrationsbestimmung eines blauen Cu^{2+} -BCA-Komplexes.

4.1 Vorbereitende Maßnahmen

PBS: in mM: 140 NaCl, 2,7 KCl, 6,5 Na_2HPO_4 , 1,2 KH_2PO_4 ; pH 7.4

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Synaptosomen-Suspension waren keine besonderen Vorkehrungen zu treffen. Es wurden lediglich 1:5 und 1:10 Verdünnungen der in Abschnitt 2.2 gewonnenen Suspension (in artifizierlicher CSF I) hergestellt.

Um den Proteingehalt der hippocampalen Primärkulturzellen ermitteln zu können, mussten diese zunächst von den Böden der Well-Platten abgelöst werden. Dazu wurden die Zellen für 3 h bei RT mit PBS + 0,05 % (w/v) EDTA inkubiert (1,2 ml pro Well). Während dieser Zeit wurde die Lösung mehrmals mit einer Pipette heftig auf- und abgezogen. Anschließend wurde pro Well 1 ml Überstand abgenommen und nach mehrmaligem Spülen der Wells unter dem Mikroskop geprüft, ob alle Zellen abgelöst worden waren. Daraufhin wurden die im Überstand befindlichen Zellen durch Ultraschall lysiert (2 x 1 min). Von dieser Suspension wurden wie oben beschrieben entsprechende Verdünnungen in PBS hergestellt und für die Proteinbestimmung verwendet.

4.2 Durchführung

Als erstes wurden je 10 μl der acht BSA-Eichlösungen (20, 40, 80, 160, 320, 640, 853, 1280 $\mu\text{g/ml}$), der reinen Puffer für die Leerwerte sowie der Probenlösungen (unverdünnt, 1:5, 1:10) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Im nächsten Schritt wurde ein Teil der Stammlösung A mit 50 Teilen Stammlösung B des BCA-Kits zur Proteinbestimmung gemischt und 190 μl pro Well in die Mikrotiterplatte gegeben. Die so hergestellten Proben wurden leicht geschüttelt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen der Proben im Photometer bei 562 nm gemessen. Die Berechnung der entsprechenden Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Computer-Programmes Microsoft Excel.

5 Experimente mit hippocampalen Synaptosomen

5.1 Extraktion von intrasynaptosomalem Glutamat und GABA

Die gemäß der Vorschrift aus Kapitel 2.2 hergestellte Synaptosomen-Suspension wurde zunächst in Aliquots mit 0,5 mg Protein aufgeteilt. Die Lyse der Synaptosomen erfolgte durch Ultraschall (2 x 30 s auf Eis) unter Argon-Atmosphäre. Anschließend wurden die lysierten Synaptosomen durch Zentrifugation mit 13.000 rpm für 3 min bei 4°C pelletiert und die Überstände S1 in frische Gefäße überführt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurden die Überstände S2 bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

5.2 Stimulation mit K⁺ (Depolarisation)

Artifizielle CSF II: *in mM: 125 NaCl, 3,1 KCl, 0,4 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 1,5 MgSO₄, 1,5 CaCl₂, 20 NaTES und 10 D-Glucose; pH 7,4*

Wie in 5.1 erfolgte zunächst eine Aliquotierung der Synaptosomen-Suspension. Je nach Ausbeute enthielten die Aliquots zwischen 100 und 150 µg synaptosomales Protein. Im nächsten Schritt wurden die Synaptosomen durch Zentrifugation (13.000 rpm, 3 min, 4°C) pelletiert, nach Entfernung des Überstandes in 125 µl in artifizieller CSF II resuspendiert und für 15 min bei 37 °C im Heizblock (schüttelnd) äquilibriert.

Anschließend erfolgte die Depolarisation der Synaptosomen bei 37°C für 3 min, und zwar durch Zugabe einer CSFII-Menge von 125 µl, der 117mM KCl zugesetzt waren (⇒ Endkonzentration: 60 mM K⁺). Die Stimulationslösung wurden dabei direkt in die im Heizblock befindlichen Aliquots pipettiert. Dies erfolgte mit Hilfe einer Mehrfachpipette, wodurch bis zu 4 Aliquots zeitgleich stimuliert werden konnten. Bei jedem Experiment wurden eine oder mehrere Kontrollen (Stimulation mit reiner artifizieller CSF II) zur Ermittlung der basalen Neurotransmitterfreisetzung durchgeführt. Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurden die Aliquots sofort auf Eis gestellt und mit 2,5 µl 5 mM EGTA (⇒ Endkonzentration 50 µM) versetzt. Unmittelbar im Anschluß wurden die Synaptosomen durch Zentrifugation (13.000 rpm, 2-3 min, 4 °C) pelletiert und 200 µl Überstand abgenommen. Die Lagerung der Überstände erfolgte wie oben bei -80 °C.

6 Experimente mit hippocampalen Primärkulturzellen

6.1 Stimulation mit K^+ und nikotinischen (Ant-)Agonisten

Artifizielle CSF I: siehe Abschnitt 2

Artifizielle CSF II: siehe Abschnitt 5.2

Vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium aus den Wells komplett abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit artifizieller CSF I gewaschen. Danach erfolgte die Äquilibration der Zellen für 15 min auf einer Heizplatte bei 37 °C in calciumhaltiger CSF II (ca. 500 µl pro Well). Die Stimulation der Zellen erfolgte, indem die Äquilibrationlösung vollständig abgesaugt und in jedes Well 250 µl artifizielle CSF II mit entweder 60 mM K^+ , 100 mM Nikotin, 1 µM Galanthamin bzw. Nikotin und Galanthamin pipettiert wurden. In den Inhibitionsexperimenten mit Methylycaconitin (MLA) wurde der Blocker in einer Konzentration von 1 µM zu den entsprechenden Stimulationslösungen zugegeben. Bei den Stimulationen wurde - wie in Abschnitt 5.2 - eine Mehrfachpipette verwendet. Nach Ablauf der Stimulationsdauer - je nach Experiment 30 oder 180 sec bei 37 °C - wurden pro Well 225 µl Überstand abgenommen, in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und nach Beendigung des Experiments umgehend bei -80 °C eingefroren.

6.2 Glutamat-Potenzierung

Waschpuffer (WP): in mM: 125 NaCl, 5 KCl, 2 KH_2PO_4 , 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 20 HEPES, 5 D-Glucose; pH 7,3

Stimulationspuffer (SP): in mM: 125 NaCl, 5 KCl, 6 $CaCl_2$, 0,8 $MgCl_2$, 20 HEPES und 5 D-Glucose (pH 7,3), mit (in µM) 50 L-Glutamat, 10 Glycin und 10 Bicucullin

Methodisch wurde in gleicher Weise verfahren wie in Abschnitt 6.1. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit WP erfolgte die erste Stimulation mit SP für 30 sec bei RT. Je nach Experiment wurden folgende Substanzen zum SP hinzugefügt (in µM): 25 AP-5, 10 CNQX und 50 (S)-MCPG. Anschließend wurden die Zellen zügig mit WP gewaschen (insg. 5x). Nach 30 min erfolgte die zweite Stimulation (30 sec, RT). Die Überstände aus den beiden Stimulationen (2x 225 µl pro Well) wurden wie oben bei -80 °C gelagert.

7 Modifikation der Überstände aus Abschnitt 5 und 6

Um eine spätere Identifizierung und Quantifizierung von Glutamat und GABA zu ermöglichen, wurde die Standardadditionsmethode angewendet. Dazu wurden die Überstände in zwei Teile aufgeteilt und in eines der beiden Aliquots je 500 pmol Glutamat und GABA (5 µl einer 100 µM Stammlösung in Wasser) zugegeben. Pro Experiment wurden mindestens drei Überstände auf diese Weise untersucht.

8 Abtrennung von Proteinen durch Acetonfällung

Zur Beseitigung interferierender Proteine und Peptide aus den Überständen wurden diese einer Acetonfällung unterzogen. Dazu wurde jede Probe mit dem 5-fachen Volumen eiskalten Acetons (p.A., Riedel de Haën) versetzt, gut durchmischt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde mit 10.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß pipettiert. Im letzten Schritt erfolgte das Abdampfen des Acetons sowie das Einengen der Probe in einer Vakuumzentrifuge. Je nach beabsichtigter Derivatisierungsmethode (siehe Abschnitt 11) wurden die Proben bis auf ein Volumen von ca. 50 µl eingengt (OPA-Derivatisierung) oder vollständig eingedampft (AQC-Derivatisierung). Sofern nicht unmittelbar im Anschluß eine weiterführende Bearbeitung der Proben erfolgte, wurden diese bei -20 °C eingefroren.

9 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Trenngelpuffer: 375 mM TRIS, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8

Sammelgelpuffer 125 mM TRIS, 0,1 % (w/v) SDS; pH 6,8

Reduzierender Probenpuffer: 62,5 mM TRIS, 2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 % (w/v) Glycerol, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

Elektrodenpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3

Sammelgel (4 %): 0.5 ml Acrylamidlösung (30 %), 0.95 ml Sammelgelpuffer, 2.3 ml Wasser, 1,5 µl TEMED, 60 µl 0,1 % (w/v) APS-Lösung in Wasser (frisch angesetzt)

Trenngel (15 %): 3 ml Acrylamidlösung (30 %), 1,5 ml Trenngelpuffer, 1,5 ml Wasser, 2,4 µl TEMED, 60 µl 0,1 % (w/v) APS-Lösung in Wasser (frisch angesetzt)

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 8 beschriebene Proteinfällung quantitativ erfolgte, wurden Überstände vor und nach der Acetonfällung elektrophoretisch aufgetrennt. Die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in Anlehnung an Lämmli (1970) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde die Polymerisation des Trenngels durch die Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Radikalkettenträgers N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Darauf wurde das Trenngel gegossen und die Lösung vorsichtig mit Ethanol p.A. überschichtet. Nach ca. 45 min war das Trenngel auspolymerisiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel aufgetragen, wobei ein Plastikkamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt wurde. Nach erfolgter Polymerisierung des Sammelgels (ca. 20 min) wurde der Plastikkamm vorsichtig entfernt, die Proben 1:1 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 90 °C aufgeköcht und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Marker wurde der LMW-Standard von Pharmacia-Upjohn verwendet, der Proteine der Molekulargewichte 96, 67, 44, 30, 20 und 14,4 kDa enthält. Der Elektrophoresevorgang wurde mit einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt. Für ein Gel mit den Ausmassen 60 x 150 x 1 mm (Höhe/Breite/Tiefe) wurden ca. 80 min benötigt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die blaue Laufmittelfront (Bromphenolblau) das Gelende erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Anfärbung der aufgetrennten Proteine durch Silberfärbung.

10 Silberfärbung

Entwickler: 15 g Na₂CO₃ (wasserfrei) in 500 ml Wasser; kurz vor Gebrauch 250 µl Formaldehydlösung (37 %) zusetzen

Alle Lösungen waren wässrige Lösungen. Die Chemikalien waren von p.A. Qualität, damit die Färbung beeinflussende Verunreinigungen vermieden werden konnten.

Das Gel wurde zunächst für 25 min in 50 % (v/v) Ethanol eingeweicht, danach noch einmal für 15 min in 5 % (v/v) Ethanol. Anschließend wurde dreimal schnell mit Wasser gewaschen und dann für 30 min in 10 µM DTT-Lösung inkubiert. Daraufhin folgte eine 30 minütige Behandlung mit 0,1 % (w/v) AgNO₃-Lösung. Schließlich erfolgte der eigentliche Färbeprozess: Das Gel wurde kurz mit Wasser und dann mit Entwickler gewaschen, um

Reste der AgNO_3 -Lösung zu entfernen. Sodann wurde das Gel solange in der Entwicklerlösung belassen, bis sich die Banden farblich herausgebildet hatten. Das Abstoppen des Färbeproganges erfolgte mit Zitronensäure (ca. 10 g Zitronensäure auf 200 ml Entwicklerlösung).

Die Archivierung der Gele erfolgte entweder in feuchtem Zustand durch Scannen oder durch Einweichen der Gele ü.N. in 4 % (w/v) Glycerin-Lösung und anschließendem Trocknen. Dazu wurde das Gel auf 2 Lagen 3MM Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und für 60 min bei 70 °C unter Vakuum in einer Geltrocknungsapparatur getrocknet.

11 Derivatisierung von Aminosäuren

Aminosäuren lassen sich sehr viel empfindlicher nachweisen, wenn geeignete Derivatisierungen vor der chromatographischen Analyse vorgenommen werden. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, gehört die Fluoreszenz-Derivatisierung mit anschließender Fluoreszenz-Detektion zu den empfindlichsten Nachweismethoden. Aus diesem Grunde wurde in den hier durchgeführten Experimenten, bei denen sehr geringe Mengen an Glutamat und GABA nachzuweisen waren, hauptsächlich die Fluoreszenz-Methode angewendet.

11.1 Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA)

Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) kondensiert mit Aminosäuren unter reduzierenden und alkalischen Bedingungen zu fluoreszierenden Derivaten (Abb. 13), welche sehr empfindlich detektiert werden können. Darüber hinaus ist eine nicht-fluoreszenzspektroskopische Detektion bei einer Wellenlänge von 340 nm möglich, die allerdings wesentlich unempfindlicher ist.

Die Derivatisierung wurde wie folgt durchgeführt: Die nach der Acetonfällung auf ca. 50 μl eingengten Überstände wurden zunächst mit Wasser auf ein Volumen von 125 μl aufgefüllt. Anschließend wurden 125 μl OPA-Derivatisierungslösung (Sigma) hinzugegeben und mit einer Pipette durch vorsichtiges Auf- und Abziehen gut vermischt. Nach 2 min wurden 100 μl des derivatisierten Ansatzes in das HPLC-System injiziert. Zur Kontrolle wurde bei jedem Experiment auch die entsprechende reine Stimulationslösung (CSF II bzw. SP) derivatisiert und analysiert.

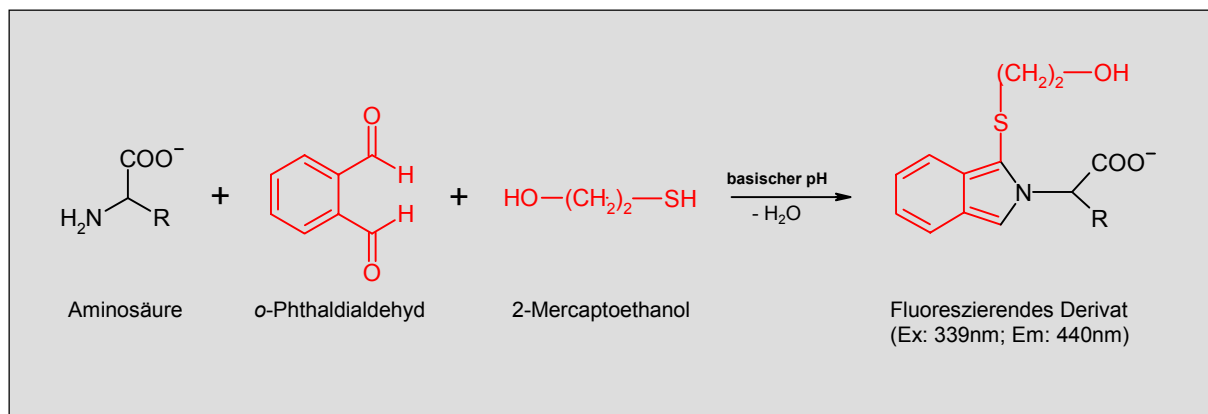


Abb. 13: Derivatisierung von Aminosäuren mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA). Die Bestandteile der Derivatisierungslösung (Sigma) sind rot gekennzeichnet. Ex: Exzitationswellenlänge; Em: Emissionswellenlänge.

Nach Beendigung der Entwicklungs- und Optimierungsphase wurde die Derivatisierung – nach dem Auffüllen der Überstände auf 125 μl – vom automatischen Probengeber des HPLC-Systems nach folgendem Programm durchgeführt:

| Row | Action |
|-----|---|
| 1 | DRAW def. amount (50 μl) from vial x (derivatizing agent) |
| 2 | EJECT def. amount into (needle) seat |
| 3 | DRAW def. amount (50 μl) from sample |
| 4 | EJECT def. amount into seat |
| 5 | DRAW max. amount (100 μl) from seat |
| 6 | MIX max. amount in seat, 5 times |
| 7 | NEEDLE wash in wash vial, 1 times |
| 8 | INJECT |

11.2 Derivatisierung mit 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbammat (AQC)

Die Reaktion von primären und sekundären Aminosäuren mit 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbammat (AQC) führt zu stabilen Derivaten (Abb. 14), die bei einer Wellenlänge von 395 nm stark fluoreszieren. Das dabei entstehende Nebenprodukt N-Hydroxysuccinimid (NHS) hingegen zeigt keine nennenswerte Fluoreszenz.

Die Durchführung der AQC-Derivatisierung erfolgte nach der mitgelieferten Vorschrift des ‚AccQ-Fluor™ Reagent Kit‘ der Firma Waters: Zunächst wurde das pulverförmige Derivatisierungsreagenz mit 1 ml Acetonitril versetzt, kurz gevortext und durch 10 minütiges Erhitzen auf 55° C gelöst (Endkonzentration ca. 10 mM). Sodann wurden die nach der Acetonfällung vollständig eingedampften Proben in je 20 µl 20 mM HCl rekonstituiert.

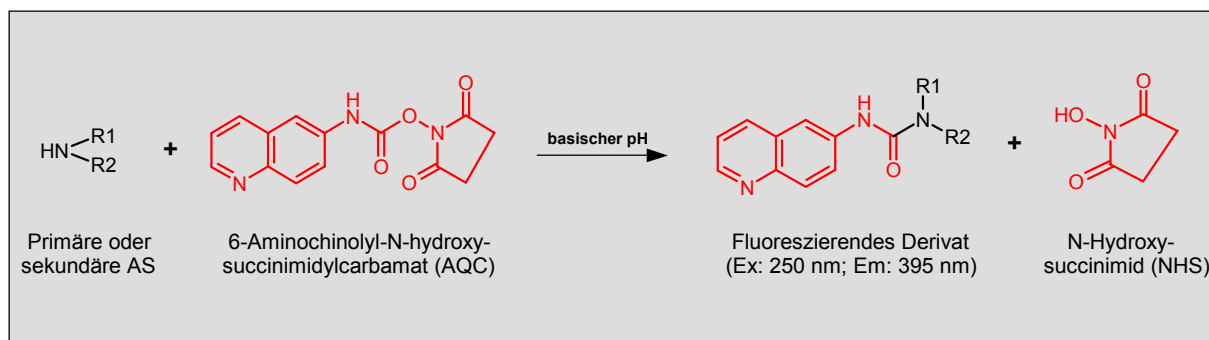


Abb. 14: Derivatisierung von Aminosäuren mit 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbamate (AQC). Bestandteile des Derivatisierungsreagenz sind rot gekennzeichnet. AS: Aminosäure; Ex: Exzitationswellenlänge; Em: Emissionswellenlänge.

Die Derivatisierung erfolgte durch Zugabe von 60 µl AccQ-Fluor-Borat-Puffer und 20 µl des gelösten Derivatisierungsreagenz zu 20 µl rekonstituierter Probe. Die Derivatisierungsansätze wurden kurz gevortext, 1 min bei RT und schließlich noch weitere 10 min bei 55° C inkubiert.

12 Chromatographische Trennung und Nachweis derivatisierter Aminosäuren

12.1 Trennung und Nachweis OPA-derivatisierter Aminosäuren

Eluent A: 96 % 50 mM Phosphorsäure + 50 mM Essigsäure, pH 7,5 – 4 % Methanol (HPLC grade) (v/v)

Eluent B: 65 % Methanol (HPLC grade) – 35 % Wasser (v/v)

Die chromatographische Auftrennung der OPA-derivatisierten Proben sowie der Nachweis der freigesetzten Aminosäuren erfolgte mittels HPLC mit anschließender Fluoreszenzdetektion. Als HPLC-System wurde die Chemstation 1100 von Hewlett Packard/Agilent Technologies mit Fluoreszenzdetektor verwendet. Die Trennung erfolgte auf

einer LiChrosorb C₁₈-Reversed-Phase Säule (200 x 4,6 mm; Partikelgröße: 5 µm) von Merck (Darmstadt). Zum Schutz der Säule wurde das Security-Guard™-System der Fa. Phenomenex Ltd. mit passender C₁₈-Kartusche vorgeschaltet.

Ausgehend von einer Vorschrift nach Jones & Gilligan (1983) wurde folgender Elutionsgradient entwickelt:

| Zeit (min.) | Eluent A (%) | Eluent B (%) | Methanol (%) |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 0,0 | 60,0 | 40,0 | -- |
| 1,0 | 59,0 | 41,0 | -- |
| 2,0 | 57,5 | 42,5 | -- |
| 9,0 | 50,0 | 50,0 | -- |
| 22,5 | 49,0 | 51,0 | -- |
| 25,0 | 48,5 | 51,5 | -- |
| 27,5 | -- | 100,0 | -- |
| 30,0 | -- | -- | 100,0 |
| 40,0 | -- | -- | 100,0 |
| 45,0 | 60,0 | 40,0 | -- |
| 50,0 | 60,0 | 40,0 | -- |

Die Flussrate betrug 1,5 ml/min und die Säulentemperatur 20 °C. Alle 50 min konnte ein neuer Lauf gestartet werden. In den ersten Monaten dieser Arbeit wurde die Detektion der derivatisierten Aminosäuren mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors bei einer Wellenlänge von 340 nm vorgenommen. Danach wurden OPA-Aminosäuren ausschließlich mit einem Fluoreszenzdetektor bei folgenden Wellenlängen detektiert: Excitation: 339 nm; Emission: 440 nm.

12.2 Trennung und Nachweis AQC-derivatisierter Aminosäuren

Eluent 1: 70 mM Ammoniumacetat, pH 5,0

Eluent 2: 100 % Acetonitril

Die HPLC-Analyse der AQC-derivatisierten Proben wurde mit einem Waters Alliance® 2690 Separations Modul durchgeführt. Zur Trennung wurde eine XTerra™ MS-C₁₈-Reversed-Phase Säule (150 x 3.0 mm, Partikelgröße: 5 µm) der Firma Waters mit vorgeschaltetem Security-Guard™-System (Phenomenex Ltd.) verwendet. Die Elution erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Eric H. Block (2000) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und einer Säulentemperatur von 35° C.

| Zeit (min.) | Eluent 1 (%) | Eluent 2 (%) | Wasser (%) |
|-------------|--------------|--------------|------------|
| 0,0 | 100,0 | -- | -- |
| 0,5 | 99,0 | 1,0 | -- |
| 18,0 | 95,0 | 5,0 | -- |
| 19,0 | 91,0 | 9,0 | -- |
| 29,5 | 83,0 | 17,0 | -- |
| 40,0 | -- | 60,0 | 40,0 |
| 45,0 | 100,0 | 0,0 | -- |

Die Analyse einer Probe dauerte insgesamt 50 min. Die aufgetrennten Komponenten wurden mittels Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI) detektiert (Gerät: ZMD 2000, Waters). Dazu wurde die in die Ionenquelle eingeführte Menge an Eluat mit Hilfe eines graduell einstellbaren Micro-Splitter-Ventils (Upchurch Scientific) auf ca. 0,1 ml/min reduziert. Gemessen wurde im positiven Ionenmodus mit folgenden Einstellungen:

| | | | | | |
|---------------------|------|-------|-----------------------|-----|---------|
| Capillary: | 3,32 | kVolt | Desolvation Temp.: | 350 | °C |
| Cone: | 22 | Volt | Ion Energie: | 0,8 | Volt |
| Extractor: | 3 | Volt | Multiplier: | 650 | Volt |
| RF Lens: | 0,3 | Volt | Cone Gas Flow: | 24 | Liter/h |
| Source Block Temp.: | 140 | °C | Desolvation Gas Flow: | 479 | Liter/h |

13 Auswertung der Chromatogramme

13.1 Identifizierung und Quantifizierung von OPA-derivatisiertem Glutamat und GABA

Die Identifizierung der Glutamat- und GABA-Peaks in den Chromatogrammen der Stimulationsexperimente erfolgte auf zwei Wegen. Zum einen wurden die Chromatogramme mit Eichchromatogrammen der einzelnen Substanzen verglichen, zum anderen wurden Chromatogramme verglichen, die aus Messungen an Proben mit und ohne Zusatz von Glutamat und GABA resultierten (Standardadditionsmethode, vgl. Abschnitt 7 und Abb. 15).

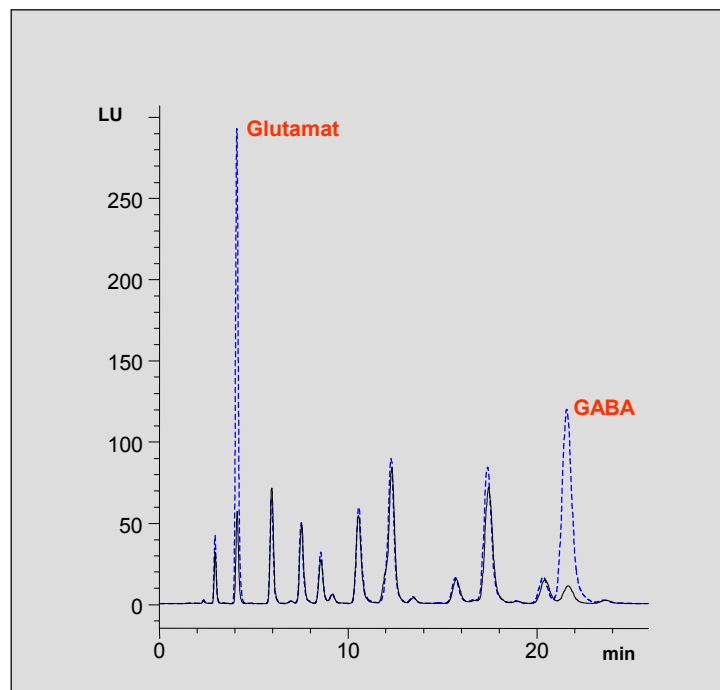


Abb. 15: Identifizierung von OPA-Glutamat und -GABA mit Hilfe der Standardadditionsmethode. Durch Aufteilung von Proben (hier ein Überstand von hippocampalen Synaptosomen) und Zugabe von Glutamat und GABA in eines der beiden Aliquots können bei Übereinanderlagerung der zugehörigen Chromatogramme Glutamat und GABA identifiziert werden. — Aliquot ohne zugesetzte Aminosäuren; - - - Aliquot mit zugesetzten Aminosäuren.

Zur Quantifizierung von freigesetztem Glutamat und GABA wurden die Peakflächen (engl.: *Area under the curve*, AUC) herangezogen. Innerhalb eines Experimentes wurden – nach Abzug der interferierenden AUCs aus den Kontrollen – die AUCs der Glutamat- und GABA-Peaks für die einzelnen Bedingungen untereinander verglichen. Der Vergleich der AUC-Werte innerhalb einer Versuchsserie erfolgte bei geringen Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten direkt, bei größeren Schwankungen zwischen den Experimenten

indirekt über die gegen den AUC-Wert der Kontrolle (basale Freisetzung) normalisierten Werte (Bildung der Ratiowerte AUC_X/AUC_{Basal} , mit $X = K^+$, Nikotin, Galanthamin etc.). Aus allen Experimenten einer Versuchsreihe wurde schließlich für jede Bedingung der mittlere AUC-Wert bzw. der mittlere AUC_X/AUC_{Basal} -Wert berechnet.

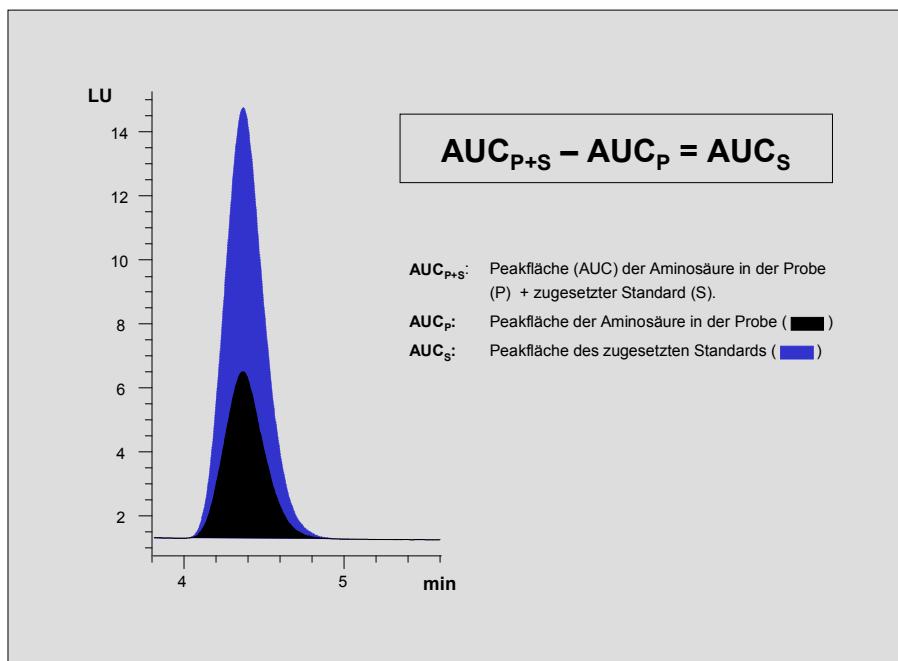


Abb. 16: Quantifizierung von freigesetztem Glutamat und GABA über die Standardadditionsmethode. Durch Subtraktion der entsprechenden Peakflächen (AUCs) aus Chromatogrammen aliquotierter Proben ohne von denen mit zugesetzten Aminosäuren ergeben sich die den zugesetzten Mengen entsprechenden Peakflächen. Lu: Light units.

Um den tatsächlichen Gehalt an Glutamat und GABA in einer Probe bestimmen zu können, musste eine direkte Beziehung zwischen Peakfläche und Menge hergestellt werden. Dies geschah mit Hilfe der Standardadditionsmethode. Dazu wurden Überstände wie in Abschnitt 7 beschrieben aufgeteilt und mit definierten Mengen an Glutamat und GABA versetzt. Nach der chromatographischen Analyse konnten die in den Proben enthaltenen Glutamat- und GABA-Mengen über die Berechnung der Peakfläche des zugesetzten Standards bekannter Konzentration bestimmt werden (siehe auch Abb. 16):

$$AUC_{P+S} - AUC_P = AUC_S$$

Hierbei ist AUC_{P+S} die Summe der Peakflächen der entsprechenden Aminosäure in der Probe und des zugesetzten Standards, AUC_P die Peakfläche der Aminosäure in der Probe und AUC_S die Peakfläche des zugesetzten Standards.

13.2 Identifizierung und Quantifizierung des AQC-GABA-Derivates

Die Identifizierung des AQC-GABA-Derivates erfolgte über die Masse. Dazu wurde mit dem Massenspektrometer eine sog. ‚Einzelionenaufnahme‘ (engl.: *single ion recording*, SIR) für die monoisotopische, einfach positiv geladene Masse des Derivates (Masse/Ladung (m/z) = 274,1) durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Retentionszeit des in Proben detektierten AQC-GABA-Derivates mit der Retentionszeit von Standards verglichen.

Die Quantifizierung erfolgte wie bei den OPA-Derivaten über die Peakfläche (AUC).

13.3 Darstellung der Versuchsergebnisse

Zur einheitlichen Darstellung der Versuchsergebnisse wurden die AUC-Werte für Glutamat und GABA aus den einzelnen Stimulationen (X) nach folgender Formel gegen den jeweiligen Kontrollwert (basale Freisetzung von Glutamat und GABA) normalisiert:

$$\Delta AUC = \left[\frac{AUC_x - AUC_{Basal}}{AUC_{Basal}} \right] \cdot 100 = \left[\frac{AUC_x}{AUC_{Basal}} - 1 \right] \cdot 100$$

ΔAUC gibt somit die prozentuale Abweichung der AUC-Werte aus den Stimulationen von den basalen AUC-Werten an.

13.4 Statistik

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den für die einzelnen Bedingungen erhaltenen Werten wurde mit Hilfe des unabhängigen T-Tests (zwei Populationen; Signifikanzebene (p): 0,05) bestimmt. Statistische Signifikanzen, bei denen $0,05 > p > 0,01$, $0,01 > p > 0,001$ und $0,001 > p$ war, wurden mit ‚*‘, ‚***‘ bzw. ‚****‘ gekennzeichnet. Alle Unterschiede mit einer Signifikanzebene $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant (ns) gewertet.

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die Fehlerbalken in den Diagrammen dem Standardfehler (sem) der mittleren ΔAUC -Werte.

Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Einflusses nikotinischer Liganden sowie der Glutamat-vermittelten Langzeitpotenzierung auf die Freisetzung der Aminosäure-Neurotransmitter Glutamat und GABA im Hippocampus auf dem Vielzellniveau. Dazu musste ein (Test-) System etabliert werden, das ermöglicht, die Neurotransmitterfreisetzung aus neuronalem Gewebe – in diesem Falle hippocampalen Synaptosomen und Primärkulturzellen – qualitativ wie quantitativ zu erfassen. Als Nachweismethode wurde die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) eingesetzt.

1 Etablierung des Testsystems

1.1 Derivatisierung von Glutamat und GABA mit *ortho*-Phthaldialdehyd

Bei der chromatographischen Aminosäure-Analytik mit der HPLC-Methode können nur dann hohe Detektionsempfindlichkeiten erreicht werden, wenn die Aminosäuren chemisch modifiziert, d.h. derivatisiert werden. Im Wesentlichen sind drei verschiedene Derivatisierungsreagenzien im Gebrauch: 1.) 4-Dimethylaminoazobenzol-sulfonylchlorid (DABSYL-Cl; Stocchi et al., 1989), 2.) Phenylisothiocyanat (PITC; Cohen & Strydom, 1988; Davey & Ersser 1990) und 3.) *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA; Svedas et al., 1980; Jones & Gilligan, 1983). Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, zeigen DABSYL-Cl und PITC vergleichbare Eigenschaften, während OPA-Derivate weniger stabil, dafür aber aufgrund der Fluoreszenz auch noch im fmol-Bereich detektierbar sind. Da die Empfindlichkeit als entscheidender Faktor angesehen wurde, fiel die Wahl auf OPA. Die fertige Derivatisierungslösung (OPA, 2-Mercaptoethanol, Methanol, Brij 35, KOH und Borsäure; pH 10,4) wurde von der Firma Sigma bezogen.

| | DABSYL-Cl | PITC | OPA |
|-------------------------------|------------|------------|---------------------------|
| Detektionsart | Absorption | Absorption | Fluoreszenz (+Absorption) |
| Sensitivität | pmol | pmol | fmol |
| Stabilität d. Derivats | sehr gut | gut | gering |
| Reaktionskinetik | langsam | mäßig | schnell |
| Ein Peak pro AS | ja | ja | ja |

Tabelle 4: Vergleich der drei am häufigsten verwendeten Derivatisierungsreagenzien für Aminosäuren (AS). DABSYL-Cl: Dimethylaminoazobenzol-sulfonylchlorid; OPA: *ortho*-Phthaldialdehyd; PITC: Phenylisothiocyanat.

Zunächst musste die Derivatisierungsmethode an das vorhandene HPLC-System angepasst und optimiert werden. Dabei waren folgende Punkte von Bedeutung:

- Optimale Derivatisierungsdauer
- Optimale Exzitations- und Emissionswellenlänge für die Fluoreszenzdetektion (FLD)
- Absolute Nachweisgrenze
- Reproduzierbarkeit

Derivatisierung und Elution der OPA-Aminosäuren wurden zunächst nach Vorschrift des Herstellers (Referenz: Jones & Gilligan, 1983) durchgeführt. Die Elutionszeiten für OPA-Glutamat und -GABA wurden durch die chromatographische Analyse derivatisierter Standards der einzelnen AS (in PBS) bestimmt. Dabei ergab sich für Glutamat $3,5 \pm 0,5$ min und für GABA 15 ± 1 min.

In den Versuchsserien zur Reproduzierbarkeit der OPA-Derivatisierung (1.1.4) und zur Beseitigung von Proteinverunreinigungen (1.2.) wurden die OPA-Derivate mit einem Dioden-Array-Detektor (Messung der Absorption bei 340 nm) nachgewiesen. In allen anderen Testversuchen erfolgte die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor.

1.1.1 Optimale Derivatisierungsdauer

Aufgrund der unterschiedlichen Literaturangaben zur Derivatisierungsdauer, die von 1 min (Jones & Gilligan, 1983) bis 10 min (Rowley et al., 1995) reichten, wurden ein Glutamat/GABA-Standard (10 nM in PBS) mit Derivatisierungslösung (1:1, v/v) versetzt und nach 1, 2, 5, 10 und 40 min 100 µl (500 fmol) davon in das HPLC-System injiziert (siehe Abb. 17). Während sich der Glutamat-Peak über die 40 min kaum veränderte (bis 5 min leicht ansteigend, danach allmählich abfallend), war bei GABA schon nach 5 min eine Peakabnahme festzustellen. Nach 40 min war der GABA-Peak kaum noch erkennbar. Diese unterschiedliche Stabilität der OPA-Derivate von Glutamat und GABA beobachteten zu einem späteren Zeitpunkt auch Bianchi et al. (1999) und wählten daher eine Derivatisierungszeit von 1,5 min. Hier wurden 2 min als Optimum bestimmt.

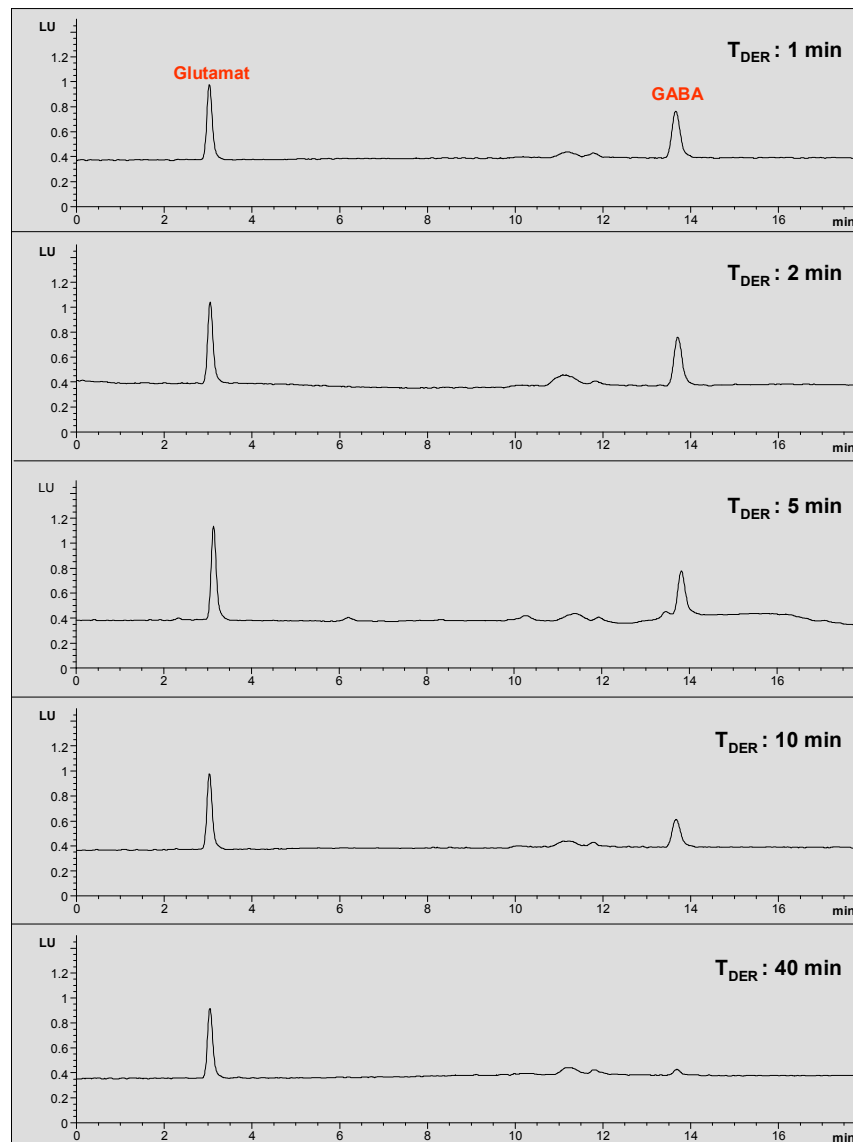


Abb. 17: Stabilität der OPA-Derivate von Glutamat und GABA. Ein 10 nM Glutamat/GABA-Standard in PBS wurde zunächst mit OPA-Derivatisierungslösung im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. Nach 1,2,5,10 und 40 min wurden jeweils 100 µl (5 pmol) in das HPLC-System injiziert. Während der Peak des OPA-Glutamat-Derivats über die 40 min nur geringfügig kleiner wurde, konnte beim GABA-Derivat schon nach 5 min eine deutliche Abnahme der Peakhöhe beobachtet werden. LU: Light units; T_{DER} : Zeitdauer der Derivatisierung.

1.1.2 Optimale Exzitations- und Emissionswellenlänge für die Fluoreszenzdetektion

Ähnlich wie bei der Derivatisierungsdauer unterschieden sich auch die Literaturangaben bezüglich der geeigneten Exzitations- und Emissionswellenlänge der OPA-Derivate z.T. deutlich voneinander. So reichten die Werte für die Exzitationswellenlänge von 330-360 nm und für die Emissionswellenlänge von 440-460 nm (vgl. hierzu u.a. Svedas et al., 1980, Jones & Gilligan, 1983 und Kamisaki et al., 1996). Daher mussten auch diese Parameter optimiert werden.

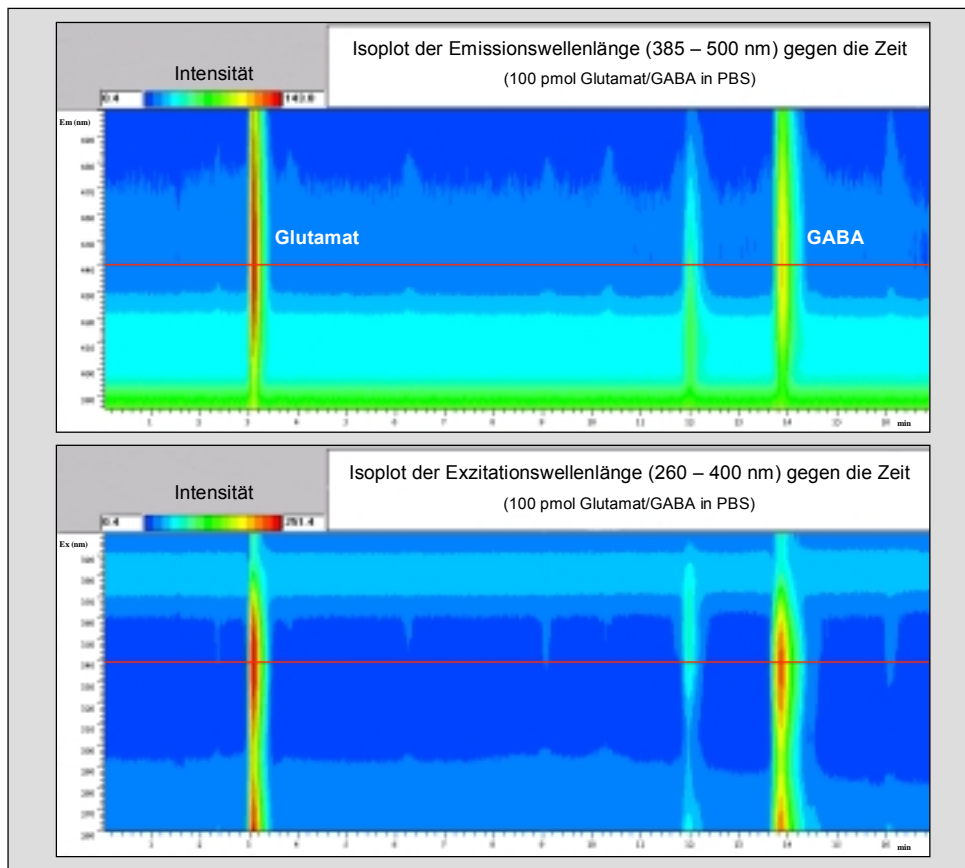


Abb. 18: Optimierung der Emissions- und Exzitationswellenlänge für die Fluoreszenzdetektion von OPA-Glutamat und -GABA (1). 100 pmol eines derivatisierten Glutamat/GABA-Standards wurden zweimal hintereinander injiziert, wobei im ersten Lauf ein Scan der Emissionswellenlänge (385-500 nm) und im zweiten ein Scan der Exzitationswellenlänge (260-400nm) durchgeführt wurde. Die Abb. zeigt die Änderung der Signalintensität über die Zeit in Abhängigkeit der Emissions- bzw. Exzitationswellenlänge. Dabei steigt die Signalintensität – angegeben in Light units (LU) – von blau über grün und gelb nach rot. Die rote Linie kennzeichnet die Emissions- bzw. Exzitationswellenlänge (440 bzw. 339 nm), bei der die Signalintensität der OPA-Derivate von Glutamat und GABA am höchsten war. Em: Emissionswellenlänge; Ex: Exzitationswellenlänge.

Es wurden zweimal 200 pmol Glutamat/GABA eines 10 µM Derivatisierungsansatzes injiziert, wobei im ersten Lauf ein Scan der Emissionwellenlänge (385-500 nm) und im zweiten ein Scan der Exzitationswellenlänge (260-400 nm) durchgeführt wurde (Abb. 18). Dabei ergaben sich – mit Präferenz auf dem schwächeren GABA-Peak – folgende Optima:

- Exzitation: 339 nm
- Emission: 440 nm

Wie Abb. 19 zeigt, konnte auf diese Weise im Vergleich zu den anfänglich verwendeten Detektionswellenlängen nach Kamisaki et al. (1996; Ex: 360 nm; Em: 440 nm) eine deutliche Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden.

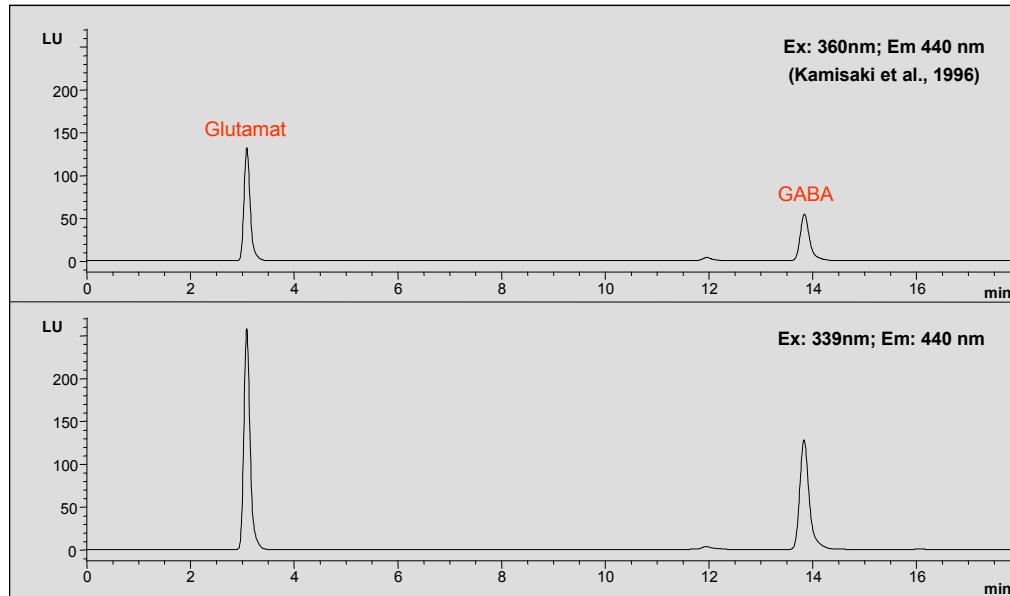


Abb. 19: Optimierung der Emissions- und Exzitationswellenlänge für die Fluoreszenzdetektion von OPA-Glutamat und -GABA (2). Vergleich zweier Testläufe mit Glutamat/GABA-Standards. In beiden Fällen wurden 200 pmol injiziert. **Die Änderung der Exzitationswellenlänge von 360 auf 339 nm ergab eine deutlich verbesserte Detektion der beiden Aminosäure-Derivate.** Em: Emissionswellenlänge; Ex: Exzitationswellenlänge; LU: Light units.

1.1.3 Absolute Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der absoluten Nachweisgrenze wurden jeweils 10 µl derivatisierter Standards injiziert, die folgende Glutamat- bzw. GABA-Mengen enthielten: 1 pmol, 500 fmol, 100 fmol, 50 fmol und 10 fmol.

Bis zur Konzentration von 50 fmol konnten die OPA-Derivate von Glutamat und GABA problemlos detektiert werden (siehe Abb. 20). Diese Nachweisgrenze von ca. 50 fmol fanden auch Zhou et al. (1995). Bei 10 fmol konnten keine signifikanten Peaks mehr erkannt werden.

Wie aus Abb. 20 weiterhin hervorgeht, verhielten sich die AUC-Werte der GABA-Peaks auch im Vergleich mit einem Standard höherer Konzentration (100 pmol/10 µl Injektion) proportional zu den entsprechenden Aminosäure-Mengen. Im Falle von Glutamat war der AUC-Wert für 100 pmol um ca. 10 % zu hoch; im hier analysierten Bereich von 1 pmol bis 50 fmol zeigte sich aber wie für GABA eine gute Proportionalität von AUC und Aminosäure-Menge.

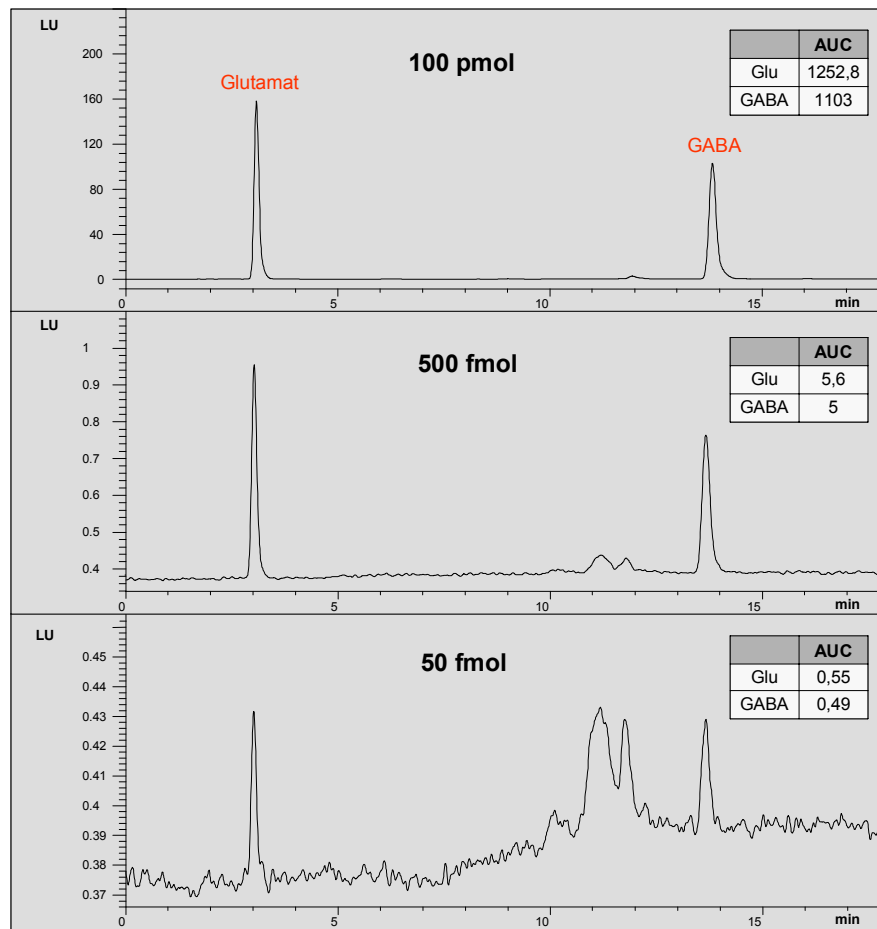


Abb. 20: Ermittlung der absoluten Nachweisgrenze für OPA-derivatisiertes Glutamat und GABA. Mengen von 1 pmol bis 10 fmol derivatisierter Glutamat/GABA-Standards wurden in das HPLC-System injiziert (Injektionsvolumen jeweils 10 µl). **50 fmol der beiden Aminosäuren konnten noch eindeutig nachgewiesen werden.** Die Peakflächen (Area under curve, AUC) waren dabei proportional zu den injizierten Mengen. Dies bestätigte sich auch im Vergleich mit einem Standard höherer Konzentration (injizierte Menge 100 pmol). LU: Light units.

1.1.4 Reproduzierbarkeit der Methode

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden folgende Testexperimente durchgeführt: Zum einen wurden jeweils 100 µl (10 nmol) 10 identischer Derivatisierungsansätze – 200 µM Glutamat/GABA in PBS + OPA Lsg. (1:1, v/v), zum anderen dreimal 10nmol Glutamat/GABA auf unterschiedliche Art und Weise – 100 µl eines 100 µM (200 µM Glutamat/GABA + OPA Lsg), 10 µl eines 1 mM und 1 µl eines 10 mM Derivatisierungsansatzes – injiziert und die Absorption bei 340 nm gemessen.

Die Auswertung der Chromatogramme (Vergleich der AUCs von Glutamat bzw. GABA) zeigte, dass im ersten Testversuch die Abweichungen zwischen den einzelnen Injektionen im Bereich von 1-3 % lagen (Daten nicht gezeigt), während im zweiten Versuch für GABA etwas höhere Abweichungen erhalten wurden (5-8 %, siehe Abb. 21). Allerdings muss

berücksichtigt werden, dass im zweiten Versuch durch die Verwendung verschiedener Standards sowie unterschiedlicher Injektionsvolumina noch zwei zusätzliche Fehlerquellen vorhanden waren. Um den Fehler so gering wie möglich zu halten, wurden daher bei allen Experimenten die gleichen Derivatisierungs- und Injektionsparameter verwendet.

Nach Abschluss der Anpassungs- und Optimierungsphase stand eine chromatographische Methode zur Verfügung, mit der es möglich war, die Aminosäuren Glutamat und GABA bis zu einer Menge von 50 fmol nachzuweisen und diese darüber hinaus über die Peakfläche (AUC) zu quantifizieren.

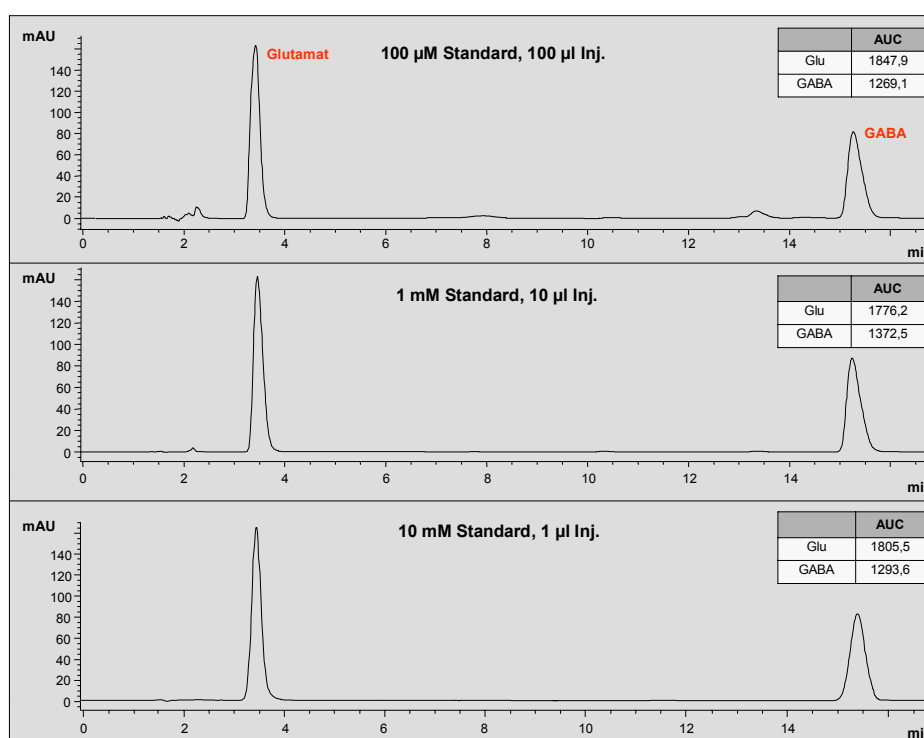


Abb. 21: Reproduzierbarkeit der OPA-Derivatisierung. 10 nmol OPA-Glutamat und -GABA wurden auf drei verschiedene Arten – 100 µM Standard, 100 µl Injektion; 1 mM, 10 µl; 10 mM, 1 µl – injiziert. Nach chromatographischer Auftrennung und Detektion wurden die Peakflächen (AUC) miteinander verglichen. Hierbei ergaben sich für beide OPA-Aminosäuren Abweichungen zwischen 5 und 8 %. mAU: Milli absorption units.

1.2 Beseitigung von Proteinverunreinigungen aus biologischen Proben

Für eine chromatographische Analyse von freien Aminosäuren in biologischen Proben ist es unabdingbar, darin enthaltene, den Nachweis störende Substanzen vorher abzutrennen. Dies trifft vor allem für Peptide und Proteine zu, die nicht nur die Trennsäule beschädigen, sondern auch den Derivatisierungsprozess beeinträchtigen.

In der Literatur sind in diesem Zusammenhang im Wesentlichen Methoden der Probenvorbereitung für die Chromatographie, die (Ultra-) Filtration sowie die Ausfällung mit organischem Lösungsmittel (Davey & Ersser, 1990; Daniels et al., 1995) beschrieben. Da bei der Ultrafiltration nur eine Abtrennung von Proteinen bis zu 5000 Dalton möglich ist (z.B. ‚Ultra-Spin Mikrofilter‘ der Fa. Roth oder ‚Centrisart® I-Filter‘ der Fa. Sartorius), musste diese Methode ausgeschlossen werden. Ausgehend von einer Vorschrift von Scopes (1998) wurde das in Abschnitt 8 des Material & Methoden-Teils beschriebene Protokoll der Proteinfällung mit Aceton entwickelt.

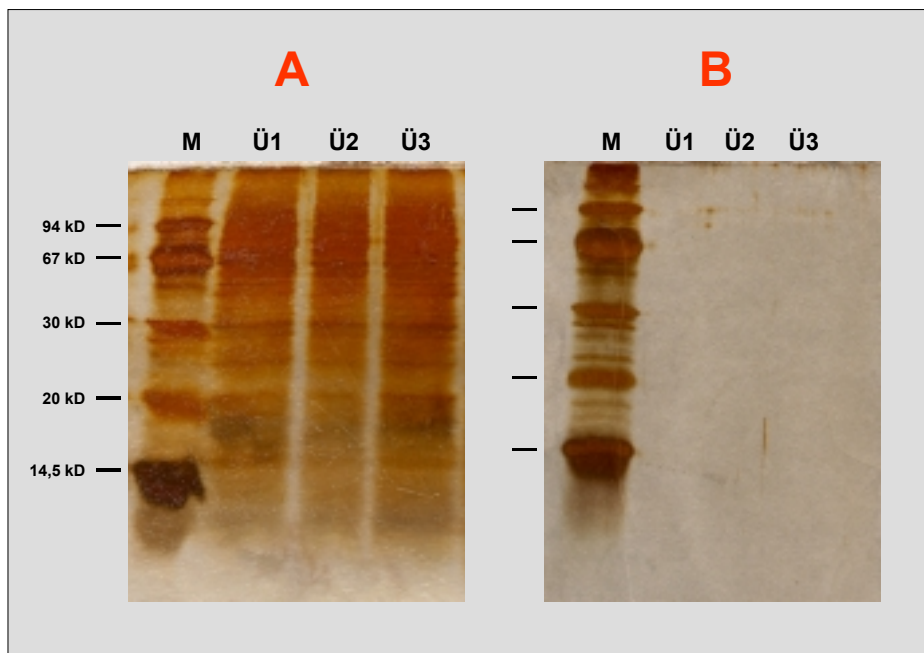


Abb. 22: Beseitigung von Proteinrückständen durch Acetonfällung. Hippocampale Synaptosomen wurden mittels Ultraschall lysiert und durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände mit dem synaptosomalen Inhalt wurden isoliert und anschließend einer Acetonfällung unterzogen. Vor und nach der Fällung wurden jeweils 10 μ l (ca. 5 % des Gesamtvolumens) der Überstände abgenommen, auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich silbergefärbt. **A zeigt die Überstände vor, B nach der Fällung.** Wie in A deutlich zu erkennen, befinden sich in den synaptosomalen Überständen über den gesamten Auftrennungsbereich (\sim 10-200 kD) hinweg große Mengen an Protein. Nach der Acetonfällung (B) ist in den Überständen kein Protein mehr detektierbar. M: Marker; Ü1-3: Überstände 1-3.

Um die Effektivität und Anwendbarkeit dieser Methode im Hinblick auf das zu etablierende Testsystem zu prüfen, wurde der Inhalt frisch präparierter hippocampaler Synaptosomen (ca. 1,5 mg Protein) extrahiert und jeweils 3 x 10 μ l vor und nach der Acetonfällung auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. Es zeigte sich, dass in den drei Synaptosomen-Aliquots Proteine fast über den gesamten Trennbereich des Gels vorhanden waren (Abb. 22A). Lediglich im unteren

Molekulargewichtsbereich (< 10 kD) waren keine nennenswerten Proteinmengen mehr sichtbar. Nach der Acetonfällung hingegen waren alle Proteine aus den Überständen entfernt (Abb. 22B). Allerdings konnte mit diesem Test keine Aussage über die Beseitigung sog. ‚low abundance‘ Proteine, deren Konzentrationen/Mengen unterhalb der Nachweisgrenze der Silberfärbung liegen, sowie kleiner Peptide (1-5kD), für die selbst ein 15 % SDS-Polyacrylamidgel zu ‚grobmaschig‘ ist, gemacht werden.

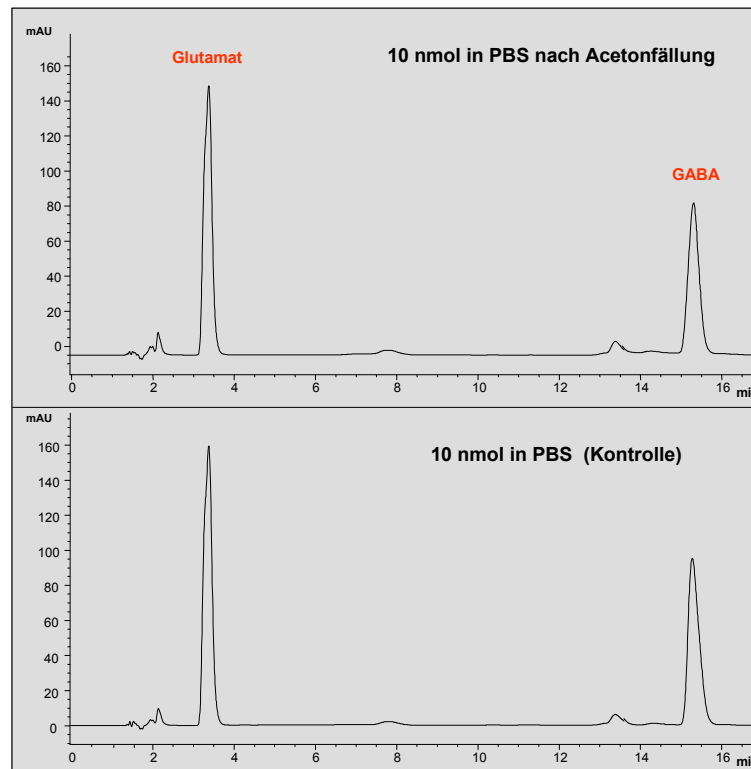


Abb. 23: Acetonfällung eines AS-Standards. 3 Aliquots eines 10 mM Glutamat/GABA-Standards wurden einer Acetonfällung unterzogen und nach Derivatisierung chromatographisch analysiert (obere Bildhälfte). Als Kontrolle wurden unbehandelte Standards gleicher Konzentration mitgeführt (untere Bildhälfte). Der Vergleich der Chromatogramme ergab, dass die **Peakflächen der Aceton-gefällten Aliquots mit denen der unbehandelten Standards innerhalb von ± 5 % übereinstimmten**. mAU: Milli absorption units.

Desweiteren musste getestet werden, ob durch die Acetonfällung aus einer Probe auch einzelne freie Aminosäuren entfernt werden. Dazu wurden 3 Aliquots eines 10 mM Glutamat/GABA Standards (in PBS) einer Acetonfällung unterzogen und danach – zusammen mit unbehandelten Standards als Kontrolle – derivatisiert und chromatographisch analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Peakflächen der OPA-Aminosäuren aus den Aceton-gefällten Standards innerhalb von ± 5 % mit den entsprechenden Peakflächen der Kontrollen übereinstimmten (Abb. 23).

1.3 Freisetzung von Glutamat und GABA aus neuronalem Gewebe

Im nächsten Schritt musste gezeigt werden, dass es mit den unter 1.1 und 1.2 optimierten Methoden tatsächlich möglich war, die Freisetzung der Aminosäuren Glutamat und GABA aus neuronalem Gewebe qualitativ und quantitativ zu erfassen. Zugleich musste überprüft werden, ob die beiden anfangs ausgewählten Systeme – hippocampale Synaptosomen bzw. Primärkulturzellen – für Neurotransmitterfreisetzungstudien geeignet sind.

Aus diesem Grunde wurde zunächst die K^+ -stimulierte Freisetzung untersucht. Ausgangspunkt für die Entwicklung der hier verwendeten Protokolle war eine Vorschrift von Verhage et al. (1992) zur Stimulation der NT-Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen der Ratte. Dort wurden die frisch präparierten Synaptosomen nach 10-minütiger Äquibrierung in artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) für 3 min mit 30 mM K^+ in artifizieller CSF stimuliert. Zur Bestimmung der basalen Freisetzung wurden Stimulationen mit reiner artifizieller CSF durchgeführt. Bezüglich der Stimulationsdauer von 3 min verwiesen die Autoren auf detaillierte Kinetikstudien für die Freisetzung von Glutamat (Nicholls et al., 1987; Mc Mahon and Nicholls, 1991) und GABA (Turner and Goldin, 1989), wonach diese in beiden Fällen zweiphasig abläuft, Ca^{2+} -abhängig ist und nach ca. 3 min abgeschlossen ist. In der ersten, nur etwa 2 sec dauernden Phase werden bereits 3-10 % der Neurotransmitter freigesetzt, während der übrige Anteil danach mit abnehmender Rate ausgeschüttet wird.

Da mit einer Erhöhung der K^+ -Konzentration auch eine gesteigerte Glutamat- und GABA-Freisetzung einhergeht (Rowley et al., 1995), wurde bei den hier durchgeführten Experimenten zur Erhöhung der Neurotransmitterfreisetzung mit 60 mM K^+ stimuliert.

1.3.1 Modifikation des Elutionsgradienten

Schon bei der chromatographischen Analyse der ersten Überstände wurde festgestellt, dass der GABA-Peak durch eine unbekannte Substanz überlagert war (siehe Abb. 24). Daher war es erforderlich, das Elutionsprotokoll zu modifizieren.

Bevor andere Eluenten in Betracht gezogen wurden, erfolgte zunächst die stufenweise Änderung des verwendeten Gradienten. Dabei wurde im Wesentlichen der Übergang von Eluent A zu Eluent B verlangsamt. Wie Abb. 24 belegt, konnte eine vollständige Trennung der betreffenden Peaks erreicht werden, indem die Änderung des Verhältnisses von Eluent A zu Eluent B von 50:50 auf 48,5:51,5 (v:v) von ursprünglich ca. 0,4 min. auf einen Zeitraum von 16 min gestreckt wurde (Abb. 25B). Allerdings musste dafür ein deutlicher Verlust an Peakschärfe in Kauf genommen werden.

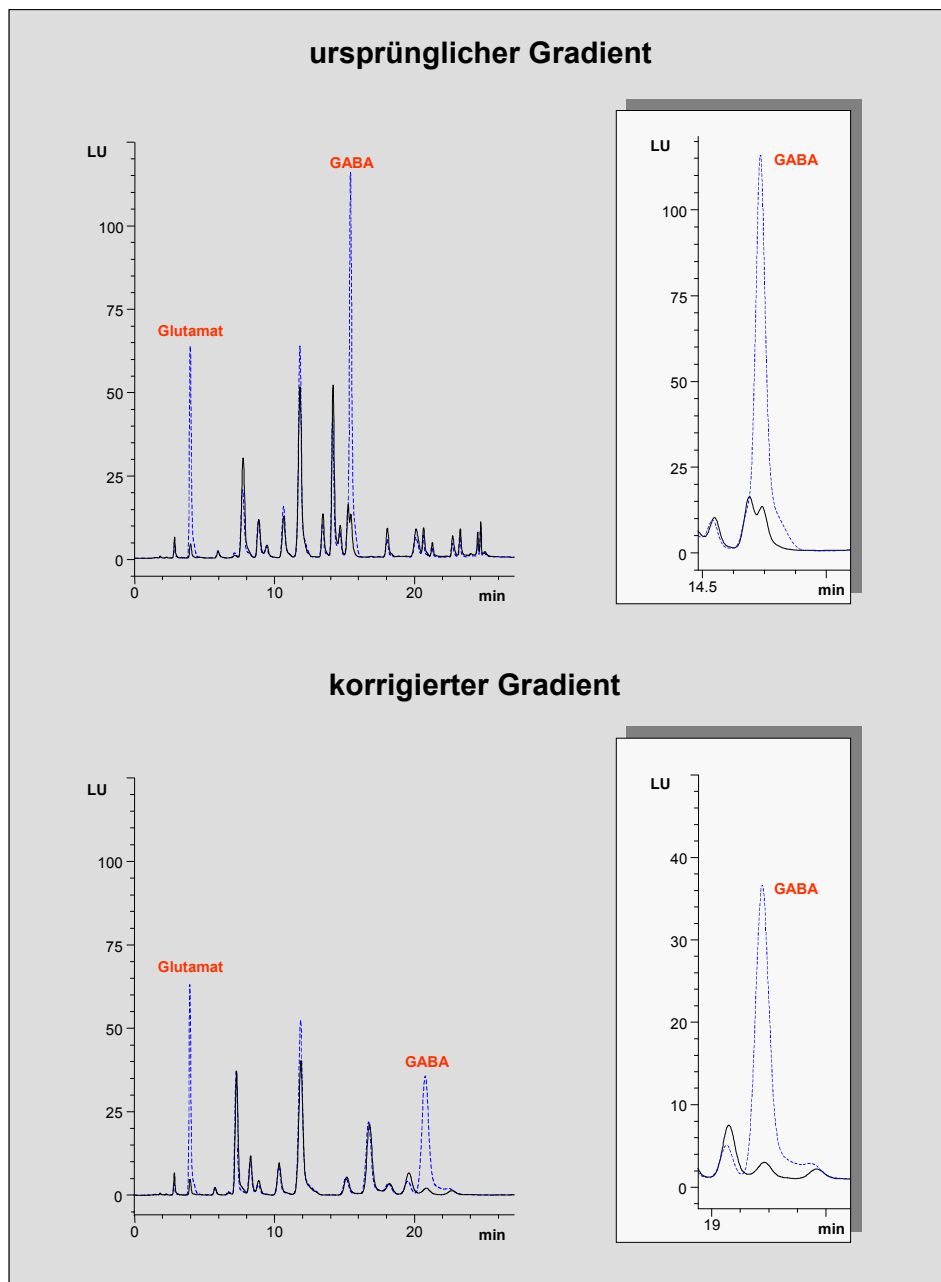


Abb. 24: Änderung des Elutionsgradienten (1). Zwei Überstände von stimulierten (60 mM K^+) hippocampalen Primärkulturzellen (HiPK) wurden in zwei gleiche Teile aufgeteilt und jeweils einem der beiden Aliquots eine definierte Menge an Glutamat/GABA-Standard zugegeben. Nach erfolgter OPA-Derivatisierung wurden je $50 \mu\text{l}$ der vier Proben in das HPLC-System injiziert, wobei die zwei Aliquots des einen Überstandes mit dem ursprünglichen (Abb. 25A) und die des zweiten Überstandes mit dem daraus abgeleiteten (Abb. 25B) Gradienten eluiert wurden. Wie aus den beiden gezeigten Chromatogrammen deutlich wird, verursachte der modifizierte Gradient eine verzögerte Elution der Peaks ab der 10. Minute, die mit einem Verlust an Peakschärfe einherging. Wie die Ausschnitte in der rechten Bildhälfte zeigen, konnte jedoch auf diese Weise die Überlagerung des GABA-Peaks beseitigt werden. LU: Light units; — Aliquot ohne zugesetzten Glutamat/GABA-Standard; - - - Aliquot mit zugesetzten Glutamat/GABA-Standard.

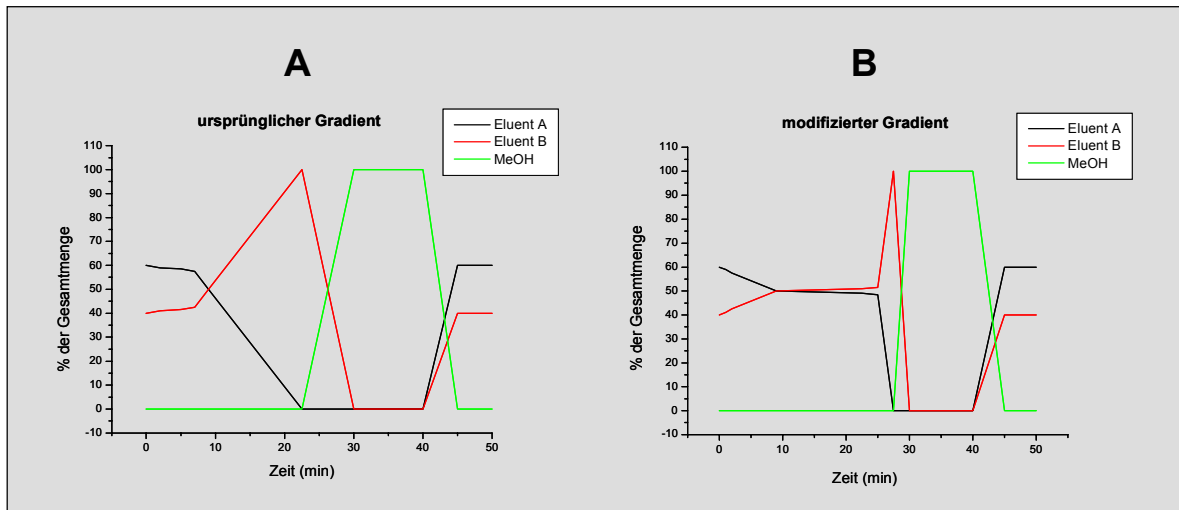


Abb. 25: Änderung des Elutionsgradienten (2). Zur Beseitigung einer Überlagerung des GABA-Peaks musste der ursprüngliche Elutionsgradient (A) geändert werden (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der einzelnen Komponenten am Gesamtvolumen des Mischeluenten über die Zeit. Zum einen wurde der konvexe Teil des Gradienten in den ersten Minuten (Verhältnis Eluent A zu Eluent B von 60:40 auf 50:50) linearisiert, zum anderen der kontinuierliche Übergang von Eluent A/ Eluent B (50:50) nach Eluent B verlängert (von 9-22,5 min auf 9-27,5 min) und in zwei Schritte (50:50 nach 48,5:51,5 in 16 min; 48,5:51,5 nach 0:100 in 2,5 min) aufgeteilt. MeOH: Methanol.

1.3.2 K⁺-stimulierte Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen

Zur Bestimmung der K⁺-stimulierten Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen wurden diese aus frisch präparierten Hippocampi 3 Wochen alter weiblicher Ratten nach einer modifizierten Vorschrift von Kamisaki et al. (1996) isoliert. Die Gesamtmenge an synaptosomalem Protein pro Präparation wurde mit Hilfe der BCA-Methode mit BSA als Standard bestimmt. Sodann wurde die Synaptosomen-Suspension in 100-150 µg Aliquots aufgeteilt. Nach einer 15-minütigen Äquibrierungsphase in artifizierender CSF erfolgte die Stimulation, die nach 3 min durch Zugabe von $\frac{1}{100}$ Vol. 5 mM EGTA gestoppt wurde. Unmittelbar im Anschluß daran wurden die Synaptosomen abzentrifugiert und die Überstände mit den freigesetzten Neurotransmittern abgenommen. Pro Experiment wurden mindestens zwei Überstände zu gleichen Teilen aufgeteilt und in ein Aliquot eine definierte Menge eines Glutamat/GABA-Standards zugegeben, um eine spätere Identifizierung und Mengenbestimmung zu ermöglichen. Daraufhin folgte die Beseitigung interferierender Peptide und Proteine durch Acetonfällung und schließlich die OPA-Derivatisierung mit anschließender chromatographischer Analyse (RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion).

Insgesamt wurden 8 Experimente dieser Art durchgeführt. Wie die Übereinanderlagerung der Chromatogramme eines aufgeteilen Überstandes (s.o.) in Abb. 26 zeigt, konnte von den Synaptosomen freigesetztes Glutamat und GABA detektiert werden.

Die Quantifizierung von Glutamat und GABA erfolgte über die Peakflächen (engl.: *Area under the curve*, AUC). Für jedes Experiment wurde die prozentuale Abweichung (Δ AUC) des AUC-Wertes der K^+ -Stimulation vom Basalwert berechnet (siehe Material & Methoden, Abschnitt 13.3). Für alle 8 Experimente ergaben sich dann folgende Δ AUC-Mittelwerte: Glutamat: $70,143 \pm 11,066$; GABA: $61,778 \pm 3,971$ (Abb. 27).

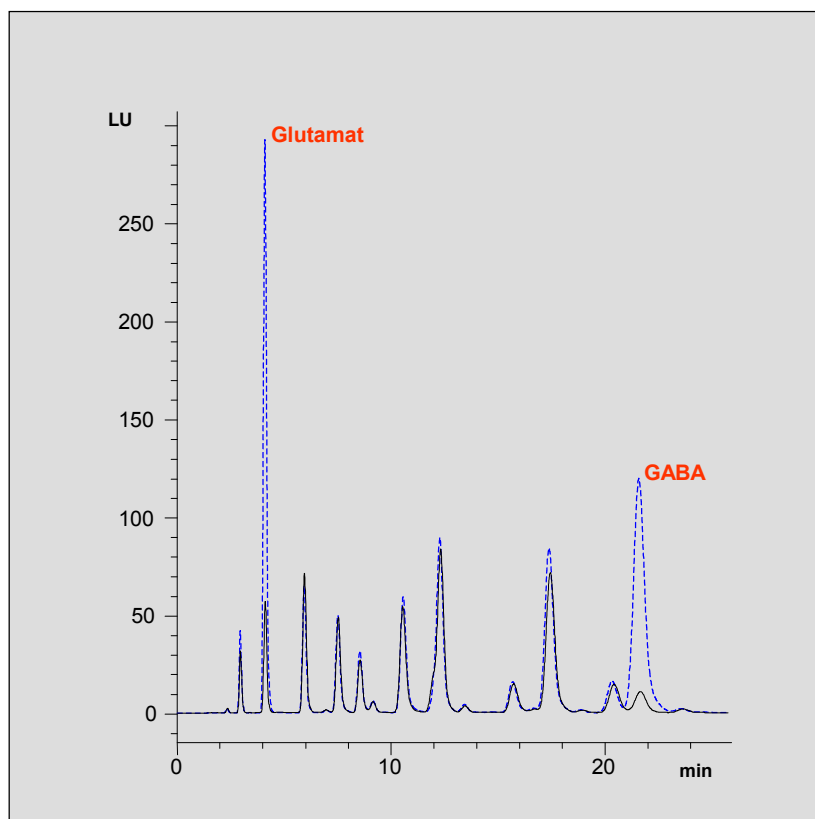


Abb. 26: Identifizierung von freigesetztem Glutamat und GABA aus hippocampalen Synaptosomen. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Synaptosomen durch Zentrifugation pelletiert und die Überstände abgenommen. Durch Aufteilung der Überstände und Zugabe einer definierten Menge (1,5 nmol) eines Glutamat/GABA-Standards in eines der beiden Aliquots konnten die beiden Neurotransmitter nach erfolgter Reinigung, Derivatisierung und HPLC-Analyse der Proben durch Übereinanderlagerung der zugehörigen Chromatogramme identifiziert werden. LU: Light units. — Aliquot ohne zugesetzten Glutamat/GABA-Standard; - - - Aliquot mit zugesetztem Glutamat/GABA-Standard.

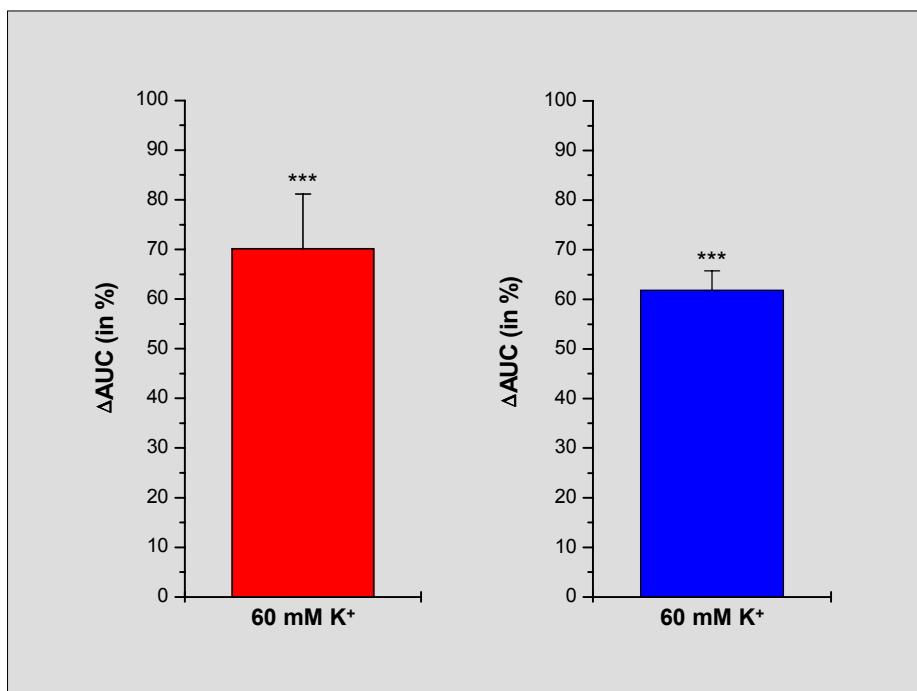


Abb. 27: K⁺-stimulierte Freisetzung von Glutamat und GABA aus hippocampalen Synaptosomen. Synaptosomen (100 µg Aliquots) wurden für 3 min mit artifizierter CSF (basale Freisetzung) sowie 60 mM K⁺ in CSF bei 37 °C stimuliert. Die Quantifizierung von freigesetztem **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** erfolgte über die Peakflächen (AUC), wobei für jedes Experiment die prozentuale Abweichung (ΔAUC) des AUC-Wertes der K⁺-Stimulation vom basalen AUC-Wert berechnet wurde. Die Säulendiagramme zeigen die gemittelten ΔAUC - Werte aus allen Experimenten. **Für beide Neurotransmitter zeigte sich bei K⁺-Stimulation eine signifikant erhöhte Freisetzung im Vergleich zum basalen Level.** AUC: Area under curve; Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Glutamat (rot):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|----------------------|-------------------|--------|--------|---|------------|
| 60 mM K ⁺ | 70,143 | 29,277 | 11,066 | 8 | *** |

GABA (blau):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|----------------------|-------------------|--------|-------|---|------------|
| 60 mM K ⁺ | 61,778 | 11,914 | 3,971 | 8 | *** |

Tabelle zu Abb. 27: ΔAUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

1.3.3 K⁺-stimulierte Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen – Vergleich zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultur

Im Hinblick auf die Kulturbedingungen von hippocampalen Primärkulturzellen (HiPK) boten sich zwei Möglichkeiten: Verwendung serumfreier oder serumhaltiger Kulturmedien. Bei der serumfreien Methode nach Brewer et al. (1993) werden die Zellen in einem speziellen Medium – Neurobasal A/B27 – kultiviert, welches das Überleben neuronaler Zellen fördert, das Wachstum von Gliazellen hingegen auf ca. 0,5 % der Gesamtpopulation begrenzt.

Unter serumhaltigen Bedingungen, typischerweise 10 % Pferde- oder fetales Kälberserum (Higgins & Banker, 1998), wachsen und proliferieren Gliazellen zu einem Monolayer, während das neuronale Wachstum nach und nach gehemmt wird und die Zahl der Neuronen zurückgeht. Das Wachstum der Gliazellen kann durch Zugabe von antimitotischen Substanzen, wie z.B. Cytosin- β -D-arabinofuranosid, zum Medium inhibiert werden. Allerdings geht damit auch eine Schädigung neuronaler DNA einher (Park et al., 1998).

Obwohl sich die Anzeichen für eine aktive Beteiligung von Gliazellen an der Informationsverarbeitung mehren (Ullian et al., 2001; Smit et al., 2001), ist deren Rolle in diesem Zusammenhang weiterhin unklar. Davon abgesehen übernehmen Gliazellen wichtige Funktionen wie elektrische Isolierung durch Myelinisierung (Martini & Schachner, 1997), Bildung der Blut-Hirn-Schranke (Vannucci et al., 1997), Beseitigung toxischer Substanzen (Grewal et al., 1997) und Wachstumsfaktor-Freisetzung (Copelman et al., 2000). Ferner sind sie auch entscheidend an der Wiederaufnahme von Neurotransmittern – insbesondere von Glutamat (Bergles et al., 1999) und GABA (Krogsgaard-Larsen et al., 2000) beteiligt. Es konnte deshalb vermutet werden, dass die Stimulation von Zellen einer serumhaltigen (d.h. an Gliazellen reichen) Primärkultur im Vergleich zu denen einer serumfreien eine geringere Menge an freigesetzten Aminosäuren im Überstand ergibt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden K⁺-Stimulationen an Zellen beider Kulturen durchgeführt.

Die Durchführung der Experimente erfolgte im Prinzip wie bei den Synaptosomen. Die Stimulation der HiPK wurde direkt in den Kulturschalen (24-Well-Platten) durchgeführt. Nach 3 min konnten die Überstände abgenommen und ohne weiteren Zwischenschritt der Acetonfällung und schließlich der Reversed-Phase-HPLC mit Fluoreszenzdetektion zugeführt werden.

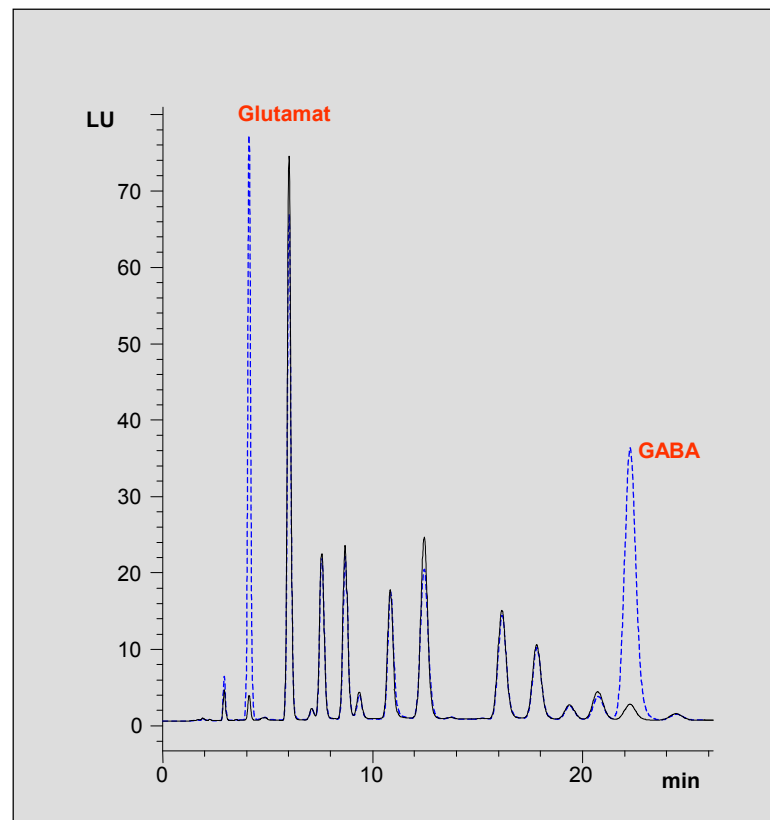


Abb. 28: Identifizierung von freigesetztem Glutamat und GABA aus HiPK. Analog zu den Synaptosomen-Experimenten (vgl. Abb. 26) konnten nach Aufteilung der Überstände, Zugabe von 500 pmol Glutamat/GABA in eines der beiden Aliquots und anschließender chromatographischer Auftrennung die beiden gesuchten Neurotransmitter durch vergleichende Analyse der Chromatogramme identifiziert werden. HiPK: hippocampale Primärkulturzellen; LU: Light units. — Aliquot ohne zugesetzten Glutamat/GABA-Standard; - - - Aliquot mit zugesetztem Glutamat/GABA-Standard.

Wie aus Abb. 28 hervorgeht, zeigten die Chromatogramme der HiPK-Überstände ein ähnliches Aussehen wie die der Synaptosomen. Glutamat und GABA waren eindeutig nachweisbar. Zwischen serumfreier und serumhaltiger Kultur waren dramatische Unterschiede festzustellen. Während die K^+ -Stimulation bei den Zellen der serumhaltigen Kultur nur eine 30%ige (GABA) bzw. 50 %ige (Glutamat) Erhöhung der basalen Freisetzung bewirkte, zeigten die serumfreien HiPK unter den gleichen Bedingungen eine um 150% (GABA) bis 200 % (Glutamat) gesteigerte Freisetzung (Abb. 29). Dies musste auf die Anwesenheit der Gliazellen in den serumhaltigen Kulturen und einer damit verbundenen erhöhten Wiederaufnahme der Neurotransmitter zurückgeführt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen, im weiteren Verlauf nur noch mit Zellen serumfreier Primärkulturen zu arbeiten.

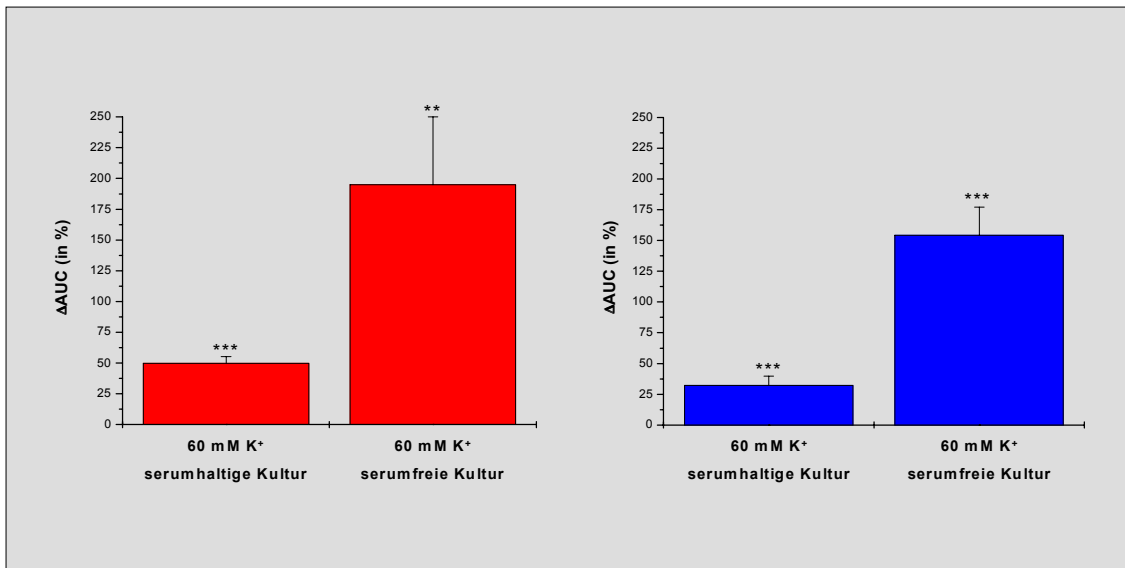


Abb. 29: K⁺-stimulierte Freisetzung von Glutamat und GABA aus serumhaltiger und serumfreier HiPK. Zellen aus serumhaltiger und serumfreier HiPK wurden für 3 min mit artifizieller CSF (basale Freisetzung) sowie 60 mM K⁺ in CSF bei 37 °C stimuliert. Für jedes Experiment wurde die prozentuale Abweichung ΔAUC der AUC-Werte von **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** aus der K⁺-Stimulation von den basalen AUC-Werten bestimmt. Daraus wurde der in den Säulendiagrammen dargestellte mittlere ΔAUC-Wert berechnet. **Während die K⁺-Stimulation bei den Zellen der serumhaltigen Kultur nur eine 30%ige (GABA) bzw. 50 %ige (Glutamat) Erhöhung der basalen Freisetzung bewirkte, zeigten die serumfreien HiPK unter den gleichen Bedingungen eine um 150% (GABA) bis 200 % (Glutamat) gesteigerte Freisetzung.** AUC: Area under curve; HiPK: hippocampale Primärkultur. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Signifikanzangaben in den Säulendiagrammen beziehen sich auf die basale Freisetzung (Basalwert).

Glutamat (rot):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|--------------------------------|-------------------|---------|-------|---|------------|
| 60 mM K ⁺ , Serum + | 49,75 | 15,818 | 5,593 | 8 | *** |
| 60 mM K ⁺ , Serum – | 195 | 145,595 | 55,03 | 8 | ** |

GABA (blau):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|--------------------------------|-------------------|--------|--------|---|------------|
| 60 mM K ⁺ , Serum + | 32,222 | 22,714 | 7,571 | 8 | *** |
| 60 mM K ⁺ , Serum – | 154,333 | 68,347 | 22,782 | 8 | *** |

Tabelle zu Abb. 29: ΔAUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Serum +, Serum –: Serumhaltige bzw. serumfreie Kultur; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

Auch im Vergleich zu den Synaptosomen-Experimenten war die relative Erhöhung der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung durch K^+ bei den Zellen der serumfreien Kultur deutlich höher. Um die absoluten Mengen an freigesetzten Aminosäuren von Synaptosomen und Zellen der serumfreien HiPK miteinander vergleichen zu können, musste die Zellzahl eines Wells (bei Aussat ca. 200.000) in Bezug zu der Menge eines synaptosomalen Aliquots (100-150 μg) gesetzt werden. Dazu wurden die Zellen von 3 Wells vom PLL-beschichteten Boden abgelöst, per Ultraschall lysiert und einer Proteinbestimmung (BCA-Methode) unterzogen. Dabei ergab sich ein zellulärer Proteingehalt von ca. 100 μg pro Well. Da die Experimente in gleicher Weise durchgeführt wurden (gleiche Volumina bei Stimulation, Derivatisierung und HPLC-Analyse), konnten somit die Chromatogramme bzw. die Peakflächen eines HiPK-Wells und eines Synaptosomen –Aliquots direkt verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass die aus den Synaptosomen freigesetzte Menge an Glutamat und GABA (K^+ -Stimulation) deutlich größer war als bei den Primärkulturzellen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Synaptosomen eine Anreicherung isolierter Nervenendigungen darstellen, was eine höhere Freisetzungsrates pro Proteineinheit erwarten lässt. Allerdings verhielten sich Glutamat und GABA nicht proportional: während die freigesetzte Glutamat-Menge bei den Synaptosomen im Vergleich zu den Primärkulturzellen etwa 20 x größer war, konnte für GABA nur eine rund 10 fache Erhöhung festgestellt werden. Dies machte auch ein Vergleich des Ratiowertes $AUC_{\text{Glutamat}}/AUC_{\text{GABA}}$ (Mittelwert aus 5 verschiedenen K^+ -Stimulationen) deutlich, der für die Synaptosomen bei ca. 2,1, für die HiPK hingegen nur bei ca. 1,3 lag.

Fernerhin war zu beobachten, dass die ausgeschütteten Mengen an Aminosäuren bei den HiPK stärker streuten als bei den Synaptosomen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen den Kulturen (Gesamtzellzahl, Anteil der verschiedenen Zelltypen, Zellvitalität, etc.) wesentlich größer waren als zwischen den einzelnen Synaptosomen-Präparationen, bei denen vor jedem Experiment eine Proteinbestimmung zum Ziele der einheitlichen Aliquotierung erfolgte.

Mit Hilfe der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurde somit ein Testsystem entwickelt, das es ermöglichte, die Freisetzung der Neurotransmitter Glutamat und GABA aus zwei verschiedenen hippocampalen *in vitro*-Modellen – Synaptosomen und Primärkulturzellen – qualitativ und quantitativ nachzuweisen (Abb. 30). Die Etablierung dieses Testsystems war Voraussetzung für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen, die sich mit der Frage nach dem Einfluss nikotinischer Agonisten und Antagonisten auf die basale Freisetzung von Glutamat und GABA beschäftigten. Aufgrund der deutlicheren Unterschiede zwischen basaler und K^+ -stimulierter Freisetzung sowie der Tatsache, dass HiPK im Vergleich zu Synaptosomen das ‚realitätsnähere‘ *in vitro*-Modell

darstellen (siehe Diskussion 1.2), wurden diese Untersuchungen ausschließlich mit serumfreien HiPK durchgeführt.

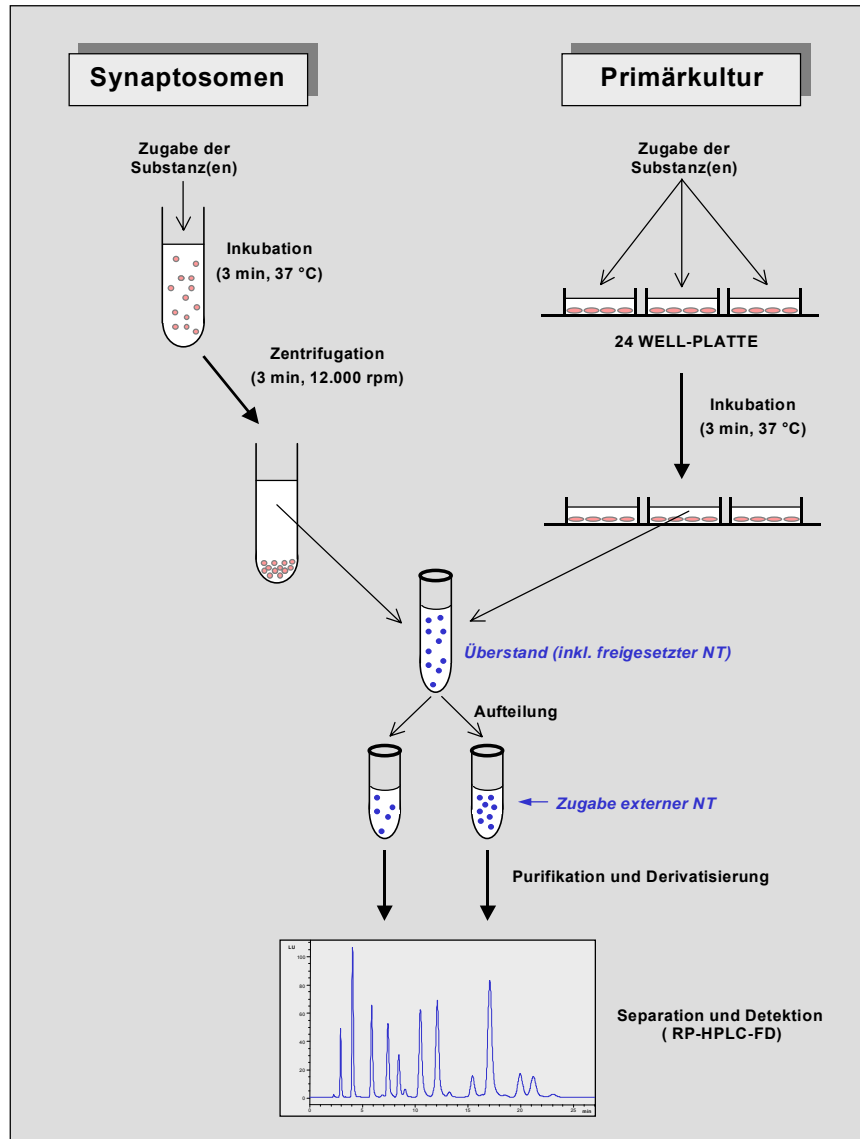


Abb. 30: Übersichtsschema des etablierten Testsystems. Ausgangspunkt sind zwei verschiedene hippocampale in vitro-Modelle – Synaptosomen und Primärkultur (HiPK). Die frisch präparierten Synaptosomen werden in Aliquots mit 100-150 µg Protein aufgeteilt und für 3 min bei 37°C entsprechend stimuliert. Anschließend werden die Synaptosomen durch Zentrifugation pelletiert und die Überstände abgenommen. Im Falle der HiPK wird die Stimulation nach 14 Tagen in Kultur direkt in den 24-Well-Platten (Zellzahl ca. 200.000/Well) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der Überstände erfolgt für Synaptosomen und HiPK in gleicher Weise. Nach Aufteilung und Zugabe definierter Mengen der gewünschten Neurotransmitter in ein Aliquot werden interferierende Proteine mittels Acetonfällung beseitigt. Schließlich werden die gereinigten Überstände mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert und durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion aufgetrennt und detektiert. NT: Neurotransmitter; RP-HPLC-FD: Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion.

2 Modulation der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen durch nikotinische (Ant-) Agonisten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte in mehreren elektrophysiologischen Experimenten (McGehee et al., 1995; Gray et al., 1996; Alkondon et al., 1997; Radcliffe et al., 1998, 1999) an einzelnen Zellen von Primärkulturen und Gewebeschnitten des Hippocampus eine Steigerung der basalen Glutamat- und GABA-Neurotransmission durch Nikotin nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des hier etablierten Testsystems sollte zunächst untersucht werden, ob die durch Nikotin induzierte Erhöhung der glutamatergen EPSCs und GABAergen IPSCs tatsächlich mit einer vermehrten Freisetzung der beiden Neurotransmitter einhergeht und ob ein solcher Effekt auch auf dem Vielzellniveau zu beobachten ist. Darüber hinaus sollte die Wirkung des Pflanzenalkaloids Galanthamin auf die basale sowie die nikotinmodulierte Glutamat- und GABA-Freisetzung untersucht werden. Galanthamin gehört zu einer neuen Gruppe von Substanzen, die als ‚allosterisch potenzierende Liganden‘ (engl.: *allosterically potentiating ligands*, APL) an nikotinschen Rezeptoren wirken, alleine aber keine signifikante Antwort hervorrufen (Pereira et al., 1993; Schrattenholz et al., 1996).

Bei der Wahl der einzusetzenden Konzentrationen wurde auf elektrophysiologische Daten in der Literatur zurückgegriffen: Für nikotinische Ströme des Typs IA, der bei weitem häufigsten Antwort hippocampaler Neuronen auf nikotinische Agonisten (Albuquerque et al., 1997), liegt der Wirkungsbereich von Nikotin zwischen 1 μM und 1mM mit einem EC_{50} -Wert von 27 μM (ibid.). Es wurde daher eine Konzentration von 100 μM als geeignet erachtet. Für Galanthamin wurde eine Konzentration von 1 μM gewählt. Mit dieser Konzentration konnte in hippocampalen Primärkulturzellen (HiPK) eine Potenzierung nikotinischer Ströme des Typ IA gezeigt werden (Schrattenholz et al., 1996).

2.1 Modulation durch Nikotin und Galanthamin – Vorversuche

Im ersten Schritt wurde eine Serie von Experimenten mit serumfreien HiPK nach dem gleichen Muster wie die Depolarisierungsstudien in 1.3 durchgeführt. Pro Experiment – in der Regel 18-24 Wells mit ca. 200.000 Zellen/Well – wurden für jede Bedingung (reine artifizielle CSF, 100 μM Nikotin in CSF, 1 μM Galanthamin in CSF und 100 μM Nikotin/1 μM Galanthamin in CSF) 3 Stimulationen durchgeführt. Als Kontrolle wurden darüber hinaus einige Wells mit 60 mM K^+ in CSF stimuliert. Nach der chromatographischen Analyse wurden für jede Bedingung die Peakflächen-Mittelwerte von Glutamat und GABA sowie ΔAUC (prozentuale Abweichung vom basalen AUC-Wert) berechnet. Aus den ΔAUC -Werten aller Experimente wurde schließlich der mittlere ΔAUC -Wert für jede Bedingung berechnet.

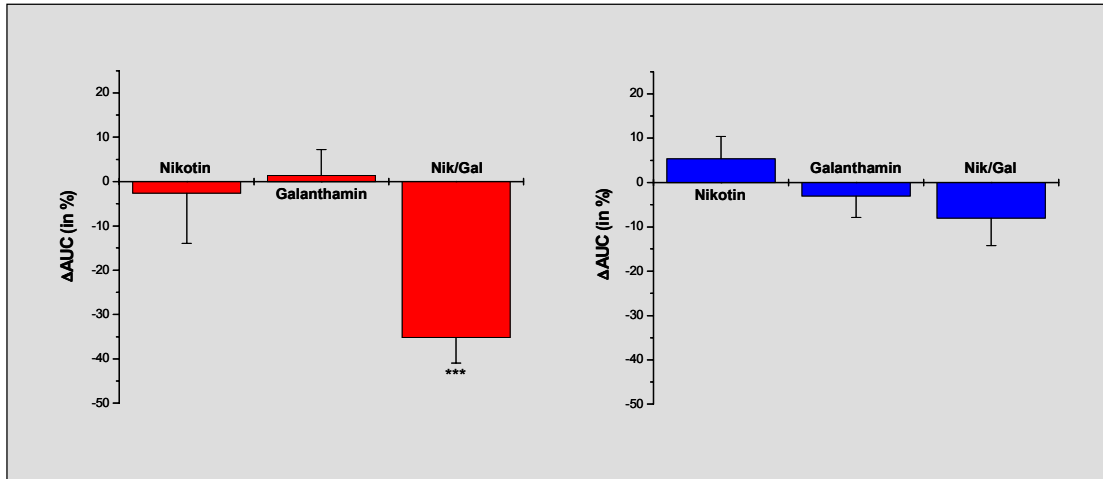


Abb. 31: Einfluss von Nikotin und Galanthamin auf die basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK. Zellen 14 Tage alter serumfreier HiPK wurden für 3 min mit 100 μM Nikotin, 1 μM Galanthamin oder beiden Agonisten zugleich bei 37 °C stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen in gleicher Weise mit reiner artifizieller CSF (basale Freisetzung) inkubiert. Analog zu den K⁺-Stimulationen in 1.3.2 und 1.3.3 erfolgte die Quantifizierung von freigesetztem **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** über die Peakflächen (AUC), wobei in jedem Experiment die prozentuale Abweichung (ΔAUC) vom Basalwert für die untersuchten Agonisten berechnet wurde. Die Säulendiagramme zeigen die gemittelten ΔAUC-Werte aus allen Experimenten. **Stimulation mit Nikotin führte sowohl zu einer Erhöhung als auch zu einer Verringerung der basalen Glutamat-Freisetzung, sodass sich insgesamt keine signifikante Veränderung ergab. Galanthamin hatte keinen Einfluss auf die basale Glutamat-Freisetzung, während die Koapplikation von Nikotin und Galanthamin eine deutliche Verringerung verursachte. Die basale GABA-Freisetzung wurde durch keine der beiden Substanzen, weder alleine noch durch Koapplikation, signifikant beeinflusst.** AUC: Area under curve. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Signifikanzangaben in den Säulendiagrammen beziehen sich auf die basale Freisetzung (Basalwert).

Glutamat (rot):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|---------------------|-------------------|--------|-------|---|------------|
| 100 μM Nikotin | -2,571 | 30,054 | 11,36 | 6 | ns |
| 1 μM Galanthamin | 1,4 | 12,915 | 5,776 | 6 | ns |
| 100 μM Nik/1 μM Gal | -35,167 | 14,289 | 5,833 | 6 | ** |

GABA (blau):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|---------------------|-------------------|--------|-------|---|------------|
| 100 μM Nikotin | 5,333 | 12,372 | 5,051 | 6 | ns |
| 1 μM Galanthamin | -3 | 11,95 | 4,879 | 6 | ns |
| 100 μM Nik/1 μM Gal | -8 | 16,442 | 6,214 | 6 | ns |

Tabelle zu Abb. 31: ΔAUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; ns: nicht signifikant; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

Die Ergebnisse von insgesamt 6 Experimenten sind in Abb. 31 zusammengefasst: 100 μM Nikotin und/oder 1 μM Galanthamin hatten keinen signifikanten Einfluss auf die basale GABA-Freisetzung. Galanthamin alleine änderte die basale Glutamat-Freisetzung nicht, während die Stimulation mit Nikotin und Galanthamin zusammen eine deutliche Verringerung (ca. 35 %) ergab. Die Ergebnisse der alleinigen Nikotin-Stimulierung zeigten bezüglich der Glutamat-Freisetzung ein uneinheitliches Bild: Während die 3-minütige Stimulation mit 100 μM Nikotin in einem Teil der Experimente eine Erhöhung der basalen Freisetzung bewirkte, war im übrigen Teil eine negative Modulation zu beobachten. Insgesamt ergab sich daher keine signifikante Änderung der basalen Glutamat-Freisetzung.

Nach Beendigung der Vorversuche konnte wie folgt zusammengefasst werden:

- Nikotin alleine verursachte überwiegend, in Anwesenheit von Galanthamin ausnahmslos eine signifikante Verringerung der basalen Glutamat-Freisetzung; Stimulation mit Galanthamin zeigte keinen Effekt.
- Weder Nikotin und Galanthamin noch deren Koapplikation führten zu einer signifikanten Änderung der basalen GABA-Freisetzung.

Diese ersten Ergebnisse machten deutlich, dass zur Bearbeitung der obigen Fragestellungen Änderungen innerhalb der Versuchsbedingungen nötig waren. Aus folgenden Gründen wurde dabei die Stimulationsdauer als entscheidender Parameter angesehen:

Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 4.2) erwähnt, erfolgt die Modulation der hippocampalen glutamatergen und GABAergen Neurotransmission durch das cholinerge System größtenteils über $\alpha 7$ -nAChR. Ein typisches Merkmal dieser Rezeptoren ist die äußerst kurze Öffnungszeit aufgrund schneller Desensibilisierung (Castro & Albuquerque, 1993; Zhang et al., 1994). Daher ist zu erwarten, dass der größte Teil dieser Rezeptoren schon nach kurzer Zeit nicht mehr aktiv ist und während der restlichen Zeit die mögliche Mehrausschüttung von Glutamat und GABA aus der Anfangsphase durch Wiederaufnahme-Prozesse beseitigt wird. Das Phänomen der Wiederaufnahme von Neurotransmittern trifft im besonderen Maße auf die hier durchgeführten, sog. ‚batch incubations‘ zu, da die Stimulationslösung während der gesamten Versuchsdauer auf den Zellen liegt und folglich Stimulanzen sowie freigesetzte Substanzen akkumulieren. Dies könnte auch erklären, warum Nikotin teilweise und Nikotin mit Galanthamin ausschließlich eine Verringerung der basalen Glutamat-Ausschüttung bewirkten. Unter der Annahme, dass an den präsynaptischen $\alpha 7$ -nAChR auch eine gewisse basale Aktivität herrscht, würde eine vollständige Desensibilisierung der Rezeptoren eine ‚ungehinderte‘ Wiederaufnahme und damit eine insgesamt geringere Glutamat-Menge im Überstand zur Folge haben.

Infolgedessen wurde die Stimulationsdauer in den Folgeversuchen deutlich verkürzt. Da die Experimente manuell durchgeführt wurden, waren Stimulationszeiten < 30 sec nicht reproduzierbar durchzuführen. Es wurde daher eine Stimulationsdauer von 30 sec gewählt.

2.2 Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin- und Galanthamin-modulierte Freisetzung von Glutamat und GABA

Zusätzlich zu der Verkürzung der Stimulationsdauer wurde noch eine weitere Veränderung in der Versuchsdurchführung vorgenommen: Entgegen der bisherigen Strategie, mehrere Bedingungen innerhalb eines Experimentes zu untersuchen, wurde pro Experiment nur noch eine Bedingung gegen die Kontrolle (basale Ausschüttung) getestet. Dies hatte den Vorteil, dass in einem Experiment für eine Substanz (-kombination) eine statistisch ausreichende Zahl an Ergebnissen erzielt werden konnte, um signifikante Aussagen zu erhalten.

In den folgenden Experimenten wurde neben der Stimulation für 30 sec auch noch einmal die lange, dreiminütige durchgeführt, um einen direkten Vergleich unter identischen Bedingungen zu haben und um zu überprüfen, inwieweit die Vorversuche verlässliche Ergebnisse geliefert hatten.

Wie aus Abbildung 32 hervorgeht, ergab die Stimulation mit 100 μ M Nikotin für 30 sec eine signifikante Steigerung von ca. 30 % gegenüber der basalen Glutamat-Freisetzung, während die 3-minütige Applikation erneut keine nennenswerte Veränderung verursachte. Das gleiche Ergebnis zeigte sich für GABA, wobei hier nach 30 sec sogar eine 40 %ige Erhöhung der basalen Freisetzung festgestellt werden konnte.

Die alleinige Stimulation mit 1 μ M Galanthamin beeinflusste, unabhängig von der Stimulationsdauer, weder die basale Glutamat- noch die basale GABA-Freisetzung (Abb. 33).

Bei Koapplikation von Nikotin und Galanthamin wurde die Freisetzung von Glutamat und GABA in unterschiedlichem Maße moduliert (siehe Abb. 34): 30 sec Stimulation steigerten die basale Glutamat-Freisetzung im Vergleich zur alleinigen Nikotin-Stimulation um weitere 15 % auf insgesamt rund 45 %. Im Falle des inhibitorischen Neurotransmitters GABA dagegen wurde eine signifikante Verringerung des basalen Levels festgestellt. Bei 3-minütiger Stimulation wurde wie schon in den Vorversuchen eine signifikante Verringerung der Glutamat-Ausschüttung beobachtet, während sich für GABA keine Änderung ergab.

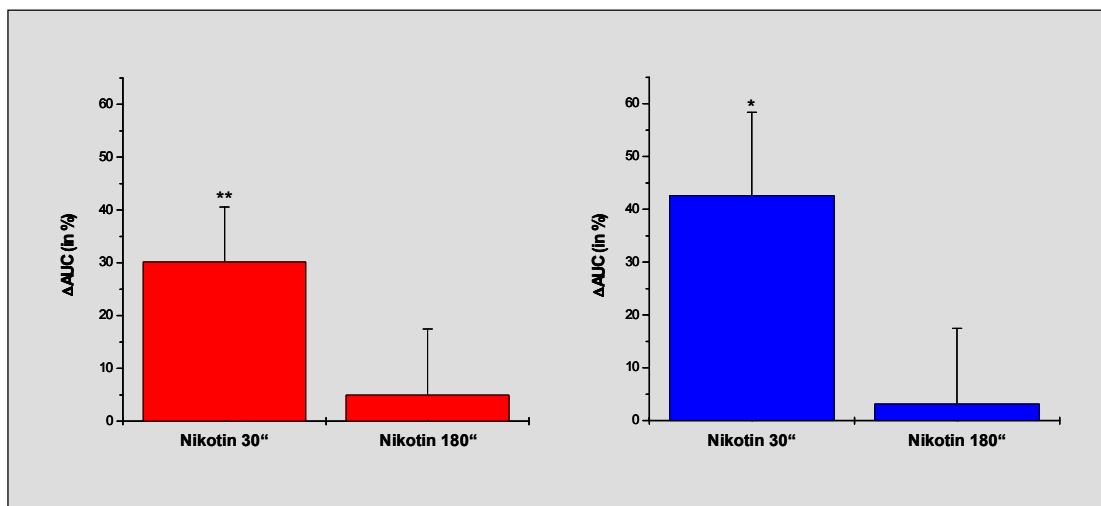


Abb. 32: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK. Zellen 14 Tage alter serumfreier HiPK wurden für 30 bzw. 180 sec (3 min) mit 100 µM Nikotin bei 37 °C stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen in gleicher Weise mit reiner artifiziereller CSF (basale Freisetzung) inkubiert. Die Quantifizierung von freigesetztem **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** erfolgte über die Peakflächen (AUC). Die Säulendiagramme zeigen die prozentuale Abweichung (ΔAUC) der gemittelten AUC-Werte aus den Nikotin-Stimulationen von den entsprechenden Basalwerten. **Bei 30-sekündiger Stimulation konnte Nikotin die basale-Freisetzung sowohl von Glutamat als auch von GABA signifikant erhöhen, während nach einer Stimulationsdauer von 3 min kein nenneswerter Effekt zu sehen war.** Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Signifikanzangaben in den Säulendiagrammen beziehen sich auf die basale Freisetzung (Basalwert).

Glutamat (rot):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|---------------------|-------------------|--------|--------|----|------------|
| 100 µM Nikotin 30" | 30,17613 | 34,522 | 10,409 | 11 | ** |
| 100 µM Nikotin 180" | 4,92041 | 27,973 | 12,51 | 5 | ns |

GABA (blau):

| Stimulus | ΔAUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|---------------------|-------------------|--------|--------|----|------------|
| 100 µM Nikotin 30" | 42,569 | 52,532 | 15,839 | 11 | * |
| 100 µM Nikotin 180" | 3,099 | 32,085 | 14,349 | 5 | ns |

Tabelle zu Abb. 32: ΔAUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; ns: nicht signifikant; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

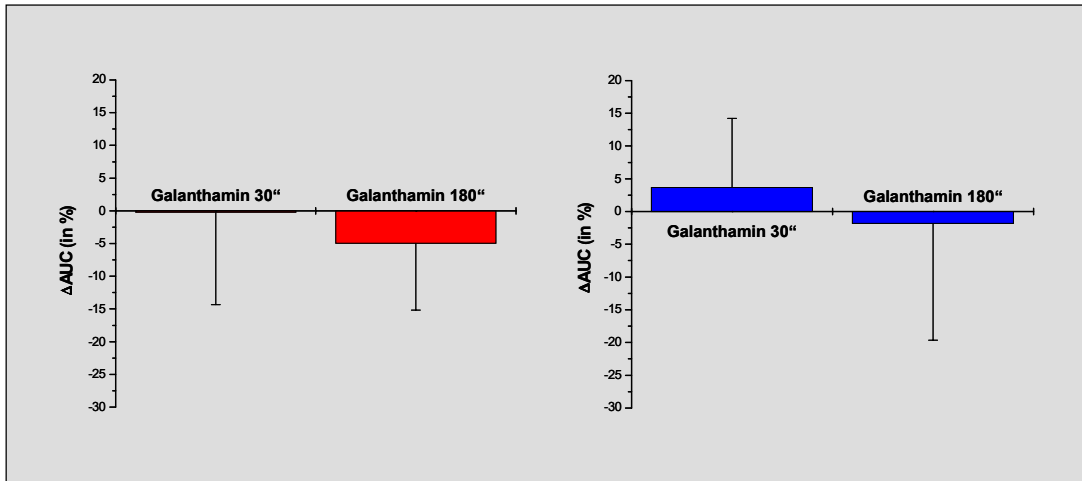


Abb. 33: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Galanthamin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK. Zellen 14 Tage alter serumfreier HiPK wurden für 30 bzw. 180 sec (3 min) mit 1 μ M Galanthamin bei 37 °C stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen in gleicher Weise mit reiner artifizieller CSF (basale Freisetzung) inkubiert. Die Quantifizierung von freigesetztem **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** erfolgte über die Peakflächen (AUC). Die Säulendiagramme zeigen die prozentuale Abweichung (Δ AUC) der gemittelten AUC-Werte aus den Galanthamin-Stimulationen von den entsprechenden Basalwerten. Daraus geht hervor, dass **Galanthamin – unabhängig von der Stimulationsdauer – keinen Einfluss auf die basale Glutamat- und GABA-Freisetzung hat.** Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Signifikanzangaben in den Säulendiagrammen beziehen sich auf die basale Freisetzung (Basalwert).

Glutamat (rot):

| Stimulus | Δ AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|----------------------------|---------------------------|--------|--------|---|------------|
| 1 μ M Galanthamin 30" | -0,211 | 34,572 | 14,114 | 6 | ns |
| 1 μ M Galanthamin 180" | -4,929 | 25,08 | 10,239 | 6 | ns |

GABA (blau):

| Stimulus | Δ AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|----------------------------|---------------------------|--------|--------|---|------------|
| 1 μ M Galanthamin 30" | 3,667 | 25,898 | 10,573 | 6 | ns |
| 1 μ M Galanthamin 180" | -1,806 | 43,738 | 17,856 | 6 | ns |

Tabelle zu Abb. 33: Δ AUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; ns: nicht signifikant; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

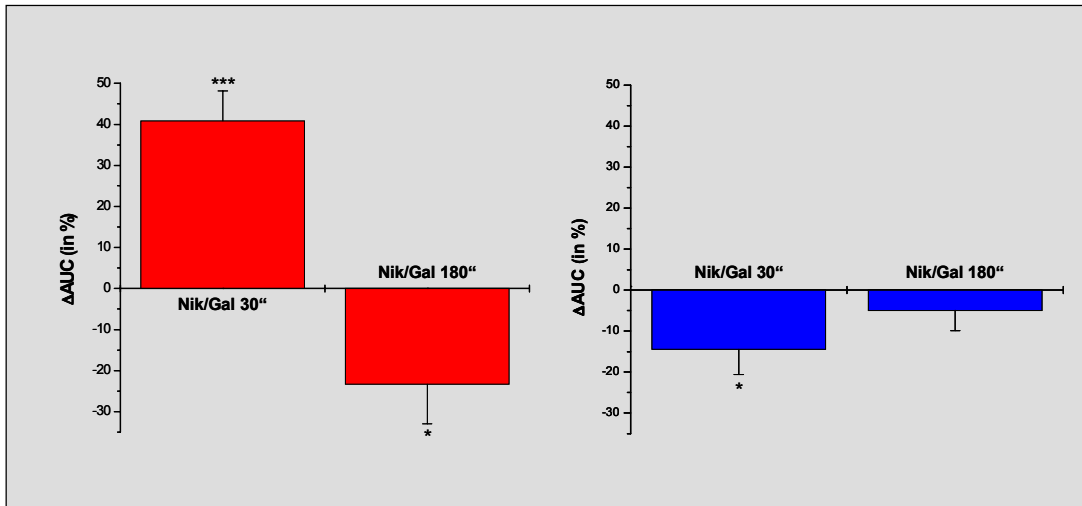


Abb. 34: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin/Galanthamin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK. Zellen 14 Tage alter serumfreier HiPK wurden für 30 bzw. 180 sec (3 min) mit 100 μ M Nikotin/1 μ M Galanthamin bei 37 °C stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen in gleicher Weise mit reiner artifizieller CSF (basale Freisetzung) inkubiert. Die Quantifizierung von freigesetztem **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** erfolgte über die Peakflächen (AUC). Die Säulendiagramme zeigen die prozentuale Abweichung (Δ AUC) der gemittelten AUC-Werte aus den Nikotin/Galanthamin-Stimulationen von den entsprechenden Basalwerten. **Bei 30-sekündiger Stimulation konnte die basale Glutamat-Freisetzung durch Koapplikation von Nikotin und Galanthamin signifikant erhöht werden, wohingegen eine 3-minütige Stimulation eine signifikante Verringerung bewirkte. Die basale GABA-Freisetzung wurde durch 30-sekündige Stimulation mit Nikotin/Galanthamin signifikant verringert, eine 3-minütige Stimulation zeigte keinen nennenswerten Effekt.** Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Signifikanzangaben in den Säulendiagrammen beziehen sich auf die basale Freisetzung (Basalwert).

Glutamat (rot):

| Stimulus | Δ AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|------------------------------------|---------------------------|-------|-------|----|------------|
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal 30" | 40,816 | 31,26 | 7,368 | 18 | *** |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal 180" | -23,284 | 21,6 | 9,658 | 5 | * |

GABA (blau):

| Stimulus | Δ AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|------------------------------------|---------------------------|--------|-------|----|------------|
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal 30" | -14,379 | 26,474 | 6,24 | 18 | * |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal 180" | -4,924 | 11,084 | 4,957 | 5 | ns |

Tabelle zu Abb. 34: Δ AUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; ns: nicht signifikant; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse fiel auf, dass die AUC-Werte der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung in allen Experimenten unabhängig von der Stimulationsdauer sehr einheitlich waren. Dies deutete zum einen auf vergleichbare Versuchsbedingungen hin, die auf die geänderte Strategie – Variation einer Versuchsbedingung mit vielen Wiederholungen pro Experiment – sowie auf die erhöhte Reproduzierbarkeit in der Zellkultur zurückzuführen war. Zum anderen aber verdeutlichte dies, dass die basale Freisetzung unter Versuchsbedingungen, die die Wiederaufnahme von Neurotransmittern erlauben, im Gegensatz zur induzierten/stimulierten ein zeitunabhängiges Gleichgewicht zwischen Freisetzung und Wiederaufnahme darstellt.

2.3 Einfluss des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methylycaconitin

Um zu überprüfen, ob und in welchem Maße die Modulation der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung aus HiPK durch Nikotin bzw. Nikotin/Galanthamin über nikotinische Rezeptoren des $\alpha 7$ -Typs vermittelt wird, wurden Experimente mit dem $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methylycaconitin (MLA; Alkondon et al., 1992) durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit Nikotin (100 μM) und Nikotin/Galanthamin (100/1 μM) in Anwesenheit von 1 μM MLA (Alkondon et al., 1997) für 30 sec stimuliert. Galanthamin als Einzelstimulans wurde aufgrund der Tatsache, dass es in allen bisherigen Experimenten keine nennenswerte Wirkung zeigte, nicht berücksichtigt.

Abb. 35 zeigt die erhaltenen Ergebnisse: 100 μM Nikotin konnten wie schon in 2.2 eine ca. 30 %ige Steigerung der basalen Glutamat-Freisetzung bewirken, die durch Galanthamin signifikant verstärkt wurde. In Anwesenheit von MLA wurden die Effekte von Nikotin und Nikotin/Galanthamin vollständig blockiert. Auch für GABA konnten die Ergebnisse aus 2.2 wiederholt werden. Hier allerdings vermochte MLA die Wirkung von Nikotin und Nikotin/Galanthamin nur teilweise (ca. 50 %) zu hemmen (vgl. hierzu auch die statistischen Daten im Anhang, S. 112 f.).

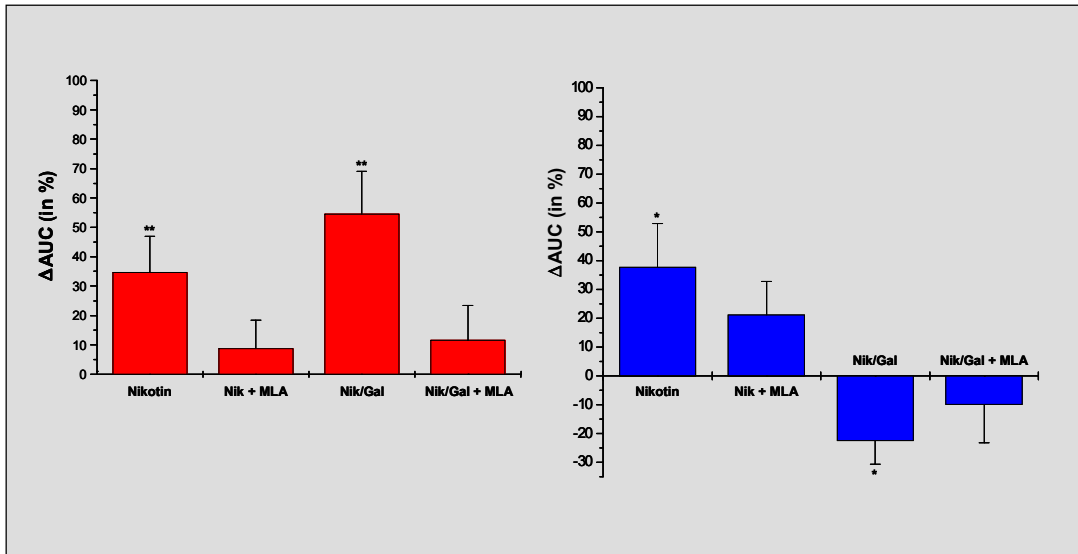


Abb. 35: Einfluss des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin (MLA) auf die Nikotin- und Nikotin/Galanthamin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK. Zellen 14 Tage alter serumfreier HiPK wurden für 30 sec mit 100 μ M Nikotin bzw. 100 μ M Nikotin/1 μ M Galanthamin alleine und in Anwesenheit von 1 μ M Methyllycaconitin (MLA) bei 37 °C stimuliert. Zur Bestimmung der basalen Freisetzung wurden Zellen für 30 sec mit reiner artifizieller CSF inkubiert. Die Quantifizierung von freigesetztem **Glutamat (rot)** und **GABA (blau)** erfolgte über die Peakflächen (AUC). Die Säulendiagramme zeigen die prozentuale Abweichung (Δ AUC) der gemittelten AUC-Werte aus den Stimulationen von den entsprechenden Basalwerten. Während MLA die Steigerung der basalen Glutamat-Freisetzung durch Nikotin und Nikotin/Galanthamin vollständig blockierte, konnte die Wirkung der nikotinischen Agonisten auf die basale GABA-Freisetzung nur teilweise gehemmt werden. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Signifikanzangaben in den Säulendiagrammen beziehen sich auf die basale Freisetzung (Basalwert).

Glutamat (rot):

| Stimulus | Δ AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|---|---------------------------|--------|--------|---|------------|
| 100 μ M Nikotin | 34,598 | 24,72 | 12,36 | 4 | ** |
| 100 μ M Nik + 1 μ M MLA | 8,631 | 19,562 | 9,781 | 4 | ns |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal | 54,39 | 29,354 | 14,677 | 4 | ** |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal + 1 μ M MLA | 11,533 | 23,782 | 11,891 | 4 | ns |

GABA (blau):

| Stimulus | Δ AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig. |
|---|---------------------------|--------|--------|---|------------|
| 100 μ M Nikotin | 37,663 | 30,43 | 15,215 | 4 | * |
| 100 μ M Nik + 1 μ M MLA | 21,051 | 23,596 | 11,798 | 4 | ns |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal | -22,467 | 16,442 | 8,221 | 4 | * |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal + 1 μ M MLA | -9,886 | 26,492 | 13,246 | 4 | ns |

Tabelle zu Abb. 35: Δ AUC: prozentuale Abweichung des AUC-Wertes vom Basalwert; n: Anzahl der Experimente; ns: nicht signifikant; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz des Unterschiedes zum Basalwert (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0,05). Zusätzliche Statistik siehe Anhang.

| ΔAUC-Werte für Glutamat-Freisetzung aus HiPK | | | |
|--|----------------------|----------------------|-------------------------|
| Stimulus | 180 sec (2.1) | 180 sec (2.2) | 30 sec (2.2/2.3) |
| 100 μM Nikotin | -2,57 | 4,92 | 32,39 |
| 100 μM Nikotin + 1 μM MLA | -- | -- | 8,63 |
| 1 μM Galanthamin | 1,4 | -4,93 | -0,21 |
| 100 μM Nik/1 μM Gal | -35,17 | -23,28 | 47,6 |
| 100 μM Nik/1 μM Gal + 1 μM MLA | -- | -- | 11,53 |
| ΔAUC-Werte für GABA-Freisetzung aus HiPK | | | |
| Stimulus | 180 sec (2.1) | 180 sec (2.2) | 30 sec (2.2/2.3) |
| 100 μM Nikotin | 5,33 | 3,1 | 40,11 |
| 100 μM Nikotin + 1 μM MLA | -- | -- | 21,05 |
| 1 μM Galanthamin | -3 | -1,81 | 3,67 |
| 100 μM Nik/1 μM Gal | -8 | -4,92 | -18,42 |
| 100 μM Nik/1 μM Gal + 1 μM MLA | -- | -- | -9,89 |

Tabelle 5: Vergleich der ΔAUC-Werte aus den Experimenten 2.1 - 2.3. Dargestellt sind zum einen die ΔAUC-Werte (prozentuale Abweichung vom Basalwert) der 3-minütigen Stimulationen mit Nikotin, Galanthamin und Nikotin/Galanthamin aus den Vorversuchen (2.1) und den ‚Hauptversuchen‘ (2.2). Die ΔAUC-Werte der 30 sekundigen Stimulationen mit den nikotinischen Agonisten stellen die gemittelten Werte aus den Experimenten der Abschnitte 2.2 und 2.3 dar, die Werte für Nikotin + MLA und Nikotin/Galanthamin + MLA entsprechen den in Abschnitt 2.3 berechneten ΔAUC-Werten. MLA: Methyllycaconitin. Zum Basalwert signifikant unterschiedliche Werte (unabhängiger T-Test, zwei Populationen; Signifikanzebene 0, 05) sind fett gedruckt.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Abschnitte 2.1 bis 2.3 in Form eines Vergleichs der ΔAUC-Werte zusammengefasst. Dabei sollen folgende Punkte noch einmal hervorgehoben werden:

- 1.) **Die Ergebnisse aus den Vorversuchen** (2.1: Viele Bedingungen pro Experiment, wenige Wiederholungen) **zeigen gute Übereinstimmung mit denen aus den ‚Hauptversuchen‘** (2.2: Wenige Bedingungen pro Experiment, viele Wiederholungen).
- 2.) **Der Zeitfaktor ist von großer Bedeutung für die Modulation der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung durch nikotinische Agonisten:** Bei 3-minütiger Stimulation sind im Gegensatz zur 30-sekündigen kaum Änderungen der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung zu finden.
- 3.) **Bei einer Stimulationsdauer von 30 sec erhöht Nikotin sowohl die basale Glutamat- als auch die basale GABA-Freisetzung.**
- 4.) **Galanthamin hat bei einer Stimulationsdauer von 30 sec unterschiedliche Wirkungen auf die Nikotin-modulierte basale Glutamat- und GABA-Freisetzung:**

Bezüglich der Glutamat-Freisetzung hat Galanthamin einen verstärkenden Effekt, während die durch Nikotin erhöhte GABA-Freisetzung dagegen unter den basalen Level verringert wird.

- 5.) **Methyllycaconitin hat unterschiedliche inhibitorische Wirkungen auf die Nikotin- und Nikotin/Galanthamin-modulierte basale Glutamat- und GABA-Freisetzung:** Der Effekt von Nikotin und Nikotin/Galanthamin auf die Glutamat-Freisetzung wird vollständig blockiert, der auf die GABA-Freisetzung nur teilweise (nicht signifikant).

In Tabelle 6 sind für die 30-sekündigen Stimulationen aus den Experimenten in 2.2 und 2.3 die tatsächlich ausgeschütteten Mengen an Glutamat und GABA für die einzelnen Bedingungen berechnet.

| Glutamat-Freisetzung (in pmol / 30 sec / 200.000 Zellen) | |
|--|--------------|
| CSF (Basal) | 9,55 ± 0,30 |
| CSF + 100 µM Nikotin | 12,67 ± 0,52 |
| CSF + 100 µM Nikotin + 1 µM MLA | 10,61 ± 0,37 |
| CSF + 1 µM Galanthamin | 10,45 ± 0,60 |
| CSF + 100 µM Nik/1 µM Gal | 14,23 ± 0,39 |
| CSF + 100 µM Nik/1 µM Gal + 1 µM MLA | 10,89 ± 0,73 |
| GABA-Freisetzung (in pmol / 30 sec / 200.000 Zellen) | |
| CSF (Basal) | 3,36 ± 0,13 |
| CSF + 100 µM Nikotin | 4,75 ± 0,36 |
| CSF + 100 µM Nikotin + 1 µM MLA | 4,28 ± 0,24 |
| CSF + 1 µM Galanthamin | 3,37 ± 0,23 |
| CSF + 100 µM Nik/1 µM Gal | 2,77 ± 0,10 |
| CSF + 100 µM Nik/1 µM Gal + 1 µM MLA | 3,18 ± 0,39 |

Tabelle 6: Freigesetzte Mengen an Glutamat und GABA aus HiPK (Stimulationsdauer 30 sec). Um die tatsächlich freigesetzten Mengen an Glutamat und GABA bestimmen zu können, musste eine direkte Beziehung zwischen Peakfläche und Menge hergestellt werden. Dies geschah mit Hilfe der Standardadditionsmethode. Dazu wurden pro Experiment einige Überstände in zwei gleiche Teile aufgeteilt und in eines der beiden Aliquots 500 pmol eines Glutamat/GABA-Standards hinzugegeben. Nach erfolgter HPLC-Analyse wurden die Flächen der Glutamat- und GABA-Peaks aus den Aliquots eines Überstandes miteinander verglichen, wobei die Differenz der zugesetzten Menge (500 pmol) entsprach. Folgende Beziehungen wurden auf diesem Wege erhalten: **Glutamat: 6,88 AUC-Einheiten = 1 pmol; GABA: 17,33 AUC-Einheiten = 1 pmol.** Die in der Tabelle aufgeführten Mengen entsprechen den mittleren AUC-Werten (inkl. sem) für die einzelnen Bedingungen aus den Experimenten in 2.2 und 2.3, hochgerechnet auf ein Well (~200.000 Zellen) einer 24-Well-Platte. CSF: artifizelle cerebrospinale Flüssigkeit; MLA: Methyllycaconitin; sem: Standardfehler des Mittelwertes.

3 Glutamat-Potenzierung in hippocampalen Primärkulturzellen – Einfluss auf die GABA-Freisetzung

Wie in der Einleitung (Abschnitt 3) bereits näher ausgeführt, konnte in elektrophysiologischen Experimenten an hippocampalen Gewebeschnitten gezeigt werden, dass die Glutamat-vermittelte Langzeitpotenzierung (LTP) unter anderem durch eine reduzierte GABAerge Inhibition gekennzeichnet ist (Revest & Longstaff, 1998). Mit dem in dieser Arbeit etablierten Testsystem sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit unter potenzierenden Bedingungen Veränderungen in der aus hippocampalen Primärkulturzellen (HiPK) freigesetzten GABA-Menge zu beobachten sind.

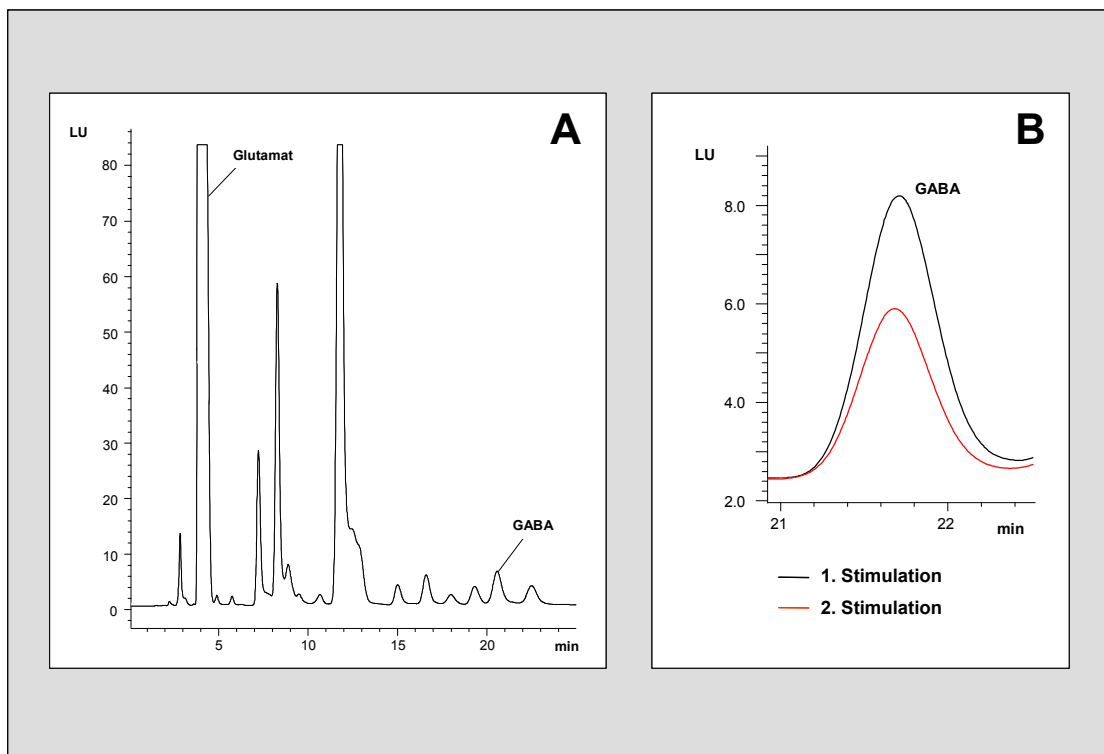


Abb. 36: GABA-Freisetzung aus HiPK während der 1. und 2. Stimulation einer Glutamat-Potenzierung – chromatographische Analyse der OPA-derivatisierten Proben. Zellen einer serumfreien hippocampalen Primärkultur (HiPK, 14 Tage alt) wurden in einem Abstand von 30 min zweimal für 30 sec mit 50 μ M Glutamat stimuliert. In A ist ein typisches Chromatogramm einer Probe (hier 1. Stimulation) nach OPA-Derivatisierung und anschließender chromatographischer Analyse mittels Reversed-Phase-HPLC mit Fluoreszenzdetektion gezeigt. Bei Übereinanderlagerung der Chromatogramme von 1. und 2. Stimulation (B) ist zu erkennen, dass der GABA-Peak der 2. Stimulation im Vergleich zu dem der 1. Stimulation deutlich kleiner ist. LU: Light units

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein von V. Pejovic (2001) etabliertes biochemisches LTP-Modell verwendet (Näheres siehe Diskussion 3). Die experimentelle Durchführung umfasste eine zweimalige Stimulation von hippocampalen Primärkulturzellen mit 50 μ M Glutamat. Die Stimulationsdauer betrug 30 sec, die Pause zwischen der ersten

und der zweiten Stimulation 30 min. Methodisch wurde in gleicher Weise verfahren wie in den Stimulationsexperimenten mit nikotinischen Agonisten (Abschnitt 2.2). Die gesammelten Überstände wurden schließlich mit OPA derivatisiert und via HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert.

Abb. 36A zeigt ein typisches Chromatogramm einer wie oben beschriebenen Stimulation. Der große Glutamat-Peak repräsentiert im Wesentlichen das in der Stimulationslösung enthaltene Glutamat. Eine Analyse des von den Zellen freigesetzten Glutamats war infolgedessen nicht möglich. Bezüglich der GABA-Freisetzung konnten deutliche Unterschiede zwischen der ersten und der zweiten Stimulation festgestellt werden. Wie aus Abb. 36B und 37 ersichtlich, war die während der zweiten Stimulation freigesetzte GABA-Menge signifikant (ca. 40 %) geringer.

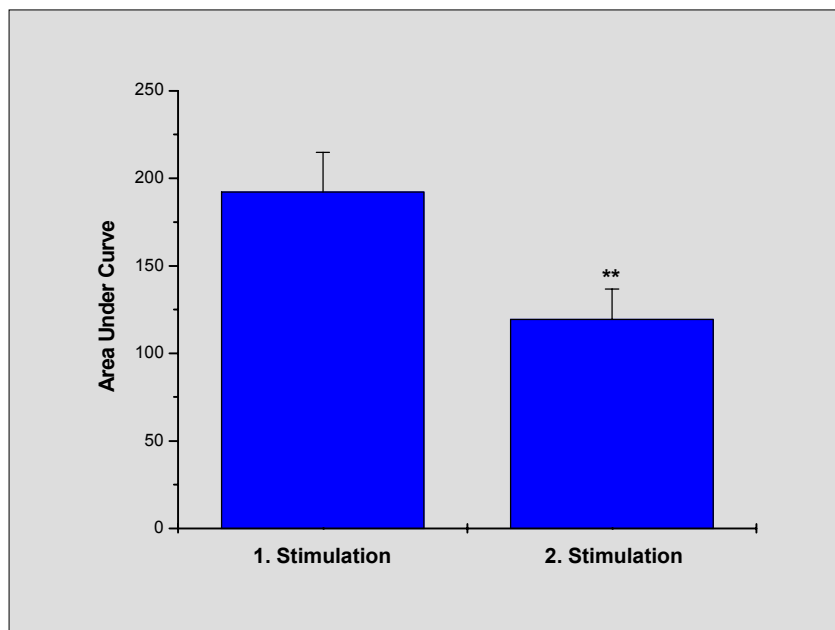


Abb. 37: GABA-Freisetzung aus HiPK während der 1. und 2. Stimulation einer Glutamat-Potenzierung – quantitative Auswertung zu Abb. 36. Das dargestellte Säulendiagramm umfasst die Auswertung einer Versuchsreihe von insgesamt 18 Experimenten, die wie in Abb. 36 beschrieben durchgeführt wurden. Die Quantifizierung der freigesetzten GABA-Mengen erfolgte über die Peakfläche (Area under curve). **Aus dem Diagramm geht hervor, dass die Stimulation von HiPK mit 50 µM Glutamat zu einer signifikant geringeren GABA-Freisetzung während eines zweiten, gleichartigen Stimulus nach 30 min führt.** Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

| Stimulus | AUC (Mittelwert) | sd | sem | n | Stat. Sig.* |
|--|------------------|--------|--------|----|-------------|
| 50 µM Glutamat - 1. Stimulation (0 min) | 195,2 | 95,214 | 22,442 | 18 | -- |
| 50 µM Glutamat - 2. Stimulation (30 min) | 114,856 | 66,924 | 15,774 | 18 | ** |

Tabelle zu Abb. 37: AUC: Area under curve; n: Anzahl der Experimente; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz (Signifikanzebene: 0,05). * unabhängiger T-Test (zwei Populationen): $t = -2,92893$, $p = 0,00603$.

Mit Hilfe der Standardadditionsmethode konnten folgende freigesetzte GABA-Mengen berechnet werden (siehe auch Tabelle 7): 1. Stimulation: $26,83 \pm 3,08$ pmol/30 sec/200.000 Zellen; 2. Stimulation: $15,78 \pm 2,17$ pmol/30 sec/200.000 Zellen.

| GABA-Freisetzung (in pmol / 30 sec / 200.000 Zellen) | |
|--|------------------|
| 50 μ M Glutamat - 1. Stimulation (0 min) | $26,83 \pm 3,08$ |
| 50 μ M Glutamat - 2. Stimulation (30 min) | $15,78 \pm 2,17$ |

Tabelle 7: Freigesetzte GABA-Mengen während der 1. und 2. Stimulation einer Glutamat-Potenzierung. Aufgeführt sind die **korrespondierenden GABA-Mengen zu den in Abb. 37** dargestellten mittleren AUC-Werten (Peakflächen) der 1. und 2. Glutamat-Stimulation. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Standardadditionsmethode (siehe Material und Methoden, Abschnitt 13.1).

Um zu untersuchen, ob die festgestellte Verringerung der GABA-Freisetzung tatsächlich auf Glutamat-vermittelte Potenzierungseffekte zurückzuführen war, wurden Stimulationsexperimente in Anwesenheit spezifischer Antagonisten der verschiedenen Glutamatrezeptor-Subtypen durchgeführt. Als Antagonisten der NMDA-, AMPA/Kainat- und metabotropen Glutamatrezeptoren wurden D-2-Amino-5-phosphonopentanonsäure (AP-5, 25 μ M), 6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX, 10 μ M) bzw. (S)- α -Methyl-carboxyphenylglycin (MCPG, 500 μ M) eingesetzt (Konzentrationen nach V. Pejovic, 2001).

Im Vergleich zu den vorherigen Experimenten erfolgte die Analyse der Proben auf einem anderen Wege. Die Derivatisierung wurde mit dem ‚AccQ-Fluor™ Reagent Kit‘ der Firma Waters durchgeführt. Das Reagenz 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbammat (AQC) gehört zu einer neuen Klasse von Amin-derivatisierenden Substanzen, die stark fluoreszierende und sehr stabile Derivate bilden. Zur Auftrennung wurde wie vorher die Reversed-Phase-HPLC eingesetzt. Da der GABA-Peak bei der Fluoreszenzdetektion durch Puffer-Komponenten überlagert wurde erfolgte die Detektion der AQC-Derivate mittels Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI). Der Vorteil dieser Detektionsmethode liegt darin, dass praktisch jede ionisierbare Substanz über ihre spezifische Masse detektiert werden kann. Somit können auch Substanzen erfasst werden, die durch Überlagerungseffekte über Fluoreszenz nicht detektierbar sind oder deren Existenz nicht vorher durch entsprechende Analysen (Injektion/Addition von Standards) nachgewiesen wurde.

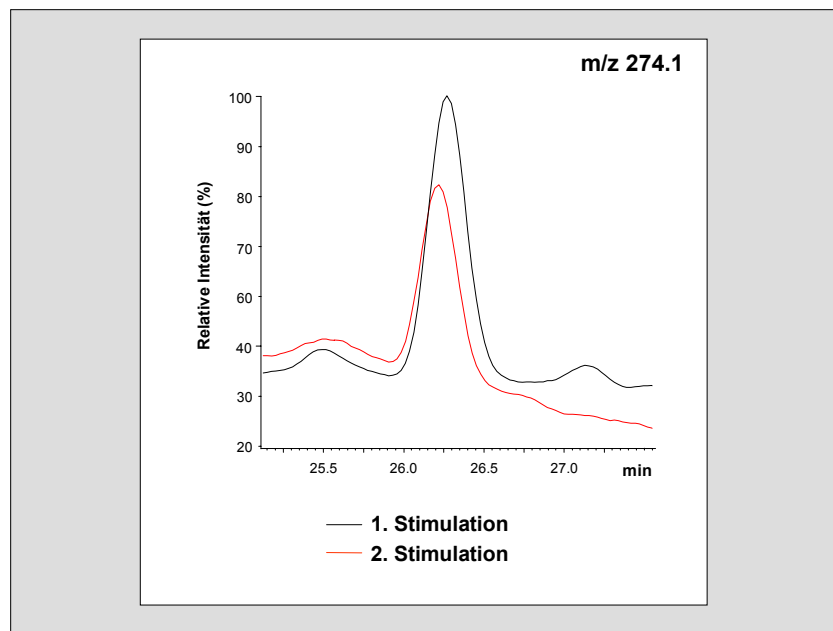


Abb. 38: GABA-Freisetzung aus HiPK während der 1. und 2. Stimulation einer Glutamat-Potenzierung – Detektion von AQC-GABA mittels Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI). Zellen einer serumfreien hippocampalen Primärkultur (HiPK, 14 Tage alt) wurden in einem Abstand von 30 min zweimal für 30 sec mit 50 μ M Glutamat stimuliert. Im Unterschied zu der in Abb. 36 erläuterten Methode erfolgte die Derivatisierung der Proben mit 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbamat (AQC) und die Detektion der AQC-derivatisierten GABA mittels Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI). Die Identifizierung des AQC-GABA-Derivates erfolgte über dessen Masse. Gemessen wurde das Verhältnis der monoisotopischen Masse zur Ladung (m/z). Bei einfach positiver Ladung ergibt sich für AQC-GABA ein m/z -Wert von 274,1. Die Abbildung zeigt analog zu Abb. 36B die Überlagerung der GABA-Peaks aus den Chromatogrammen der 1. und 2. Glutamat-Stimulation. Wie in Abb. 36B, so ist auch hier der GABA-Peak der 2. Stimulation deutlich kleiner.

Die Identifizierung des AQC-GABA-Derivates in den Proben erfolgte über dessen einfach positiv geladene, monoisotopische Masse von 274,1 Dalton, gemessen als Masse/Ladung (m/z). Zusätzlich wurde die Retentionszeit mit der von AQC-derivatisierten GABA-Standards verglichen.

Wie aus den Abbildungen 38 und 39 hervorgeht, zeigte sich bei Glutamat-Stimulierung ohne Zusatz von Glutamatrezeptor-Antagonisten erneut eine um etwa 40 % geringere GABA-Freisetzung während der zweiten Stimulation. In Anwesenheit des NMDA-Rezeptor-Antagonisten AP-5 sowie des AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonisten CNQX konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Bei Blockierung der metabotropen Glutamatrezeptoren mit MCPG konnte zwar während der zweiten Stimulation eine geringere GABA-Freisetzung gemessen werden, allerdings betrug der Unterschied zur ersten Stimulation nur etwa 25 %.

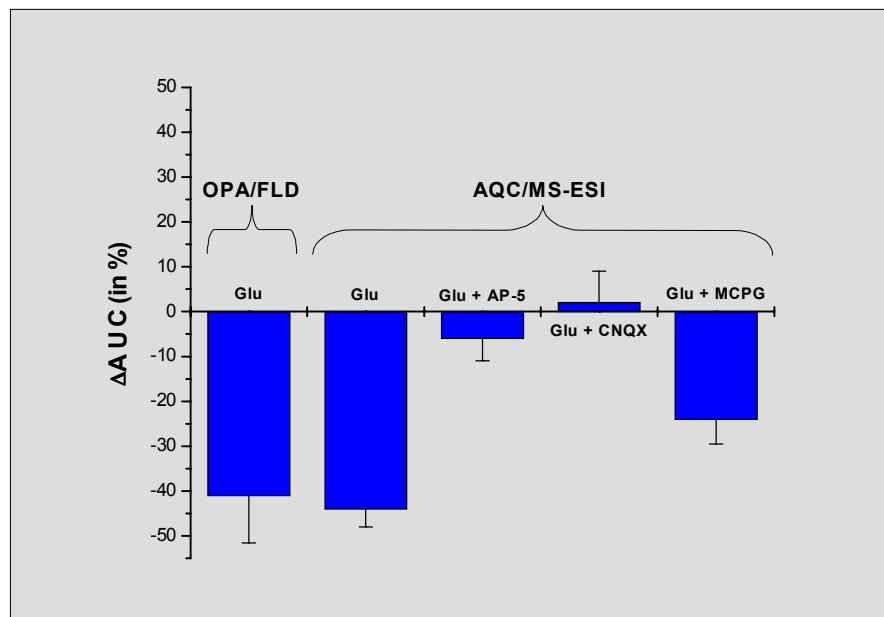


Abb. 39: Einfluss verschiedener Glutamatrezeptor-Antagonisten auf die GABA-Freisetzung aus HiPK während einer Glutamat-Potenzierung. Zellen 14 Tage alter HiPK wurden in einem Abstand von 30 min zweimal für 30 sec mit 50 μ M Glutamat alleine sowie in Anwesenheit von 25 μ M AP-5 (NMDA-Rezeptor-Antagonist), 10 μ M CNQX (AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonist) bzw. 500 μ M MCPG (Antagonist metabotroper Glutamatrezeptoren) stimuliert. Die Derivatisierung der Proben erfolgte mit AQC, die Detektion des GABA-Derivates nach chromatographischer Auftrennung mittels Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI). Die Quantifizierung der freigesetzten GABA-Mengen erfolgte über die Peakflächen (AUC). **Das Säulendiagramm zeigt die prozentuale Abweichung (Δ AUC) der während der 2. Stimulation freigesetzten GABA-Menge gegenüber der Freisetzung während der 1. Stimulation.** Dargestellt sind die aus allen Experimenten gemittelten Δ AUC-Werte für die einzelnen Bedingungen. **Zweimalige Stimulation der Zellen mit 50 μ M Glutamat (Glu) bewirkte erneut eine um etwa 40 % verringerte GABA-Ausschüttung während der 2. Stimulation.** Dieses Ergebnis bestätigt somit die Resultate der ersten Versuchsserie (Derivatisierung mit OPA, Detektion über Fluoreszenz (FLD)). **Bei Glutamat-Stimulationen in Anwesenheit von MCPG war die während der 2. Stimulation freigesetzte GABA-Menge nur ca. 25 % geringer.** Keine signifikanten Unterschiede zwischen 1. und 2. Stimulation konnten bei Blockade der NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren mit AP-5 bzw. CNQX beobachtet werden. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

| Stimulus | Methode | Δ AUC (%) | sd | sem | n |
|----------------------------|------------|------------------|-------|------|----|
| 50 μ M Glutamat | OPA/FLD | -41 | 44,55 | 10,5 | 18 |
| 50 μ M Glutamat | AQC/MS-ESI | -44 | 5,66 | 4 | 2 |
| 50 μ M Glutamat + AP-5 | AQC/MS-ESI | -6 | 7,2 | 5,09 | 2 |
| 50 μ M Glutamat + CNQX | AQC/MS-ESI | 2 | 9,9 | 7 | 2 |
| 50 μ M Glutamat + MCPG | AQC/MS-ESI | -24 | 7,78 | 5,5 | 2 |

Tabelle zu Abb. 39: Δ AUC: prozentuale Abweichung der während der 2. Stimulation freigesetzten GABA-Menge gegenüber der Freisetzung während der 1. Stimulation; AQC/MS-ESI und OPA/FLD: siehe Erläuterungen zu Abb. 39; n: Anzahl der Experimente; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes.

Diskussion

1 Etablierung des Testsystems

1.1 Reversed-Phase-HPLC als Analysemethode zum Nachweis von Glutamat und GABA

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Glutamat und GABA wurde als Analysemethode die Reversed-Phase-HPLC (RP-HPLC) verwendet. Seit Mitte der 80er Jahre wird diese Methode zum Nachweis von Neurotransmittern aus biologischen Proben eingesetzt (siehe Einleitung 5.1). Um hohe Detektionsempfindlichkeiten erreichen zu können, müssen die meisten Neurotransmittersubstanzen vor der chromatographischen Analyse derivatisiert werden. In der Analyse von Aminosäure-Neurotransmittern gehört *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) zu den am häufigsten verwendeten Derivatisierungsreagenzien. Die Detektion der OPA-Aminosäuren erfolgt in der Regel über deren Fluoreszenz (Jones & Gilligan, 1983; Verhage et al., 1991; Zhou et al., 1995; Kamisaki et al., 1996; Ioannou et al., 1998; Bianchi et al., 1999). Als alternative Detektionsmethoden werden darüber hinaus Absorption (Svedas et al., 1980) sowie elektrochemische Detektion (Allison et al., 1984; Rowley et al., 1995) beschrieben. Während mit Hilfe der Fluoreszenz- und der elektrochemischen Detektion OPA-Aminosäuren im fmol-Bereich nachgewiesen werden können, ist die Detektion über Absorption wesentlich unempfindlicher. OPA-Derivate haben den Nachteil einer geringen Stabilität, die zudem in Abhängigkeit von der Natur der jeweiligen Aminosäure variiert (Lindroth & Mopper, 1979). Die Versuchsbedingungen zur OPA-Derivatisierung und zur Fluoreszenzdetektion von OPA-Glutamat und -GABA müssen an das jeweils gewählte Testsystem angepasst werden. In der Literatur werden daher sehr unterschiedliche Derivatisierungs- und Nachweisvorschriften vorgeschlagen (vgl. hierzu u.a. Svedas et al., 1980; Jones & Gilligan, 1983; Smith & Sharp, 1992; Rowley et al., 1995; Kamisaki et al., 1996). Für das in dieser Arbeit verwendete System wurden als Hauptparameter die Derivatisierungsdauer und die Detektionswellenlängen optimiert (siehe Ergebnisse 1.1.1 und 1.1.2, Abb. 17-19). Mit einer Derivatisierungsdauer von 2 min und Fluoreszenzdetektion der chromatographisch aufgetrennten OPA-Derivate mit den Wellenlängen 339 nm (Exzitation) und 440 nm (Emission) konnte für Glutamat und GABA eine Nachweisgrenze von ~ 50 fmol erreicht werden (siehe Ergebnisse 1.1.3, Abb. 20). Diese Nachweisgrenze für OPA-Glutamat und -GABA wurde auch von anderen Arbeitsgruppen angegeben (Smith & Sharp, 1992; Peterson et al., 1995; Zhou et al., 1995; Bianchi et al., 1999).

1.2 K⁺-stimulierte Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen und Primärkulturzellen

Um zu überprüfen, ob die etablierte Nachweismethode für Neurotransmitterfreisetzungstudien geeignet ist, wurden Depolarisationsstudien mit hippocampalen Synaptosomen und Primärkulturzellen durchgeführt. Methodisch erfolgte die Stimulation im Reaktionsgefäß, d.h. in der statischen Situation (*engl.* als ‚*batch incubation*‘ bezeichnet; Nicholls, 1989). Im Vergleich zur alternativen Stimulationsmethode, der Superfusion (Minnema & Michaelson, 1985; Hoffman et al., 1986), die relativ aufwendig ist und deren Nachteile in schwer kontrollierbaren Verdünnungs- und Verschleppungseffekten liegen, sind ‚*batch incubations*‘ einfach und schnell durchführbar und ermöglichen bei Parallelstimulation einen hohen Durchsatz an Proben (Nicholls, 1989). Ein Nachteil bei ‚*batch incubations*‘ ist allerdings, dass Stimulationseffekte durch ungehinderte Neurotransmitter-Wiederaufnahme beeinflusst werden können (*ibid.*).

Synaptosomen stellen eine neuronale Gewebepreparation dar, die im Wesentlichen aus isolierten (präsynaptischen) Nervenendigungen besteht. Diese Nervenendigungen sind neurotransmissionskompetent, metabolisch aktiv und besitzen hochaffine Bindungstellen für Rezeptorliganden sowie funktionelle, selektive Ionenkanäle (Bradford, 1986). Synaptosomen werden häufig für Neurotransmitterfreisetzungstudien verwendet, da bei dieser Art der Präparation im Vergleich zu anderen Präparationen wie etwa Gewebeschnitten der Anteil an nicht neuronalem Gewebe minimiert ist (*ibid.*). Durch die Anreicherung der für die Neurotransmitter-Freisetzung entscheidenden Zellkompartimente setzen Synaptosomen zudem pro (Protein-) Mengeneinheit vergleichsweise große Mengen an Neurotransmittern frei (*ibid.*).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Depolarisationsexperimenten (Stimulation mit 60 mM K⁺ für 3 min) mit hippocampalen Synaptosomen konnten freigesetztes Glutamat und GABA sowohl im stimulierten Ansatz als auch in der Kontrolle (Basalwert) nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 1.3.2, Abb. 26). Dabei verursachte die Stimulation mit K⁺ eine um ca. 70 % (Glutamat) bzw. 60% (GABA) erhöhte Freisetzung im Vergleich zum Basalwert (Ergebnisse 1.3.2, Abb. 27).

Die K⁺-stimulierte Neurotransmitterfreisetzung aus Synaptosomen verschiedener Gehirnregionen ist bereits gut beschrieben (Verhage et al., 1989, 1991, 1992; Midlemis & Hutson, 1990; Zhou et al., 1995; Kamisaki et al., 1996). Verhage et al. (1989) und Kamisaki et al. (1996) fanden für hippocampale bzw. kortikale Synaptosomen eine im Vergleich zum Basalwert um 250 – 300 % gesteigerte Glutamat-Freisetzung, während die GABA-Freisetzung um 100 – 200 % erhöht war (die Stimulation erfolgte mit 30 mM K⁺ für 1-2 min).

Dies ist im Vergleich zu den in dieser Arbeit gemessenen Werten eine 2-3 fach (GABA) bzw. 3-4 fach (Glutamat) höhere K^+ -induzierte Neurotransmitterfreisetzung. Diese Unterschiede können in einer geringeren Aktivität der hier verwendeten Synaptosomen-Präparationen begründet sein. Wahrscheinlicher aber ist eine methodisch bedingte Verminderung des K^+ -Effektes. Im Gegensatz zu den Experimenten von Verhage et al. und Kamisaki et al., bei denen die Synaptosomen immobilisiert und mit der entsprechenden Stimulationslösung superfundiert wurden, erfolgte die Stimulation hier mit Hilfe der ‚batch incubation‘-Methode. Wie oben bereits ausgeführt, müssen dabei Prozesse der Neurotransmitter-Wiederaufnahme berücksichtigt werden, die insbesondere bei längeren Stimulationen eine signifikante Verringerung der freigesetzten Neurotransmittermenge zur Folge haben (Nicholls, 1989). Dass Glutamat von solchen Wiederaufnahme-Prozessen in stärkerem Maße betroffen ist als GABA, könnte mit der exzitotoxischen Wirkung von Glutamat erklärt werden, die eine schnelle und effiziente Beseitigung aus dem synaptischen Spalt notwendig macht (Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997).

Depolarisationsexperimente der gleichen Art wurden auch mit hippocampalen Primärkulturzellen durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Kulturansätze getestet: serumhaltige und serumfreie Kulturen. Während erstere aus Gliazellen und Neuronen besteht (Higgins & Banker, 1998), findet man in letzterer fast ausschließlich neuronale Zellen (Brewer et al., 1993). Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kulturen (siehe Ergebnisse 1.3.3, Abb. 29): Während die K^+ -Stimulation bei den Zellen der serumhaltigen Kultur nur eine 30 %ige (GABA) bzw. 50 %ige (Glutamat) Erhöhung der basalen Freisetzung bewirkte, zeigten die Zellen der serumfreien Kultur unter den gleichen Bedingungen eine um 150 % (GABA) bzw. 200 % (Glutamat) gesteigerte Freisetzung. Die vergleichsweise geringe Erhöhung der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung in den serumhaltigen Kulturen ist darauf zurückzuführen, dass Gliazellen entscheidend an der Neurotransmitter-Wiederaufnahme – insbesondere von Glutamat (Gegelashvili & Schousboe, 1998; Bergles et al., 1999) und GABA (Krogsgaard-Larsen et al., 2000) – beteiligt sind. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass ein erheblicher Anteil der freigesetzten Neurotransmitter durch Wiederaufnahmeaktivitäten der Gliazellen beseitigt wurde. Darüber hinaus haben Liu et al. (2000) eine permanente Freisetzung von Neurotransmittern und Neurotransmitter-ähnlichen Substanzen aus Gliazellen nachgewiesen und auf ein Interferieren dieser Substanzen mit der eigentlichen Neurotransmission hingewiesen. Aus diesen Gründen stellen rein neuronale Kulturen für Neurotransmitterfreisetzungstudien unter den verschiedenen Kulturansätzen die validesten Testsysteme dar.

Auch im Vergleich zu den Synaptosomen stellen die serumfreien Primärkulturen das bessere Modell dar. Zum einen reagierten die serumfreien Kulturen auf den gleichen Stimulus mit einer wesentlich stärkeren Erhöhung der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung (200 statt 70 % bzw. 150 statt 60 %), zum anderen waren die Stimulationen wesentlich einfacher und reproduzierbarer durchzuführen: Während die Synaptosomen nach der Stimulation erst durch einen Zentrifugationsschritt vom Überstand abgetrennt werden mussten, konnte die Stimulation der Primärkulturzellen direkt in den Wells der Kulturschalen durch einfaches Zugeben und Abnehmen der entsprechenden Stimulationlösung erfolgen. Auf diese Weise konnten bei den Primärkulturzellen im Gegensatz zu den Synaptosomen mögliche Wiederaunahme- oder Freisetzungprozesse nach der eigentlichen Stimulation vollständig ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu Synaptosomen, die eine Anhäufung voneinander unabhängiger, präsynaptischer Nervenendigungen darstellen, haben Primärkulturen den entscheidenden Vorteil, dass sie ein Netzwerk von miteinander in Verbindung stehenden, kommunizierenden Zellen darstellen (Rothman & Cowan, 1981; Craig et al., 1993, 1994). Dies ermöglicht bei Primärkulturzellen die Untersuchung sowohl präsynaptischer als auch postsynaptischer Effekte. Primärkulturen können daher im Vergleich zu Synaptosomen als ‚realitätsnäheres‘ Modell bezeichnet werden.

Im Gegensatz zu der Vielzahl an Untersuchungen mit Synaptosomen und Gewebeschnitten sind nur wenige Daten zur Glutamat- und GABA-Freisetzung aus neuronalen Kulturzellen veröffentlicht. Harris & Miller (1989) konnten eine K^+ -stimulierte [3H]-GABA-Freisetzung aus entsprechend vorinkubierten hippocampalen Primärkulturzellen zeigen, wobei diese nur geringfügig (~3 %) über der basalen [3H]-GABA-Freisetzung lag. Ebenso konnten González und seine Mitarbeiter die K^+ -stimulierte Freisetzung von Aspartat, Glutamat, Glycin und GABA aus kortikalen Primärkulturzellen nachweisen (Herrero et al., 1998). Allerdings wurden keine vergleichenden Angaben bezüglich der basalen Freisetzung gemacht.

Die hier durchgeführten Depolarisationsexperimente zeigen, dass serumfreie hippocampale Primärkulturen innerhalb des etablierten Testsystems auf eine K^+ -Stimulation in vergleichbarem Ausmaß reagieren wie die in der Literatur beschriebenen Modelle mit Synaptosomen (s.o.). Gleiches gilt auch für Studien an hippocampalen Gewebeschnitten. Roisin et al. (1991) und Ioannou et al. (1998) finden eine 200 - 300 %ige Erhöhung der basalen Glutamat-Freisetzung durch K^+ -Stimulation (50 mM K^+ , 0,5 bzw. 2 min). Spencer et al. (1981) konnten unter vergleichbaren Bedingungen nur eine um etwa 60 % gesteigerte Glutamat-Freisetzung feststellen, ein Wert, der in der vorliegenden Arbeit für die serumhaltigen Primärkulturen und die Synaptosomen erhalten wurde.

Es konnte somit ein Testsystem etabliert werden, dass die Untersuchung der Neurotransmitterfreisetzung aus verschiedenen hippocampalen *in vitro*-Modellen ermöglicht. Durch vergleichende Analyse konnte herausgearbeitet werden, dass Zellen serumfreier Primärkulturen für Neurotransmitterfreisetzungstudien auf dem Vielzellniveau wesentlich besser geeignet sind als Zellen serumhaltiger Kulturen oder Synaptosomen-Präparationen.

2 Modulation der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen durch Nikotin und Galanthamin

Unter Verwendung des etablierten Testsystems wurde der Einfluss nikotinischer Agonisten und Antagonisten auf die basale Glutamat- und GABA-Freisetzung in Zellen serumfreier hippocampaler Primärkulturen untersucht. Dazu wurden Stimulationen mit dem nAChR-Agonisten Nikotin und dem allosterisch an nAChR wirkenden Liganden Galanthamin (Pereira et al., 1993; Schrattenholz et al., 1996) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Stimulationsdauer wurden dabei unterschiedliche Ergebnisse erhalten.

Bei einer 3-minütigen Stimulation verursachte Nikotin alleine überwiegend und in Koapplikation mit Galanthamin immer eine signifikante Verringerung der basalen Glutamat-Freisetzung (siehe Ergebnisse 2.1, Abb. 31). Eine Stimulation mit Galanthamin zeigte keinen Effekt. Weder Nikotin noch Galanthamin noch deren Koapplikation führte zu einer signifikanten Änderung der basalen GABA-Freisetzung.

Bei einer Stimulationsdauer von 30 sec hingegen konnten deutliche Effekte beobachtet werden. So erhöhte Nikotin die basale Glutamat- und GABA-Freisetzung um 30 bzw. 40 % (siehe Ergebnisse 2.2, Abb. 32). Die Koapplikation von Nikotin und Galanthamin zeigte unterschiedliche Wirkungen von Galanthamin: Während die Glutamat-Freisetzung im Vergleich zur alleinigen Nikotin-Stimulation um weitere 15 % erhöht wurde, sank die GABA-Freisetzung um ca. 60 % auf einen Wert unterhalb des basalen Levels ab (Abb. 34). Alleinige Stimulation mit Galanthamin verursachte keine signifikanten Veränderungen (Abb. 33).

Bei Stimulation für 30 sec in Anwesenheit des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin (MLA; Alkondon et al., 1992) wurden die Effekte von Nikotin und Nikotin/Galanthamin auf die basale Glutamat-Ausschüttung vollständig blockiert, während deren Effekte auf die basale GABA-Ausschüttung nur zu etwa 50 % reduziert wurden (siehe Ergebnisse 2.3, Abb. 35).

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, sind mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden die positiv modulierende Wirkung von Nikotin auf Glutamat- und GABA-vermittelte postsynaptische Ströme in einzelnen Zellen hippocampaler Gewebeschnitte (Gray et al., 1996; Alkondon et al., 1997, 1999) und Primärkulturen (Radcliffe & Dani, 1998; Radcliffe et al., 1999) nachgewiesen worden. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Nikotin auch auf die Freisetzung von Glutamat und GABA aus hippocampalen Primärkulturzellen positiv modulierend wirkt und dass dieser Effekt auf dem Vielzellniveau nachzuweisen ist. Aus den Experimenten mit dem $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten MLA geht hervor, dass Nikotin die basale Glutamat-Freisetzung im Wesentlichen über $\alpha 7$ -nAChR beeinflusst, während an der nikotinischen Modulation der basalen GABA-Freisetzung neben dem $\alpha 7$ -nAChR noch weitere nAChR-Subtypen beteiligt sein könnten.

Für die Bewertung und Interpretation der Ergebnisse ist die Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen von entscheidender Bedeutung. So kann aufgrund der hier gewählten Stimulationsparameter – pro Ansatz wurden etwa 200.000 Zellen gleichzeitig für 30 sec stimuliert – nicht gesagt werden, wie viele Primärkulturzellen in welchem Umfang auf die Nikotin-Stimulation reagiert haben. Allerdings geht aus den elektrophysiologischen Studien von Radcliffe & Dani (1998) hervor, dass rund $\frac{2}{3}$ der Zellen einer hippocampalen Primärkultur die für $\alpha 7$ -nAChR typischen Ströme zeigen und über diese Rezeptoren die exzitatorische glutamaterge Neurotransmission verstärken. Infolgedessen kann zumindest bezüglich der Glutamat-Freisetzung vermutet werden, dass der hier gefundene Effekt auf die modulatorische Aktivität von Nikotin an einem großen Teil der Zellen zurückzuführen ist.

Stimulationsart und -dauer lassen außerdem keine Unterscheidung prä- und postsynaptischer Effekte zu. Die hier nachgewiesene Wirkung von Nikotin kann somit auf mehreren Wegen erfolgt sein. Im Falle der glutamatergen Neurotransmission sind drei Mechanismen bekannt: (1) Modulation über präsynaptische $\alpha 7$ -nAChR an glutamatergen Neuronen, (2) Modulation über postsynaptische und somatische $\alpha 7$ -nAChR an glutamatergen Neuronen und (3) indirekte Modulation über hauptsächlich $\alpha 7$ -nAChR-vermittelte Aktivierung/Deaktivierung GABAerger Neuronen. Die ersten beiden Mechanismen werden von K.A. Radcliffe, J.L. Fisher und J.A. Dani vorgeschlagen. Sie konnten in elektrophysiologischen und Ca-Imaging-Studien an hippocampalen Primärkulturzellen zeigen, dass prä- und postsynaptische/somatische $\alpha 7$ -nAChR auf unterschiedliche Art und Weise die glutamaterge Neurotransmission beeinflussen (Radcliffe & Dani, 1998; Radcliffe et al., 1999; Fisher & Dani, 2000). Über präsynaptische $\alpha 7$ -nAChR kommt es zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom in die präsynaptische Endigung und damit zu einer erhöhten Glutamat-Freisetzung. Diese präsynaptische Modulation ist nach Meinung der Autoren der entscheidende und überwiegende Mechanismus. Ca^{2+} -Einstrom über postsynaptische $\alpha 7$ -

nAChR bewirkt zum einen eine Verstärkung der postsynaptischen Membrandepolarisation und damit des postsynaptischen Signals, zum anderen wird dadurch vermutlich ein Ca^{2+} -Calmodulin-abhängiger Prozess in Gang gesetzt, der die Sensitivität der postsynaptischen NMDA-Rezeptoren zu modulieren vermag. Indirekte nikotinsche Modulation der Glutamat-Freisetzung durch Aktivierung GABAerger Interneuronen konnte in elektrophysiologischen Experimenten mit hippocampalen Gewebeschnitten gezeigt werden (Ji & Dani, 2000): Die Nikotin-induzierte Aktivierung GABAerger Interneuronen im *Stratum radiatum* der CA1-Region verursachte sowohl Inhibition als auch Disinhibition glutamaterger Pyramidalzellen. Nikotin wirkt dabei vermutlich vorwiegend über (postsynaptische) $\alpha 7$ -nAChR. Darüber hinaus wird eine zusätzliche Modulation über präterminal lokalisierte $\alpha 4\beta 2$ -nAChR diskutiert (Albuquerque et al. 2000). Es wird vermutet, dass auch der verstärkende Effekt von Nikotin auf die hippocampale Langzeitpotenzierung auf der modulatorischen Aktivität an GABAergen Interneuronen beruht (Fujii et al, 2000 a,b). Vergleichbare Effekte in hippocampalen Primärkulturen sind bisher nicht beschrieben. Da in Primärkulturen synaptische Kontakte autaptisch ausgebildet werden und folglich Kulturen nicht mehr die Originalarchitektur der entsprechenden Region widerspiegeln (Fisher & Dani, 2000), lässt sich nur schwer abschätzen, ob und in welchem Umfang diese indirekte Modulation in den hier durchgeführten Experimenten zum Tragen gekommen ist.

Für die nikotinsche Modulation der hippocampalen GABAergen Neurotransmission sind ebenfalls mehrere Mechanismen beschrieben worden. Neben der bereits oben erwähnten Modulation über postsynaptische $\alpha 7$ -nAChR und präterminale $\alpha 4\beta 2$ -nAChR konnten Radcliffe et al. (1999) in hippocampalen Primärkulturzellen auch eine $\alpha 7$ -nAChR-vermittelte präsynaptische Modulation zeigen. Die in den Blockierungsexperimenten mit MLA erhaltenen Ergebnisse (Abschnitt 2.3, Abb. 35) lassen die Interpretation zu, dass ein wesentlicher Teil der Modulation über nicht- $\alpha 7$ -nAChR erfolgt. Dabei können neben den von Albuquerque et al. (2000) beschriebenen präterminalen Rezeptoren des $\alpha 4\beta 2$ -Typs noch andere nAChR-Subtypen beteiligt sein (siehe Einleitung 4.2). Da GABAerge Interneuronen zahlreiche Afferenzen von den glutamatergen Pyramidalzellen erhalten (vgl. Einleitung 2.1), müssen auch im Falle der GABAergen Neurotransmission indirekte modulatorische Effekte berücksichtigt werden. So ist bekannt, dass die GABA-Freisetzung aus hippocampalen Interneuronen insbesondere über die Aktivierung von Glutamatrezeptoren des Kainat-Subtyps (Frerking et al., 1998; Mody, 1998; Min et al., 1999), aber auch über NMDA- (Chen & Wong, 1995) und metabotrope Glutamatrezeptoren (Fitzsimonds & Dichter, 1996) moduliert werden kann. Allerdings stellt sich auch hier die Frage, inwieweit die Effizienz dieser indirekten Modulation von der Originalstruktur des Hippocampus beeinflusst wird.

In den Experimenten mit Galanthamin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der modulatorische Effekt von Nikotin auf die hippocampale Glutamat- und GABA-Freisetzung durch allosterisch wirkende nAChR-Liganden signifikant beeinflusst wird und dass dieser Effekt auch auf dem Vielzellniveau nachweisbar ist. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass diese Gruppe von nAChR-Liganden alleine keine signifikanten Effekte hervorrufen (Maelicke & Albuquerque, 2000). Damit ist auch eine Beeinflussung der Glutamat- und GABA-Freisetzung durch Galanthamin über eine Hemmung der Acetylcholinesterase (\Rightarrow erhöhte Aktivität von intrinsisch freigesetztem ACh an nAChR und mAChR) unwahrscheinlich (vgl. Einleitung 4.1). Die unterschiedliche Wirkung von Galanthamin auf die Nikotin-modulierte Glutamat- (potenzierende Wirkung) und GABA-Freisetzung (depotenzierende Wirkung) unterstützt die oben geäußerte Vermutung, dass an der nikotinischen Modulation dieser beiden Neurotransmittersysteme verschiedene nAChR-Subtypen beteiligt sind. Aus den Blockierungsexperimenten mit dem $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten MLA geht dabei hervor, dass der potenzierende Galanthamin-Effekt auf die Nikotin-modulierte Glutamat-Freisetzung nur über $\alpha 7$ -nAChR erfolgt, während die Depotenzierung der GABA-Freisetzung vermutlich auf einer Wirkung an $\alpha 7$ -nAChR und nicht- $\alpha 7$ -nAChR beruht.

Die allosterische Potenzierung nikotinischer Ströme durch Galanthamin konnte bereits in mehreren Zellsystemen, darunter in PC12 Pheochromocytozyten (Storch et al., 1995) und hippocampalen Primärkulturzellen (Pereira et al., 1993), nachgewiesen werden. Die Wirkung von Galanthamin auf einzelne nAChR-Subtypen wurde unter Verwendung von ektopischen Expressionssystemen untersucht. So konnte in Experimenten mit HEK-293-Zellen (*engl.* human embryonic kidney cells), die den $\alpha 4\beta 2$ -nAChR der Ratte bzw. des Menschen stabil exprimieren, gezeigt werden, dass Galanthamin seine potenzierende Wirkung über diesen nAChR-Subtyp vermitteln kann (Pereira et al., 1994; Samochocki et al., 2000). Experimente der gleichen Art mit einem stabil in HEK-293-Zellen exprimierten chimären $\alpha 7$ -nAChR/5-HT₃-Rezeptor (N-terminale extrazelluläre Region des $\alpha 7$ -nAChR mit den transmembranen und C-terminalen Regionen des 5-HT₃-Rezeptors; Eisele et al., 1993) legen auch eine potenzierende Galanthamin-Wirkung an $\alpha 7$ -nAChR nahe (Maelicke et al., 2001). Aus Dosis-Wirkungs-Kurven geht jedoch hervor, dass der potenzierende Effekt von Galanthamin nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich erhalten wird. In PC12-Zellen wirkt Galanthamin nur in Konzentrationen $< 1 \mu\text{M}$ potenzierend, in höheren Konzentrationen dagegen durch nicht-kompetitive Inhibition in zunehmendem Maße depotenzierend (Schrattenholz et al., 1996). Für den stabil in HEK-293-Zellen exprimierten humanen $\alpha 4\beta 2$ -nAChR werden potenzierende Effekte in einem Konzentrationsbereich von 0,01-2 μM beschrieben, während höhere Konzentrationen wie in den PC12-Zellen depotenzierend wirken (Samochocki et al., 2000).

Im Hinblick auf die hier beobachtete depotenzierende Wirkung von Galanthamin auf die Nikotin-modulierte GABA-Freisetzung sind somit zwei Mechanismen allosterischer Modulation denkbar: Zum einen könnte Galanthamin durch nicht-kompetitive Inhibition an nAChR auf direktem Wege depotenzierend wirken. Dieser Mechanismus käme im Wesentlichen für die nicht- $\alpha 7$ -nAChR in Frage. Eine nicht-kompetitive Inhibition an $\alpha 7$ -nAChR bei der hier eingesetzten Galanthamin-Konzentration (1 μM) ist aufgrund der gezeigten Potenzierung der Nikotin-modulierten Glutamat-Freisetzung, die nur über diesen nAChR-Subtyp vermittelt wird, unwahrscheinlich. Zum anderen könnte Galanthamin wie im Falle der Glutamat-Modulation potenzierend wirken und somit zunächst eine gesteigerte nAChR-vermittelte GABA-Freisetzung verursachen, die anschließend über direkte und/oder indirekte Mechanismen die GABAerge Neurotransmission zunehmend inhibiert. Direkte Mechanismen wären z.B. die durch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren vermittelte Autoinhibition oder die durch dauerhafte Aktivierung von postsynaptischen GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren verursachte Umkehr des K⁺- und Cl⁻-Gleichgewichtspotentials in Richtung Depolarisation. Diese beiden Mechanismen werden unter anderem für die Reduktion der GABAergen Inhibition bei der Langzeitpotenzierung diskutiert (Revest & Longstaff, 1998; siehe auch Einleitung 3, Abb. 9). Eine indirekte Reduktion der GABA-Freisetzung könnte über inhibitorische (Rückkopplungs-) Schaltkreise zwischen den GABAergen Neuronen erfolgen, ein Mechanismus, den Albuquerque und seine Mitarbeiter für die nikotinische Disinhibition der exzitatorischen (glutamatergen) Neurotransmission im Hippocampus vorschlagen (Albuquerque et al., 2000). Eine depotenzierende Galanthamin-Wirkung aufgrund von Rezeptor-Densensibilisierung ist weniger wahrscheinlich, da allosterische Modulatoren in der Regel solche kompensatorischen Prozesse nicht induzieren (Maelicke & Albuquerque, 2000). Ebenso kann wie oben bereits erwähnt ein modulierender Effekt über die Hemmung der Acetylcholinesterase ausgeschlossen werden. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chiodini et al. (1999) an Zellen hippocampaler Gewebeschnitte unterstützen den zweiten Mechanismus der Galanthamin-Wirkung (Inhibition der GABA-Freisetzung über Potenzierung des nikotinischen Effekts). Sie konnten in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration einen dualen Effekt von Nikotin auf die GABAerge Neurotransmission feststellen: Bei niedrigen Konzentrationen (< 100 μM) wirkte Nikotin verstärkend, bei hohen hingegen (> 100 μM) hemmend.

Die unterschiedliche Wirkung von Galanthamin auf die Nikotin-modulierte Glutamat- und GABA-Freisetzung aus Zellen einer entscheidend an Gedächtnisprozessen beteiligten Gehirnstruktur ist insbesondere im Hinblick auf die Verwendung von Galanthamin als Alzheimer-Therapeutikum (Maelicke et al., 2001) interessant. Galanthamin könnte dabei folgenden Wirkmechanismus auslösen: Die Erleichterung einer Potenzierung der

exzitatorischen hippocampalen Neurotransmission und damit der Induktion gedächtnis-relevanter Prozesse durch eine allosterisch an nAChR bewirkte Erhöhung der Glutamat-Freisetzung bei gleichzeitiger Verringerung der nAChR-vermittelten GABAergen Inhibition. Beide Effekte, Verstärkung der glutamatergen sowie Inhibition der GABAergen Neurotransmission, werden unabhängig voneinander für die nikotinsche Modulation der Langzeitpotenzierung (LTP) diskutiert (Fujii et al., 2000 b; Mansfelder & McGehee, 2000; siehe auch Einleitung 4.1). Die Kombination beider Effekte und die damit verbundene gesteigerte nikotinsche Wirkung auf die LTP-Induktion könnte die Bedeutung von Galanthamin für die Alzheimer-Therapie eindrucksvoll bestätigen.

Dass die Effekte von Nikotin und Galanthamin auf die basale hippocampale Glutamat- und GABA-Freisetzung – zumindest unter den hier gewählten Versuchsbedingungen (Stimulation in der statischen Situation mit ungehinderter Wiederaufnahme von Neurotransmittern) – entscheidend von der Stimulationsdauer abhängen, belegen die anfänglich durchgeführten 3-minütigen Stimulationen: Während bezüglich der GABA-Freisetzung keine Effekte mehr festzustellen sind, ist im Falle von Glutamat eine zum Teil deutlich unter dem basalen Level liegende Freisetzung zu beobachten (Ergebnisse 2.1, Abb. 31). Diese verringerte Glutamat-Freisetzung ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf $\alpha 7$ -nAChR-Desensibilisierung zurückzuführen. Nikotinsche Rezeptoren des $\alpha 7$ -Typs sind durch eine im Vergleich zu anderen Subtypen schnelle und langandauernde Desensibilisierung gekennzeichnet (Castro & Albuquerque, 1993; Zhang et al., 1994). Dass die $\alpha 7$ -nAChR-Desensibilisierung zu einer Verringerung der Glutamat-Freisetzung unterhalb des basalen Levels führt, lässt fernerhin auf eine basale Aktivität an diesen Rezeptoren schließen. Die Tatsache, dass bei der GABAergen Neurotransmission Desensibilisierungseffekte solchen Ausmaßes nicht zu beobachten sind, ist ein weiteres Indiz dafür, dass bei der nikotinschen Modulation neben $\alpha 7$ -nAChR auch andere Subtypen einen entscheidenden Einfluss haben.

Mit den hier durchgeführten Experimenten ist es gelungen, die positiv modulatorischen Effekte des nAChR-Agonisten Nikotin auf die basale Glutamat- und GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen auf dem Vielzellniveau nachzuweisen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass dabei die Modulation der Glutamat-Freisetzung über nAChR des $\alpha 7$ -Typs erfolgt, während an der Modulation der GABA-Freisetzung neben $\alpha 7$ -nAChR noch andere Subtypen beteiligt sind. Für den allosterisch an nAChR wirkenden Liganden Galanthamin konnte zum ersten Mal eine signifikante Beeinflussung der Nikotin-modulierten Glutamat- und GABA-Freisetzung in hippocampalen Neuronen gezeigt werden. Auf die Glutamat-Freisetzung wirkt Galanthamin potenzierend, auf die GABA-Freisetzung hingegen depotenzierend. Diese ‚duale‘ Verstärkung der exzitatorischen hippocampalen

Neurotransmission unterstreicht die Bedeutung der nAChR-vermittelten Modulation für gedächtnisrelevante Prozesse und liefert somit eine Begründung für die allosterische Modulation an nAChR als Behandlungsstrategie für die Alzheimer'sche Demenz.

3 Auswirkungen einer Glutamat-Potenzierung auf die GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer chemisch induzierten Langzeitpotenzierung (LTP) auf die GABA-Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen untersucht. Dazu wurden die Zellen in einem Abstand von 30 min zweimal für 30 sec mit 50 μ M Glutamat stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass während der zweiten Stimulation im Vergleich zur ersten ca.40 % weniger GABA freigesetzt wird (siehe Ergebnisse 3, Abb. 36-38). Experimente mit spezifischen Antagonisten der einzelnen Glutamatrezeptor-Typen ergaben eine vollständige Inhibition des obigen Effektes durch Blockade der NMDA-Rezeptoren mit AP-5 sowie der AMPA/Kainat-Rezeptoren mit CNQX (Ergebnisse 3, Abb. 39). Bei Blockade der metabotropen Glutamatrezeptoren durch MCPG konnte die verringerte GABA-Freisetzung während der zweiten Stimulation nur teilweise rückgängig gemacht werden (s.o.).

Die hier angewendete Methodik wurde von Dr. Vojislav Pejovic im Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz entwickelt. Mit Hilfe der Ca-Imaging-Technik beobachtete er in Zellen einer serumfreien hippocampalen Primärkultur während der zweiten Glutamat-Stimulation einen gegenüber der 1. Stimulation durchschnittlich um 25 % erhöhten postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom (Pejovic, 2001). Da der Ca^{2+} -Einstrom in postsynaptische Neuronen ein entscheidender Auslöser für die LTP-Induktion ist (Malenka, 1991; Collingridge et al., 1992; Teyler et al., 1994) wurde die gemessene Erhöhung als LTP-ähnlicher Effekt gewertet. Malgaroli & Tsien (1992) konnten mit dem gleichen Stimulus (50 μ M Glutamat für 30 sec) LTP in hippocampalen Neuronen induzieren. Pejovic konnte desweiteren zeigen, dass die Glutamat-induzierte Potenzierung des postsynaptischen Ca^{2+} -Einstroms von der Aktivierung metabotroper und NMDA-Glutamatrezeptoren abhängt, dagegen weitgehend unabhängig ist von Glutamatrezeptoren des AMPA/Kainat-Typs und spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen (Pejovic, 2001). Diese Eigenschaften stimmen mit elektrophysiologischen Daten überein, die von Dendriten und Zellkörpern pyramidalen Neuronen in der hippocampalen CA1-Region junger Ratten erhalten wurden (Kauer et al., 1988; Bashir et al., 1993; Colino & Malenka, 1993; Izumi & Zorumski, 1998). Aufgrund des deutlichen Übergewichts von pyramidalen CA1- und CA3-Neuronen im Hippocampus (Shepherd, 1998) ist auch die von Pejovic gezeigte Potenzierung in hippocampalen

Primärkulturzellen überwiegend auf die Aktivität an CA3/CA1-Synapsen zurückzuführen. Aus diesem Grunde kann die hier durchgeführte Glutamat-Potenzierung als alternatives Modell zur klassischen LTP angesehen werden.

Die hier gemessene verringerte GABA-Freisetzung während der zweiten Stimulation lässt vermuten, dass (1) die GABA-Freisetzung inhibitorischer, GABAerger Interneuronen unterdrückt und/oder (2) die GABA-Wiederaufnahme erhöht wird. Die erste Möglichkeit stimmt mit der bekannten Rolle der Interneuronen als ‚inhibierte Inhibitoren‘ innerhalb der hippocampalen LTP überein, bei der starke Glutamat-Stimulation nicht nur die Neurotransmission an Synapsen pyramidalen Neuronen potenziert, sondern auch zu einer Depotenzierung GABAerger Interneuronen führt (McMahon & Kauer, 1997). Die Möglichkeit (2) ergibt sich aus Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Aktivität hippocampaler GABA-Transporter des Typs GAT1 durch direkte Tyrosin-Phosphorylierung gesteigert wird (Law et al., 2000) und dass Tyrosin-Kinase-Inhibitoren die Induktion prä- und postsynaptischer LTP verhindern (Maguire et al., 1999; Soderling & Derkach, 2000).

Zur Analyse der Überstände aus den Stimulationen mit den verschiedenen Glutamatrezeptor-Antagonisten wurde eine alternative Derivatisierungs- und Detektionsmethode angewendet. Die Derivatisierung erfolgte mit 6-Aminochinoly-N-hydroxy-succinimidylcarbammat (AQC), welches mit primären und sekundären Aminen eine fluoreszierende Verbindung bildet (Liu et al., 1998). Da aber auch eine massenspektrometrische Detektion der AQC-Derivate möglich ist (Block, 2000), wurde aufgrund der vorher erwähnten Vorteile (keine Überlagerungseffekte, Detektion unbekannter Substanzen; siehe Einleitung 4 und Ergebnisse 3) die Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI) als Detektionsmethode gewählt. Bei den Kontrollstimulationen (50 µM Glutamat ohne Antagonisten) konnte wie bei vorangegangenen Experimenten eine um ca. 40 % geringere GABA-Freisetzung während der zweiten Stimulation gemessen werden (Ergebnisse 3, Abb. 39). Dieses Ergebnis belegt nicht nur die Reproduzierbarkeit der Stimulationen und damit des ‚alternativen‘ LTP-Modells, sondern auch die Anwendbarkeit der MS-ESI-Detektion für die quantitative Neurotransmitteranalyse.

Die Stimulationen in Anwesenheit der spezifischen Glutamatrezeptor-Antagonisten AP-5 (NMDA-Rezeptor), CNQX (AMPA/Kainat-Rezeptor) und MCPG (metabotrope Glutamatrezeptoren) zeigen, dass die verringerte GABA-Freisetzung während der zweiten Stimulation entscheidend von der Aktivierung der NMDA- und der AMPA/Kainat-Rezeptoren abhängt. Die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren scheint dagegen nur bedingt für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Pejovic (2001) lässt dies auf unterschiedliche Mechanismen für den postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom und die

Reduzierung der GABAergen Inhibition schließen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass der beobachtete ‚GABA-Effekt‘ nicht unmittelbar mit der Glutamat-Potenzierung zusammenhängt, da die Charakterisierung sowohl des hier verwendeten Modells als auch der ‚klassischen‘ LTP in der hippocampalen CA1-Region hauptsächlich über die Vorgänge an den exzitatorischen Synapsen erfolgte. Bezüglich des dem ‚GABA-Effekt‘ zugrunde liegenden Mechanismus können aufgrund der Versuchsanordnung (gleichzeitige Stimulation vieler, miteinander in Verbindung stehender Zellen) keine endgültigen Schlüsse gezogen werden. Möglich ist eine Reduktion der GABA-Freisetzung durch Autoinhibition als Folge einer starken, hauptsächlich über AMPA-Rezeptoren vermittelte Aktivierung der GABAergen Interneuronen durch glutamaterge Afferenzen (Revest & Longstaff, 1998). Desweiteren wird auch eine direkte Glutamat-vermittelte Hemmung der hippocampalen GABAergen Neurotransmission über postsynaptische NMDA-Rezeptoren (Chen & Wong, 1995) sowie präsynaptische Kainat-Rezeptoren (Rodríguez-Moreno et al., 1997; Min et al., 1999) und metabotrope Glutamatrezeptoren (Fitzsimonds & Dichter, 1996) beschrieben. Allerdings bedürfen die erhaltenen Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl von Experimenten mit Glutamatrezeptor-Antagonisten der Bestätigung durch weitere Versuche.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Glutamat-Potenzierung in hippocampalen Primärkulturzellen belegen erneut die Eignung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Testsystems für Neurotransmitterfreisetzungsstudien. Es konnte gezeigt werden, dass hippocampale Neuronen in potenziertem (= vorstimuliertem) Zustand auf einen zweiten Glutamat-Stimulus mit einer verringerten Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA reagieren. Dieser Effekt wird vermutlich über die ionotropen Glutamatrezeptoren (NMDA-, AMPA- und Kainat-Subtyp) vermittelt. In diesem Zusammenhang wurde die Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI) als Detektionsmethode zur qualitativen und quantitativen Neurotransmitteranalyse verwendet.

4 Ausblick

Um bei ungehinderter Neurotransmitter-Wiederaufnahme kurzfristige Stimulationseffekte besser nachweisen zu können, ist eine Verkürzung der Stimulationsdauer notwendig. Dazu müsste allerdings der Stimulationsvorgang automatisiert werden. Auf diesem Wege könnte auch eine erhebliche Steigerung des Probendurchsatzes sowie eine größere Reproduzierbarkeit erreicht werden (z.B. gleichzeitige Stimulation aller Wells einer 24-Well-Platte). Der Einsatz von Wiederaufnahme-Blockern ist in diesem Zusammenhang wenig

sinnvoll, da Wiederaufnahme-Transporter oftmals indirekt an der Neurotransmission beteiligt sind (siehe Diskussion 3). Für Untersuchungen zur Kinetik der Neurotransmitterfreisetzung ist der Einsatz eines Superfusionssystems mit gekoppelter Fraktionssammlung erforderlich.

Abgesehen von einer methodischen Verbesserung des Stimulationsvorgangs wäre auch der Nachweis anderer Neurotransmitter wünschenswert. Wie in der Einleitung angeführt, sind für die meisten Neurotransmitterklassen spezielle Derivatisierungs-, HPLC- und Detektionsmethoden beschrieben. Für die Catecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin sowie für die Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits entsprechende Protokolle entwickelt. Aufgrund der großen Vorteile der massenspektrometrischen Neurotransmitterdetektion ist die Anwendung dieser Detektionsmethode auf alle Neurotransmitterklassen anzustreben.

Bezüglich der Untersuchungen zur nikotinischen Modulation der basalen hippocampalen Glutamat- und GABA-Freisetzung sollten Experimente mit weiteren nAChR-Subtypenspezifischen Blockern (siehe Einleitung 4, Tabelle 1) durchgeführt werden. Auf diese Weise könnte geklärt werden, welche nAChR-Subtypen neben dem $\alpha 7$ -nAChR an der Modulation beteiligt sind. Zur Aufklärung möglicher Mechanismen der Nikotin/Galanthamin-modulierten Glutamat- und GABA-Freisetzung (prä-, postsynaptisch; direkt, indirekt) sind experimentelle Ansätze auf der Basis einzelner oder weniger Zellen erfolgversprechender.

Um die Relevanz der hier erhaltenen Ergebnisse für die hippocampale Neurotransmission *in situ* zu zeigen, bieten sich vergleichende Studien mit hippocampalen Gewebeschnitten an.

Da das nikotinische System nicht nur die glutamaterge und GABAerge Neurotransmission moduliert, sondern auch die Freisetzung anderer Neurotransmitter wie Noradrenalin, Dopamin und Serotonin beeinflusst (siehe Einleitung 4), wäre es auch sinnvoll, den Einfluss von Nikotin und insbesondere Galanthamin auf diese Neurotransmittersysteme zu untersuchen.

Unter Berücksichtigung der gezeigten modulatorischen Effekte von Nikotin und Galanthamin sollte auch der Einfluss dieser beiden nAChR-Liganden auf die Neurotransmitterfreisetzung während einer Glutamat-vermittelten Potenzierung untersucht werden. Entsprechende Versuche auf Ca-Imaging-Ebene wurden bereits durchgeführt (Pejovic, 2001).

Neben diesen Fragestellungen kann das hier entwickelte Testsystem in vielfältiger Weise zur Identifizierung und Charakterisierung von direkten und indirekten Modulatoren der Neurotransmitterfreisetzung eingesetzt werden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein biochemisches Testsystem etabliert, mit dem es möglich ist, die Freisetzung der Aminosäure-Neurotransmitter Glutamat und GABA aus neuronalem Gewebe auf dem Vielzellniveau zu untersuchen. Der qualitative und quantitative Nachweis der beiden Neurotransmitter erfolgte mit Hilfe der Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion (RP-HPLC-FLD). Mit dieser Methode konnten Glutamat und GABA bis zu einer Konzentration von ca. 50 fmol nachgewiesen werden.

Die Eignung des Testsystems für Neurotransmitterfreisetzungstudien wurde mit Hilfe von Depolarisationsexperimenten (Stimulation mit 60 mM K^+ für 3 min) an hippocampalen Synaptosomen und Primärkulturzellen nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass Zellen einer serumfreien Primärkultur (Anteil der Gliazellen kleiner als 0,5 %) für Neurotransmitterfreisetzungstudien besser geeignet sind als serumhaltige Kulturen (ungehemmtes Gliazellwachstum), da in letzteren ein erheblicher Anteil der freigesetzten Neurotransmitter durch Wiederaufnahmeaktivitäten der Gliazellen beseitigt wird.

Mit dem Testsystem wurden zwei Untersuchungsreihen durchgeführt.

1.) Es wurde der Einfluss des nAChR-Agonisten Nikotin und des allosterisch an nAChR wirkenden Liganden Galanthamin auf die basale Glutamat- und GABA-Freisetzung aus Zellen serumfreier hippocampaler Primärkulturen untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Versuche waren:

- Bei einer Stimulationsdauer von 3 min sind im Vergleich zur basalen Freisetzung keine oder sogar negativ modulierende Stimulationseffekte nachweisbar. Dies ist vermutlich auf verstärkt einsetzende nAChR-Desensibilisierung in Verbindung mit ungehinderter Neurotransmitterwiederaufnahme zurückzuführen.
- Bei einer Stimulationsdauer von 30 sec bewirkt Nikotin eine Erhöhung der basalen Glutamat- und GABA-Freisetzung.
- Galanthamin alleine beeinflusst die basale Glutamat- und GABA-Freisetzung nicht, hat aber unterschiedliche Wirkungen auf die positiv modulierenden Effekte von Nikotin. Im Falle der Glutamat-Freisetzung wirkt es potenzierend, auf die GABA-Freisetzung hingegen depotenzierend.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der für einzelne hippocampale Zellen beschriebene positiv modulatorische Effekt von Nikotin auf die glutamaterge und GABAerge

Neurotransmission auch auf dem Vielzellniveau über die Neurotransmitterfreisetzung nachweisbar ist. Desweiteren konnte erstmals gezeigt werden, dass die Nikotin-modulierte Glutamat- und GABA-Freisetzung durch den allosterisch wirkenden nAChR-Liganden Galanthamin signifikant beeinflusst wird. Die in den Ergebnissen sich zeigende Verstärkung der exzitatorischen hippocampalen Neurotransmission kann gedächtnisrelevante Prozesse entscheidend unterstützen und liefert somit eine Begründung für die allosterische Modulation an nAChR als Behandlungsstrategie für die Alzheimer'sche Demenz. Stimulationen in Anwesenheit des $\alpha 7$ - nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin (MLA) ergaben, dass die Effekte von Nikotin und Galanthamin auf die basale Glutamat-Freisetzung nur auf die Aktivierung von $\alpha 7$ -nAChR zurückzuführen sind, während an der nikotinischen Modulation der basalen GABA-Freisetzung neben dem $\alpha 7$ -nAChR noch weitere nAChR-Subtypen beteiligt sein können.

2.) Es wurde der Einfluss einer LTP-ähnlichen Glutamat-Potenzierung auf die GABA-Freisetzung aus serumfreien hippocampalen Primärkulturen untersucht. Das methodische Paradigma der Potenzierung bestand in einer zweimaligen Stimulation mit 50 μ M Glutamat für 30 sec in einem Abstand von 30 min. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen auf die zweite Stimulation mit einer verringerten Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA reagieren. Aus Experimenten mit spezifischen Antagonisten der einzelnen Glutamatrezeptor-Typen geht hervor, dass die Verringerung der GABA-Freisetzung im Wesentlichen über die Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren des NMDA-, AMPA- und Kainat-Subtyps erfolgt. Darüber hinaus wurde bei diesen Untersuchungen die Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisation (MS-ESI) als alternative Detektionsmethode zum qualitativen und quantitativen Neurotransmitternachweis in das Testsystem eingeführt.

Literaturverzeichnis

Alberts G., Lameris T., v.d. Meiracker A.H., Man in't Veld A.J., Boomsma F. (1999): Sensitive and specific method for the simultaneous determination of natural and synthetic catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylglycol in microdialysis samples. *J. Chromatogr. B* 730: 213-219.

Albuquerque E.X., Alkondon M., Pereira E.F.R., Castro N.G., Schrattenholz A., Barbosa C.T.F., Bonfante-Cabarcas R., Aracava Y., Eisenberg H.M., Maelicke A. (1997): Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Pharmacological characterisation and modulation of synaptic function. *J.Pharm. Exp. Ther.* 280: 1117-1136.

Albuquerque E.X., Pereira E.F.R., Mike A., Eisenberg H.M., Maelicke A., Alkondon M. (2000): Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats physiological and clinical relevance. *Beh. Brain Res.* 113: 131-141.

Alkondon M., Albuquerque E.X. (1993): Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons: I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 1455-1473.

Alkondon M., Albuquerque E.X. (1995): Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons: III. Agonist actions of the novel alkaloid epibatidine and analysis of type II currents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 771-782.

Alkondon M., Pereira E.F.R., Wonnacott S., Albuquerque E.X. (1992): Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* 41: 802-808.

Alkondon M., Pereira E.F.R., Barbosa C.T.F., Albuquerque E.X. (1997): Neuronal nicotinic receptor activation modulates γ -aminobutyric acid release from CA1 Neurons of rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 1396-1411.

Alkondon M., Pereira E.F.R., Eisenberg H.M., Albuquerque E.X. (1999): Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 19: 2693-2705.

Alkondon M., Reinhardt S., Lobron C., Hermsen B., Maelicke A., Albuquerque E.X. (1994): Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons: II. Rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by *in situ* hybridization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 494-506.

Allende J.E. (1988): GTP-mediated macromolecular interactions: the common features of different systems. *FASEB J.* 2: 2356-2367.

Allison L.A., Mayer G.S., Shroup R.E. (1984): o-Phthalaldehyde derivatives of amines for high-speed liquid chromatography / electrochemistry. *Anal. Chem.* 56: 1089-1096.

Amaral D.G., Witter M.P. (1995): Hippocampal Formation. In: *The rat nervous system, 2. ed.*; Paxinos G., ed., Academic Press, San Diego; pp. 443-485.

Andersen P. (1975): Organisation of hippocampal neurons and their interconnections. In: *The Hippocampus, Vol. 1*; Isaacson R.L. & Pribram K.R., eds., Plenum Press, New York; pp. 155-175.

Arendash G.W., Sanberg P.R., Senqstock G.J. (1995): nicotine enhances the learning and memory of aged rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 517-523.

Barrantes G E., Rogers A.T., Lindstrom J., Wonnacott S. (1995): α -Bungarotoxin binding sites in rat hippocampal and cortical cultures: initial characterisation, colocalisation with $\alpha 7$ subunits and up-regulation by chronic nicotine treatment. *Brain Res.* 672: 228-236.

Bashir Z.I., Bortolotto Z.A., Davies, C.H., Beretta N., Irving A.J., Seal A.J., Henley J.M., Jane D.E., Watkins J.C., Collingridge (1993): Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 363: 347-350.

Bergles D.E., Diamond J.S., Jahr C.E. (1999): Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Op. Neurobiol.* 9: 293-298.

Betz H. (1987): Biology and structure of the mammalian glycine receptor. *Trends Neurosci.* 10: 113-117.

Bianchi L., Della Corte L., Tipton K.F. (1999): Simultaneous determination of basal and evoked output levels of aspartate, glutamate, taurine and 4-aminobutyric acid during microdialysis and from superfused brain slices. *J. Chromatogr. B* 723: 47-59.

Bidlingmeyer B.A. (1992): Practical HPLC methodology and applications. *John Wiley & Sons, Inc., N.Y.*

Birks J.S., Melzer D. (2000): Donepezil for mild and moderate Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev:* 2, CD001190.

Bliss T.V., Lomø T.J. (1970): Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J. Physiol.* 207: 61P.

Bliss T.V., Lomø T.J. (1970): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356.

Bliss T.V., Gardner-Medwin A.R. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 357-374.

Block E. (2000): The use of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatives for HPLC/MS analysis of amino acids. *Waters Corporation, LC/MS market development group, AMD 35.*

Bradford H.F. (1986): The synaptosome, an *in vitro* model for the synapse. *In: Chemical Neurobiology; Freemann, New York; pp. 311-352.*

Brioni J.D., Decker M.W., Sullivan J.P., Arneric S.P. (1997): The pharmacology of (-)-nicotine and novel cholinergic channel modulators. *Adv. Pharmacol.* 37: 153-214.

Breeze C.R., Adams C., Logel J., Drebing C., Rollings Y., Barnhardt m., Sullivan B., Demasters B.K., Freedman R., Leonard S. (1997): Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ mRNA and [125 I]- α -Bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J. Comp. Neurol.* 387: 385-398.

Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K., Price P.J. (1993): Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented NeurobasalTM, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35: 567-576.

Brisson A., Unwin P.N.T. (1985): Quarternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315: 474-477.

Brown T.H., Zador A.M. (1990): Hippocampus. *In: The synaptic organisation of the brain, 3. ed.; Shepherd G.M., ed., Oxford University Press, New York; pp. 346-388.*

Castro N.G., Albuquerque E.X. (1993): Brief lifetime, fast-inactivating ion channels account for the α -bungarotoxin-sensitive nicotinic response in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 164: 137-140.

Changeux J.P. (1990): The TIPS lecture: The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends in Pharm. Sci.* 11: 485-491.

Chen L.J., Chen R.Z. (1999): Subtypes of central nicotinic receptors involved in learning and memory. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 20: 725-728.

Chen Q.X., Wong R.K. (1995): Suppression of GABAA receptor responses by NMDA application in hippocampal neurons acutely isolated from the adult guinea-pig. *J. Physiol.* 482 (Pt 2): 353-362.

Chiodini F.C., Tassonyi E., Hulo S., Bertrand D., Muller D. (1999): Modulation of synaptic transmission by nicotine and nicotinic antagonists in hippocampus. *Brain Res. Bull.* 48: 623-628.

Clarke P.B.S. (1993): Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic function. *Prog. Brain Res.* 98: 77-83.

Cohen S.A., Strydom D.J. (1988): Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. *Anal. Biochem.* 174: 1-16.

Colino A., Malenka, R.J (1993): Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 69: 1150-1159.

Collingridge G.L., Lester R.A.J. (1989): Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 40: 145-195

Collingridge G.L., Randall A.D., Davies C.H., Alford S. (1992): The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺-signalling in neurons. *Ciba Found. Symp.* 164: 162-171.

Copelman C.A., Cuzner M.L., Groome N., Diemel L.T. (2000): Temporal analysis of growth factor mRNA expression in myelinating rat brain aggregate cultures: increments in CNTF, FGF-2, IGF-I, and PDGF-AA mRNA are induced by antibody-mediated demyelination. *Glia* 30: 342-351.

Couturier S., Bertrand D., Matter J.M., Hernandez M.C., Bertrand S., Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M. (1990a): A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron* 5: 847-856.

Couturier J., Erkman D., Valera S., Rungger D., Bertrand S., Boulter J., Ballivet M., Bertrand D. (1990b): $\alpha 3$, $\alpha 5$ and non- $\alpha 3$: three clustered avian genes encoding neuronal acetylcholine receptor-related subunits. *J. Biol. Chem.* 265: 17560-17567.

Craig A.M., Blackstone C.D., Hujanir R.L., Banker G. (1993): The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10: 1055-1068.

Craig A.M., Blackstone C.D., Hujanir R.L., Banker G. (1994): Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12373-12377.

Daniels D.H., Joe F.L., Diachenko G.W. (1995): Determination of free glutamic acid in a variety of foods by high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 12: 21-29.

Davey J.F., Ersser R.S. (1990): Amino acid analysis of physiological fluids by high-performance liquid chromatography with phenylisothiocyanate derivatization and comparison with ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 528: 9-23.

Deneris E.S., Conolly J., Rogers S.W., Duvoisin R. (1991): Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 34-40.

- Dineley-Miller K., Patrick J. (1992):** Gene transcripts for the nicotinic acetylcholine receptor subunit, beta 4, are distributed in multiple areas of the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* 16: 339-344.
- Dominguez Del Toro E., Juiz J.M., Peng X., Lindstrom J., Criado M. (1994):** Immunocytochemical localisation of the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 349: 325-342.
- Duijn, van C.M., Hofman A. (1991):** Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *BMJ* 302: 1491-1494.
- Eisele J.L., Bertrand S., Galzi J.L., Devillers Thierry A., Changeux J.P., Bertrand D. (1993):** Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366: 479-483.
- Elgoyhen A.B., Johnson D.S., Boulter J., Vetter D.E., Heinemann S. (1994):** $\alpha 9$: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79: 705-715.
- Felix R., Levin E.D. (1997):** Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats. *Neuroscience* 81: 1009-1017.
- Fisher J.L., Dani J.A. (2000):** Nicotinic receptors on hippocampal cultures can increase synaptic glutamate currents while decreasing the NMDA-receptor component. *Neuropharmacology* 39: 2756-2769.
- Fitzsimonds R.M., Dichter M.A. (1996):** Heterologous modulation of inhibitory synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 75: 885-893.
- Frazier C.J., Rollins Y.D., Breese C.R., Leonard S., Freedman R., Dunwiddie T.V. (1998a):** Acetylcholine activates an α -Bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J. Neurosci.* 18: 1187-1995.
- Frazier C.J., Buhler A.V., Weiner J.L., Dunwiddie T.V. (1998b):** Synaptic potentials mediated via α -Bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 18: 8228-8235.
- Freedman R., Wetmore C., Strömberg I., Leonard S., Olson L. (1993):** α -Bungarotoxin binding to hippocampal interneurons: immunocytochemical characterization and effects on growth factor expression. *J. Neurosci* 13: 165-1975.
- Frerking M., Malenka R.C., Nicoll R.A. (1998):** Synaptic activation of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.* 1: 479-486.
- Friessmuth M., Casey P.J., Gilman A.G. (1989):** G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J.* 3: 2125-2131.
- Fu W-M., Liou H-C., Chen Y-H. (1998):** Nerve terminal currents induced by autoreception of acetylcholine release. *J. Neurosci.* 18: 9954-9961.
- Fujii S., Ji Z., Sumikawa K. (2000a):** Inactivation of alpha7 ACh receptors and activation of non-alpha7 ACh receptors both contribute to long term-potential induction in the hippocampal CA1 region. *Neurosci. Lett.* 286: 134-138.
- Fujii S., Yia Y., Yang A., Sumikawa K. (2000b):** Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal region. *Brain Res.* 863: 259-265.
- Fulton B., Benfield P. (1996):** Galanthamine. *Drugs Aging* 9: 60-65.

- Galzi J.L., Revah F., Black D., Gredner M., Hirth C., Changeux J.P. (1991):** Identification of a novel amino acid α -Tyr 93 within the active site of acetylcholine receptor by photo affinity labeling: Additional evidence for a three loop model of the acetylcholine binding site. *J. Biol. Chem.* 265: 10430-10437.
- Gamberino W.C., Gold M.S. (1999):** Neurobiology of tobacco smoking and other addictive disorders. *Psychiatr. Clin. North Am.* 22: 302-312.
- Gegelashvili G., Schousboe A. (1998):** Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* 45: 233-238.
- Gioanni Y., Rougeot C., Lepoussé C., Thierry A.M., Vidal C. (1999):** nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur. J. Neurosci.* 11: 18-30.
- Gotti C., Hanke W., Maury K., Moretti M., Ballivet M., Clementi F., Bertrand D. (1994):** Pharmacology and biophysical properties of the $\alpha 7$ and $\alpha 7$ - $\alpha 8$ α -bungarotoxin receptors immunopurified from the chick optic lobe. *Eur. J. Neurosci.* 6: 1281-1291.
- Gray R., Rajan A.S., Radcliffe K.A., Yakehiro M., Dani J.A. (1996):** Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations to nicotine. *Nature* 383: 713-716.
- Grewal P., Yoshida T., Finch C.E., Morgan T.E. (1997):** Scavenger receptor mRNAs in rat brain microglia are induced by kainic acid lesioning and by cytokines. *Neuroreport* 8: 1077-1081.
- Harris K.M., Miller R.J. (1989):** Excitatory amino acid-evoked release of [3 H]-GABA from hippocampal neurons in culture. *Brain Res.* 482: 23-33.
- Herrero M.T., Oset-Gasque M.J., Canadas S., Vicente S., González M.P. (1998):** Effect of various depolarizing agents on endogenous aminoacid neurotransmitter release in rat cortical neurons in culture. *Neurochem. Int.* 32: 257-264.
- Higgins, D., Banker, G. (1998):** Primary dissociated cell cultures. *In: culturing nerve cells, 2. ed.; Banker G. and Goslin K., eds., MIT Press; pp. 37-78.*
- Hof P.R., Cox K., Morrison J.H. (1990a):** Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp. Neurol.* 301: 44-54.
- Hof P.R., Cox K., Morrison J.H. (1990b):** Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. primary and secondary visual cortex. *J Comp. Neurol.* 1990 301: 55-64.
- Hoffman A.J., Maxwell D.M., Nichols D.E. (1986):** A simple organ bath for electrical stimulation and superfusion of rat brain slices. *J. Pharmacol. Methods* 16: 185-199.
- Hollmann M., Heinemann S. (1994):** Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.
- Hoyert D.L., Rosenberg H.M. (1997):** Alzheimer's disease as a cause of death in the United States. *Public Health Rep.* 112: 497-505.
- Hoyert D.L., Rosenberg H.M. (1999):** mortality from Alzheimer's disease: an update. *Natl. Vital. Stat. Rep.* 47: 1-8.
- Hu G., Duffy P., Swanson C., Ghasemzadeh M.B., Kalivas P.W. (1999):** The regulation of dopamine transmission by metabotropic glutamate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 412-416.
- Hunter B.E., de Fiebre C.M., Papke R.L., Kern W.R., Meyer E.M. (1994):** A novel nicotinic agonist facilitates induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 168: 130-134.

- Hunzinger C. (1998):** Expression der $\alpha 7$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholin-rezeptors im sich entwickelnden Hippocampus der Ratte (Diplomarbeit). *Universität Mainz, Fachbereich Biologie*.
- Ikonomovic M.D., Mizukami K., Warde D., Sheffield R., Hamilton R., Wenthold R.J., Armstrong D.M. (1999):** Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of normal elderly and patients with Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 160: 194-204.
- Imoto K., Busch C., Sakmann B., Mishina M., Mori Y., Konno T., Fukuda K., Kurasaki M., Bujo H., Fujita Y., Numa S. (1988):** Rings of negatively charged aminoacids determining the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335: 645-648.
- Imoto K., Methfessel C., Sakmann B., Mishina M., Mori Y., Konno T., Fukuda K., Kurasaki M., Bujo H., Fujita Y., Numa S. (1986):** Location of a delta-subunit region determining the ion transport through the acetylcholine receptor channel. *Nature* 324: 670-674.
- Ioannou N., Georgopoulos A., Liapi C., Palaiologos G. (1998):** Determination of glutamate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection in superfusates of rat brain preparations. *Anal. Biochem.* 264: 82-86.
- Ishida J., Yoshitake T., Fujino K., Kawano K., Kehr J., Yamaguchi M. (1998):** Serotonin monitoring in microdialysate by microbore-liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 365: 227-232.
- Ishihara K., Alkondon M., Monte J.G., Albuquerque E.X. (1995):** Nicotinic responses in acutely dissociated rat hippocampal neurons and the selective blockade of fast-desensitizing nicotinic responses by lead. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 1471-1482.
- Izumi Y., Zorumski C.F (1998):** LTP in CA1 of the adult rat hippocampus and voltage-activated calcium channels. *Neuroreport* 9: 3689-3691.
- Ji D., Dani J.A. (2000):** Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J. Neurophysiol.* 83: 2682-2690.
- Jones B.N., Gilligan J.P. (1983):** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reverse-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* 266: 471-482.
- Jones S., Yakel J.L. (1997):** Functional nicotinic Ach receptors on interneurons in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 504: 603-610.
- Kai M., Iida H., Nohta H., Lee M.-K., Ohta K. (1998):** Fluorescence derivatizing procedure for 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid using 1,2-diphenylethylenediamine reagent and their sensitive liquid chromatographic determination. *J. Chromatogr. B* 720: 25-31.
- Kaiser S., Wonnacott S. (2000):** Alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors indirectly modulate [(3)H] dopamine release in rat striatal slices via glutamate release. *Mol. Pharmacol.* 58: 312-318.
- Kamisaki Y., Wada K., Nakamoto K., Itoh T. (1996):** Release of taurin and its effects on release of neurotransmitter amino acids in rat cerebral cortex. In: *Taurine 2; Huxtable et al., eds., Plenum Press, New York; pp. 445-454.*
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (2000):** Principles of neural science. 4. ed.; *MacGraw Hill, New York.*
- Kauer J.A., Malenka R.C., Nicoll R.A (1988):** A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1: 911-917.

Keyser K., Britto L., Schoepfer R., Whiting P., Cooper J., Conroy W, Brozowska-Prechtl A., Karten H., Lindstrom J. (1993): Three subtypes of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J. Neurosci.* 13: 442-454.

Kihara T., Shimohama S., Sawada H., Kimura J., Kume T., Kochiyama H., Maeda T., Akaike A. (1997): Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β -amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* 42: 159-163.

Kihara T., Shimohama S., Urushitani M., Sawada H., Kimura J., Kume T., Maeda T., Akaike A. (1998): Stimulation of α 4 β 2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity. *Brain Res.* 792: 331-334.

Klapproth H., Reinheimer T., Metzen J., Münch M., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Höhle K.D., Schemann M., Racké K., Wessler I. (1997): Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355: 515-523.

Krogsgaard-Larsen P., Frølund B., Frydenvang K. (2000): GABA uptake inhibitors. Design molecular pharmacology and therapeutic aspects. *Curr. Pharm. Des.* 6: 1193-1209.

Lämmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Law R.M., Stafford A., Quick M.W. (2000): Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 4: 23986-23991.

Lefkowitz R.J., Caron M.G. (1988): Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 4993-4996.

Léna C., Changeux J.P. (1997): Role of Ca^{2+} ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J. Neurosci.* 17: 576-585.

Le Novere N., Changeux J.P. (1995): Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40: 155-172.

Levin E.D. (1992): Nicotinic systems and cognitive functions. *Psychopharmacology* 108: 417-431.

Li X., Rainnie D.G., McCarley R.W., Greene R.W. (1998): Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J. Neurosci.* 18: 1904-1912.

Lindroth P., Mopper K. (1979): High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51: 1667-1674.

Liu H., Sanuda-Pena M.C., Harvey-White J.D., Kalra S., Cohen S.A. (1998): Determination of submicromolar concentrations of neurotransmitter amino acids by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate method for amino acid analysis. *J. Chromatogr. A* 828: 383-395.

Liu Q.Y., Schaffner A.E., Chang Y.H., Maric D., Barker J.L. (2000): Persistent activation of GABA(A) receptor/Cl(-) channels by astrocyte-derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 84: 1392-1403.

López E., Arce C., Vicente S., Oset-Gasque M.J., González M.P. (2001): Nicotinic receptors mediate the release of amino acid neurotransmitters in cultured cortical neurons. *Cerebral Cortex* 11: 158-163.

Maelicke A. (1988): Structure and function of the nicotinic acetylcholine receptor. *In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 86; Springer, Berlin; pp. 267-313.*

Maelicke A. (1992): The nicotinic acetylcholine receptor towards the structure-function relationship. *In: Receptor subunits and complexes; Cambridge University Press, Cambridge; pp. 119-162.*

Maelicke A., Albuquerque E.X. (2000): Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol. 393: 165-170.*

Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E.X., Zerlin M. (2001): Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry 49: 279-288.*

Maguire C., Casey M., Kelly A., Mullany P.M., Lynch M.A. (1999): Activation of tyrosine receptor kinase plays a role in expression of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Hippocampus 9: 519-526.*

Malenka R.C. (1991): The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation. *Mol. Neurobiol. 5: 289-295.*

Malgaroli A., Tsien R.W. (1992): Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature 357: 134-139.*

Mansfelder H.D., McGehee D.S. (2000): Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron 27: 349-357.*

Maricq A.V., Peterson A.S., Brake A.J., Myers R.M., Julius D. (1991): Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated channel. *Science 254: 432-437.*

Márquez F.-J., Quesada A.-R., Sanchez-Jimenez F., Núñez de Castro I. (1986): Determination of 27 dansyl amino acid derivatives in biological fluids by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. 380: 275-283.*

Martini R., Schachner M. (1997): Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia 19: 298-310.*

McMahon H.T., Nichols D.G. (1991): Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and trigger by localized Ca²⁺. *J. Neurochem. 56: 86-94.*

McMahon J.J., Kauer J.A. (1997): Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity. *Neuron 18: 295-305.*

McQuiston A.R., Madison D.V. (1999): Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci. 19: 2887-2896.*

Middlemiss, D.N., Hutson P.H. (1990): Measurement of the *in vitro* release of endogenous neurotransmitters as a means of identification of prejunctional receptors. *J. Neurosci. Methods 34: 23-28.*

Miller R.J. (1998): Presynaptic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38: 201-227.*

Min M.-Y., Melyan Z., Kullmann D.M. (1999): Synaptically released glutamate reduces γ -aminobutyric acid (GABA)_Aergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9932-9937.*

Minnema D., Michaelson I.A. (1985): A superfusion apparatus for the examination of neurotransmitter release from synaptosomes. *J. Neurosci. Methods 14: 193-206.*

Mody I. (1998): Interneurons and the ghost of the sea. *Nat. Neurosci. 1: 434-436.*

Nicholls D.G. (1989): Release of glutamate, aspartate, and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52: 331-341.

Nicholls D.G., Sihra T.S., Sanchez-Prieto J. (1987): Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49: 50-57.

Nicholls J.G., Martin R.A., Wallace B.G. (1995): Vom Neuron zum Gehirn. *Urban & Fischer, München.*

Nordberg A., Lundqvist A., Hartvig P., Lidja A., Langibom B. (1995): Kinetic analysis of regional (S)-(-) 11C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains: *in vivo* assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis. Assoc. Discord.* 9: 21-27.

Nohta H., Yukizawa T., Ohkura Y., Yoshimura M., Ishida J., Yamaguchi M. (1997): Aromatic glycinonitriles and methylamines as pre-column fluorescence derivatization reagents for catecholamines. *Anal. Chim. Acta* 344: 233-240.

Nordberg A., Winblad B. (1986): Reduced number of [(3)H] nicotine and [(3)H] acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci. Lett.* 72: 115-119.

Park D.S., Morris E.J., Stefanis L., Troy C.M., Shelanski M.L., Geller H.M., Greene L.A. (1998): Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF Deprivation, and Oxidative Stress. *J. Neurosci.* 18: 830-840.

Pejovic V. (2001): Glutamate-induced potentiation of Calcium influx in primary hippocampal culture neurons (Doctoral thesis). *University of Mainz, Department of Chemistry and Pharmacy.*

Pereira E.F.R., Alkondon M., Reinhardt S., Maelicke A., Peng X., Linstrom J., Whiting P., Albuquerque E.X. (1994): Physostigmine and galanthamine characterize the presence of the novel binding site on the $\alpha 4\beta 2$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in fibroblast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 768-778.

Pereira E.F.R., Reinhardt S., Schratzenholz A., Maelicke A., Albuquerque E.X. (1993): Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 1474-1491.

Perry E., Morris C., Court J., Cheng A., Fairbairn A., McKeith I., Irving D., Brown A., Perry R. (1995): Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy Body Dementia and Alzheimer's disease, possible index of early neuropathology. *Neuroscience* 64: 385-395.

Peterson C.L., Thompson M.A., Martin D., Nadler J.V. (1995): Modulation of glutamate and aspartate release from slices of hippocampal area CA1 by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *J. Neurochem.* 64: 1152-1160.

Phelan K.D., Gallagher J.P. (1992): Direct muscarinic and nicotinic receptor-mediated excitation of rat medial vestibular nucleus neurons *in vitro*. *Synapse* 10: 349-358.

Pritchett D.B., Luddens H., Seeburg P.H. (1989): Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* 245: 1389-1392.

Qizilbash N., Birks J., López-Arrieta J., Lewington S., Szeto S. (2000): Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*: 2, CD000202.

Radcliffe K.A., Dani J.A. (1998): Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. *J. Neurosci.* 18: 7075-7083.

Radcliffe K.A., Fisher J.L., Gray R., Dani J.A. (1999): Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 868: 591-610.

- Raferty M.A., Hunkapillar M.W., Strader C.D., Hood L.E. (1980):** Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208: 1454-1457.
- Reid M.S., Fox L., Ho L.B., Berger S.P. (2000):** Nicotine stimulation of extracellular glutamate levels in the nucleus accumbens: neuropharmacological characterization. *Synapse* 35: 129-136.
- Revah F., Galzi J.L., Girandat J., Haumont P.Y., Lederer F., Changeux J.P. (1990):** The noncompetitive blocker [³H]-chlorpromazine labels three aminoacids of the acetylcholine receptor γ -subunit: implication for the α -helical organisation of the M2 segments and the structure of the ion channel. *Proc. Natl. Acad. Science* 87: 4875-4679.
- Revest P., Longstaff, A. (1998):** Molecular Neuroscience. *Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford.*
- Rodriguez-Moreno A., Herreras O., Lerma J. (1997):** Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19: 893-901.
- Roisin M.P., Brassart J.L., Charton G., Crepel V., Ben Ari Y. (1991):** A new method for the measurement of endogenous transmitter release in localized regions of hippocampal slices. *J. Neurosci. Methods* 37: 183-189.
- Role L.W., Berg D.K. (1996):** Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16: 1077-1085.
- Rothman S., Cowan W.M. (1981):** A scanning electron microscope study of the in vitro development of dissociated hippocampal cells. *J. Comp. Neurol.* 195: 141-155.
- Rothstein J.D., Dykes-Hoberg M., Pardo C.A., Bristol L.A., Jin L., Kuncl R.W., Kanai Y., Hediger M.A., Wang Y., Schielke J.P., Welty D.F. (1996):** Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686.
- Rowley H.L., Martin K.F., Marsden C.A. (1995):** Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J. Neurosci. Methods* 57: 93-99.
- Samochocki M., Zerlin M., Jostock R., Kormelink J.G., Luyten W.H.M., Albuquerque E.X., Maelicke A. (2000):** Galantamine is an allosterically potentiating ligand of the human $\alpha 4/\beta 2$ -nAChR. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 176: 68-73.
- Samuel N., Wonnacott S., Lindstrom J., Futerman A.H. (1997):** Parallel increases in [α -¹²⁵I] bungarotoxin binding and $\alpha 7$ nicotinic subunit immunoreactivity during the development of rat hippocampal neurons in culture. *Neurosci. Lett.* 222: 179-182
- Sawada S., Yamamoto C., Ohno-Shosaku T. (1994):** Long-term potentiation in the dentate gyrus, and the effects of nicotine. *Neurosci. Res.* 20: 323-329
- Schoepfer R., Conroy W., Whiting P., Gore M., Lindstrom J. (1990):** Brain α -bungarotoxin binding protein cDNAs and mAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron* 5: 35-48.
- Schrattenholz A., Pereira E.F.R., Roth U., Weber K.-H., Albuquerque E.X., Maelicke A. (1996):** Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol. Pharmacol.* 49: 1-6.
- Schröder H., Giacobini E., Struble R.G., Zilles K., Maelicke A. (1991):** Nicotinic cholinergic neurons of the frontal cortex are reduced in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 12: 259-262.

Scopes R.K. (1998): Protein purification: principles and practice. *Springer, New York Inc.*

Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J.A., Patrick J.W. (1993): Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain $\alpha 7$: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* 13: 596-604.

Shepherd, M (1998): The synaptic organisation of the brain. 4. ed.; *Oxford University Press, Oxford.*

Smit A.B., Syed N.I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K.S., Lodder H., van der Schors R.C., van Elk R., Sorgedrager B., Brejc K., Sixma T.K. Geraerts W.P.M. (2001): A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411: 261-268.

Smith S., Sharp T. (1992): In vivo measurement of extracellular GABA in rat nucleus accumbens: improved methodology. *Br. J. Pharmacol.* 107: 210P.

Socci D.J., Sanberg P.R., Arendash G.W. (1995): Nicotine enhances Morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiol. Aging* 16: 857-860.

Soderling T.R., Derkach V.A. (2000): Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 23: 75-80.

Sonders M.S., Amara S.G. (1996): Channels in transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 294-302.

Stocchi V., Piccoli G., Magnani M., Palma F., Biagiarelli B., Cucchiari L. (1989): Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of dimethylamino-azobenzene sulfonyl- and dimethylaminoazobenzene thiohydantoin-amino acid derivatives for amino acid analysis and microsequencing studies at the picomole level. *Anal Biochem.* 178: 107-117.

Storch A., Schrattenholz A., Cooper J.C., Abdel Ghani E.M., Gutbrod O., Weber K.H., Reinhardt S., Lobron C., Hermsen B., Soskic V., Pereira E.F.R., Albuquerque E.X., Methfessel C., Maelicke A. (1995): Physostigmine, galanhtamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 290: 207-219.

Svedas V.-J.K., Galaev I.J., Borisov I.L., Berezin I.V. (1980): The interaction of amino acids with o-phthalaldehyde: a kinetic study and spectrophotometric assay of the reaction product. *Anal. Biochem.* 101: 188-195.

Takei N., Tsukui H., Kumakura K., Hatanaka H. (1990): Monitoring of acetylcholine released from postnatal rat basal forebrain cholinergic neurons cultured on membrane filter by cell bed perfusion system and HPLC-ECD. *Exp. Neurol.* 108: 229-231.

Tanaka K., Watase K., Manabe T., Yamada K., Watanabe M., Takahashi K., Iwama H., Nishikawa T., Ichihara N., Kikuchi T., Okuyama S., Kawashima N., Hori S., Takimoto M., Wada K. (1997): Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276: 1699-1702.

Taylor P., Schumacher K., Macphee-Quigley K., Friedmann T., Taylor S. (1987): The structure of acetylcholinesterase: relationship to its function and cellular disposition. *Trends Neurosci.* 10: 93-95.

Teyler T.J., Cavus I., Coussens C., DiScenna P., Grover L., Lee Y.P., Little Z. (1994): Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 4: 623-634.

Todorov L.D., Mihaylova-Todorova S., Craviso G.L., Bjur R.A., Westfall D.P. (1996): Evidence for the release of the cotransmitters ATP and noradrenaline from sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 496: 731-748.

- Turner T.J., Goldwin S.M. (1989):** Multiple components of synaptosomal [³H]-GABA release resolved by a rapid superfusion system. *Biochemistry* 28: 586-593.
- Ullian E.M., Sapperstein K., Christopherson K.S., Barres B.A. (2001):** Control of synapse number by glia. *Science* 291: 657-661.
- Unger K.K. (Ed.) (1989):** Handbuch der HPLC, Teil 1-Leitfaden für Anfänger und Praktiker. *GIT Verlag GmbH Darmstadt*.
- Vannucci S.J., Maher F., Simpson I.A. (1997):** Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21: 2-21.
- Verhage M., Besselsen E., Lopez da Silva F.H., Ghijsen W.E.J.M. (1989):** Ca²⁺-dependent regulation of presynaptic stimulus-secretion coupling. *J. Neurochem.* 53: 1188-1194.
- Verhage M., Ghijsen W.E.J.M., Boomsma F., Lopez da Silva F.H. (1992):** Endogenous noradrenaline and dopamine in nerve terminals of the hippocampus: differences in levels and release kinetics. *J. Neurochem.* 59: 881-887.
- Verhage M., McMahon H.T., Ghijsen W.E.J.M., Boomsma F., Scholten G., Wiegant M., Nicholls D.G. (1991):** Differential release of amino acids, neuropeptides and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron* 6: 517-524.
- Wada E., Wade A., Boulter J., Deneris E., Heinemann S., Patrick J., Swanson L.W. (1989):** Distribution of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\beta 2$ neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 784: 314-335.
- Wada E., McKinnon D., Heinemann S., Patrick J., Swanson L.W. (1990):** The distribution of mRNA by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family ($\alpha 5$) in the rat central nervous system. *Brain Res.* 526: 45-53.
- West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C. (1994):** Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal aging and Alzheimer's disease. *Lancet* 344: 769-772.
- Wevers A., Monteggia L., Lowack S., Bloch W., Schütz U., Lindstrom J., Pereira E.F.R., Arneric S., Sullivan J., Eisenberg H., Giacobini E., Gass P., deVos R.A.L. Jansen S.E.N.H., Maelicke A., Albuquerque E.X., Schröder H. (1999):** Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease – histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated τ -protein. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2551-2555.
- Whitehouse P.J., Martino A.M., Antuono P.G. (1986):** Nicotinic acetylcholine binding sites in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1: 55-65.
- Whiting P.J., Liu R., Morley B.J., Lindstrom J.M. (1987):** Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* 7: 4005-4016.
- Witthaus E., Ott A., Barendrecht J.J., Breteler M., Bonneux L. (1999):** Burden of mortality and morbidity from dementia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1999 13: 176-81
- Wonnacott S. (1997):** Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20: 92-98.
- Zarei M.M., Radcliffe K.A., Chen D., Patrick J.W., Dani J.A. (1999):** Distributions of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 88: 755-764.
- Zhang M., Wang Y.T., Vyas D.M., Neuman R.S., Bieger D. (1993):** Nicotinic cholinergic-mediated excitatory postsynaptic potentials in rat nucleus ambiguus. *Exp. Brain Res.* 96: 83-88.

Zhang Z.-W., Vijayaraghavan S., Berg D.K. (1994): Neuronal acetylcholine receptors that bind α -bungarotoxin with high affinity function as ligand-gated ion channels. *Neuron* 12: 167-177.

Zhou M., Peterson C.L., Lu Y.-B., Nadler J.V. (1995): Release of glutamate and aspartate from CA1 synaptosomes: selective modulation of aspartate release by ionotropic glutamate receptor ligands. *J. Neurochem.* 64.

Zhu P.J., Chiappinelli V.A. (1999): Nicotine modulates evoked GABAergic transmission in the brain. *J. Neurophysiol.* 82: 3041-3045.

Anhang

Statistik zu den Stimulationsexperimenten der Abschnitte 1.3.2 – 2.3

Im Folgenden sind die Daten zu den Experimenten der Abschnitte 1.3.2 - 2.3 zusammengestellt. Analysen zur statistischen Signifikanz der gemessenen Werte wurden mit Hilfe des unabhängigen T-Tests für zwei Populationen (Signifikanzebene von 0,05) durchgeführt. In den Experimenten der Abschnitte 1.3.2 - 2.1 (Abb. 27, 29 und 31) wurden dazu die gegen den Basalwert normalisierten Ratio-Werte AUC_X/AUC_{Basal} ($X = K^+$, Nikotin, Galanthamin oder Nikotin/Galanthamin) für Glutamat und GABA verwendet, in den Experimenten der Abschnitte 2.2 und 2.3 (Abb. 32-35) die originären AUC-Werte.

Verwendete Abkürzungen: AUC: Area under Curve; CSF: artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit; Depol.: Depolarisation; n: Anzahl der Experimente; sd: Standardabweichung; sem: Standardfehler des Mittelwertes; (Serum) +, - : Serumhaltige bzw. serumfreie Kultur; Stat. Sig.: Statistische Signifikanz.

Abschnitt 1.3.2: K^+ -stimulierte Freisetzung aus hippocampalen Synaptosomen

Abbildung 27: K^+ -stimulierte Freisetzung von Glutamat und GABA aus hippocampalen Synaptosomen.

Glutamat

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC_X/AUC_{Basal} | sd | sem | n |
|----------------------|--------------------------------|-------|-------|---|
| CSF (Basal) | 1 | -- | -- | 8 |
| 60 mM K^+ (Depol.) | 1,701 | 0,293 | 0,111 | 8 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|------------------|-------|-----------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Depol. | 6,339 | $3,73 \times 10^{-5}$ | *** |

GABA

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC_X/AUC_{Basal} | sd | sem | n |
|----------------------|--------------------------------|-------|------|---|
| CSF (Basal) | 1 | -- | -- | 8 |
| 60 mM K^+ (Depol.) | 1,618 | 0,119 | 0,04 | 8 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|------------------|--------|------------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Depol. | 15,556 | $4,42 \times 10^{-11}$ | *** |

Abschnitt 1.3.3: K⁺-stimulierte Freisetzung aus hippocampalen Primärkulturzellen – Vergleich zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultur

Abbildung 29: K⁺-stimulierte Freisetzung von Glutamat und GABA aus serumhaltiger und serumfreier HiPK.

Glutamat

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC _x /AUC _{Basal} | sd | sem | n |
|--|---|-------|-------|---|
| CSF (Basal) | 1 | -- | -- | 8 |
| 60 mM K ⁺ , Serum + (Depol +) | 1,498 | 0,158 | 0,056 | 8 |
| 60 mM K ⁺ , Serum – (Depol –) | 2,95 | 1,456 | 0,55 | 8 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|---------------------|-------|------------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Depol + | 8,896 | 3,9 x 10 ⁻⁷ | *** |
| Basal vs. Depol – | 3,809 | 0,002 | ** |
| Depol + vs. Depol – | 2,818 | 0,015 | * |

GABA

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC _x /AUC _{Basal} | sd | sem | n |
|--|---|-------|-------|---|
| CSF (Basal) | 1 | -- | -- | 8 |
| 60 mM K ⁺ , Serum + (Depol +) | 1,322 | 0,227 | 0,076 | 8 |
| 60 mM K ⁺ , Serum – (Depol –) | 2,543 | 0,683 | 0,228 | 8 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|---------------------|---------|-------------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Depol + | 4,25574 | 6,04 x 10 ⁻⁴ | *** |
| Basal vs. Depol – | 6,7743 | 4,47 x 10 ⁻⁶ | *** |
| Depol + vs. Depol – | 5,0864 | 1,1 x 10 ⁻⁴ | *** |

Abschnitt 2.1: Modulation durch Nikotin und Galanthamin – Vorversuche

Abbildung 31: Einfluss von Nikotin und Galanthamin auf die basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK.

Glutamat**WERTE:**

| Stimulus | Mittelwert AUC_x/AUC_{Basal} | sd | sem | n |
|-------------------------------|--------------------------------|-------|--------|---|
| CSF (Basal) | 1 | -- | -- | 6 |
| 100 μ M Nikotin | 0,974 | 0,301 | 0,114 | 6 |
| 1 μ M Galanthamin | 1,014 | 0,129 | 0,0578 | 6 |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal | 0,648 | 0,143 | 0,058 | 6 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|-------------------------|--------|-----------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Nikotin | -0,226 | 0,825 | ns |
| Basal vs. Galanthamin | 0,293 | 0,776 | ns |
| Basal vs. Nik/Gal | -6,562 | $4,07 \times 10^{-5}$ | *** |
| Nikotin vs. Galanthamin | 0,275 | 0,789 | ns |
| Nikotin vs. Nik/Gal | -2,421 | 0,034 | * |
| Galanthamin vs. Nik/Gal | -4,409 | 0,002 | ** |

GABA**WERTE:**

| Stimulus | Mittelwert AUC_x/AUC_{Basal} | sd | sem | n |
|-------------------------------|--------------------------------|-------|-------|---|
| CSF (Basal) | 1 | | | 6 |
| 100 μ M Nikotin | 1,053 | 0,095 | 0,043 | 6 |
| 1 μ M Galanthamin | 0,97 | 0,12 | 0,049 | 6 |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal | 0,92 | 0,155 | 0,063 | 6 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|-------------------------|--------|-------|-----------------------------------|
| Basal vs. Nikotin | 0,955 | 0,364 | ns |
| Basal vs. Galanthamin | -0,556 | 0,592 | ns |
| Basal vs. Nik/Gal | -1,073 | 0,309 | ns |
| Nikotin vs. Galanthamin | -1,187 | 0,263 | ns |
| Nikotin vs. Nik/Gal | -1,627 | 0,132 | ns |
| Galanthamin vs. Nik/Gal | -0,617 | 0,55 | ns |

Abschnitt 2.2: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin- und Galanthamin-modulierte Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK

Abbildung 32: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK.

Glutamat

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|---------------------|----------------|-------|-------|----|
| CSF (Basal) 30" | 25,550 | 4,014 | 1,269 | 11 |
| 100 µM Nikotin 30" | 33,263 | 6,589 | 2,084 | 11 |
| CSF (Basal) 180" | 20,733 | 4,049 | 1,653 | 5 |
| 100 µM Nikotin 180" | 21,750 | 4,725 | 1,929 | 5 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|-----------------------------|------|-------|-----------------------------------|
| Basal 30" vs. Nikotin 30" | 3,16 | 0,005 | ** |
| Basal 180" vs. Nikotin 180" | 0,4 | 0,697 | ns |

GABA

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|---------------------|----------------|--------|-------|----|
| CSF (Basal) 30" | 20,633 | 5,442 | 1,571 | 11 |
| 100 µM Nikotin 30" | 29,417 | 11,320 | 3,268 | 11 |
| CSF (Basal) 180" | 19,360 | 5,560 | 2,500 | 5 |
| 100 µM Nikotin 180" | 19,960 | 6,212 | 2,778 | 5 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|-----------------------------|-------|--------|-----------------------------------|
| Basal 30" vs. Nikotin 30" | 2,422 | 0,0241 | * |
| Basal 180" vs. Nikotin 180" | 0,161 | 0,876 | ns |

Abbildung 33: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Galanthamin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK.

Glutamat

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|----------------------------|----------------|-------|-------|---|
| CSF (Basal) 30" | 31,533 | 7,990 | 3,262 | 6 |
| 1 μ M Galanthamin 30" | 31,467 | 7,367 | 3,008 | 6 |
| CSF (Basal) 180" | 28,067 | 5,379 | 2,196 | 6 |
| 1 μ M Galanthamin 180" | 26,683 | 3,785 | 1,545 | 6 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|---------------------------------|--------|-------|-----------------------------------|
| Basal 30" vs. Galanthamin 30" | -0,015 | 0,988 | ns |
| Basal 180" vs. Galanthamin 180" | -0,515 | 0,618 | ns |

GABA

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|----------------------------|----------------|-------|-------|---|
| CSF (Basal) 30" | 20,450 | 3,464 | 1,269 | 6 |
| 1 μ M Galanthamin 30" | 21,200 | 4,202 | 1,716 | 6 |
| CSF (Basal) 180" | 21,820 | 8,712 | 3,896 | 6 |
| 1 μ M Galanthamin 180" | 21,425 | 8,281 | 3,704 | 6 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|---------------------------------|--------|-------|-----------------------------------|
| Basal 30" vs. Galanthamin 30" | 0,351 | 0,733 | ns |
| Basal 180" vs. Galanthamin 180" | -0,073 | 0,943 | ns |

Abbildung 34: Einfluss der Stimulationsdauer auf die Nikotin/Galanthamin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK.

Glutamat

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|--------------------------|----------------|-------|-------|----|
| CSF (Basal) 30" | 25,780 | 4,211 | 0,911 | 18 |
| 100 µM Nik/1 µM Gal 30" | 37,192 | 6,369 | 1,388 | 18 |
| CSF (Basal) 180" | 22,920 | 3,993 | 1,630 | 5 |
| 100 µM Nik/1 µM Gal 180" | 17,583 | 4,474 | 1,826 | 5 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|-----------------------------|--------|-----------------------|-----------------------------------|
| Basal 30" vs. Nik/Gal 30" | 6,306 | $5,94 \times 10^{-7}$ | *** |
| Basal 180" vs. Nik/Gal 180" | -2,308 | 0,044 | * |

GABA

WERTE:

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|--------------------------|----------------|-------|-------|----|
| CSF (Basal) 30" | 23,032 | 6,224 | 1,327 | 18 |
| 100 µM Nik/1 µM Gal 30" | 19,720 | 4,128 | 0,880 | 18 |
| CSF (Basal) 180" | 30,460 | 3,182 | 1,423 | 5 |
| 100 µM Nik/1 µM Gal 180" | 28,960 | 3,570 | 1,596 | 5 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|-----------------------------|-------|-------|-----------------------------------|
| Basal 30" vs. Nik/Gal 30" | -2,08 | 0,044 | * |
| Basal 180" vs. Nik/Gal 180" | -0,98 | 0,356 | ns |

Abschnitt 2.3: Einfluss des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin

Abbildung 35: Einfluss des $\alpha 7$ -nAChR-spezifischen Antagonisten Methyllycaconitin (MLA) auf die Nikotin- und Nikotin/Galanthamin-modulierte basale Freisetzung von Glutamat und GABA aus HiPK.

Glutamat**WERTE:**

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|---|----------------|-------|-------|---|
| CSF (Basal) | 26,880 | 4,992 | 2,232 | 4 |
| 100 μ M Nikotin | 36,180 | 3,170 | 1,418 | 4 |
| 100 μ M Nikotin + 1 μ M MLA | 29,200 | 2,272 | 1,016 | 4 |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal | 41,500 | 3,640 | 1,820 | 4 |
| 100 μ M Nik/1 μ M Gal + 1 μ M MLA | 29,980 | 4,481 | 2,004 | 4 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|---------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Nikotin | 3,517 | 0,008 | ** |
| Basal vs. Nikotin + MLA | 0,946 | 0,372 | ns |
| Basal vs. Nik/Gal | 4,884 | 0,002 | ** |
| Basal vs. Nik/Gal + MLA | 1,033 | 0,332 | ns |
| Nikotin vs. Nikotin + MLA | -4,002 | 0,004 | ** |
| Nikotin vs. Nik/Gal | 2,426 | 0,046 | * |
| Nikotin vs. Nik/Gal + MLA | -2,525 | 0,036 | * |
| Nikotin + MLA vs. Nik/Gal | 6,243 | $4,27 \times 10^{-4}$ | *** |
| Nikotin + MLA vs. Nik/Gal + MLA | 0,347 | 0,737 | ns |
| Nik/Gal vs. Nik/Gal + MLA | -4,146 | 0,004 | ** |

GABA**WERTE:**

| Stimulus | Mittelwert AUC | sd | sem | n |
|--------------------------------|----------------|-------|-------|---|
| CSF (Basal) | 24,480 | 4,346 | 1,944 | 4 |
| 100 µM Nikotin | 33,700 | 5,794 | 2,591 | 4 |
| 100 µM Nikotin + 1 µM MLA | 29,633 | 4,103 | 1,675 | 4 |
| 100 µM Nik/1 µM Gal | 18,980 | 2,983 | 1,334 | 4 |
| 100 µM Nik/1 µM Gal + 1 µM MLA | 22,060 | 6,102 | 2,729 | 4 |

STATISTIK (unabhängiger T-Test, zwei Populationen):

| | t | p | Stat Sig. (Signifikanzebene 0,05) |
|---------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------------------|
| Basal vs. Nikotin | 2,846 | 0,022 | * |
| Basal vs. Nikotin + MLA | 2,02 | 0,074 | ns |
| Basal vs. Nik/Gal | -2,333 | 0,048 | * |
| Basal vs. Nik/Gal + MLA | -0,722 | 0,491 | ns |
| Nikotin vs. Nikotin + MLA | -1,363 | 0,206 | ns |
| Nikotin vs. Nik/Gal | -5,051 | $9,89 \times 10^{-4}$ | *** |
| Nikotin vs. Nik/Gal + MLA | -3,093 | 0,015 | * |
| Nikotin + MLA vs. Nik/Gal | -4,823 | $9,43 \times 10^{-4}$ | *** |
| Nikotin + MLA vs. Nik/Gal + MLA | -2,458 | 0,036 | * |
| Nik/Gal vs. Nik/Gal + MLA | 1,014 | 0,34 | ns |

