Glutamatrezeptoren und Ca²⁺-Homöostase in Hirnstamm-Motoneuronen der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Bodo Karsten Vanselow

aus Minden

Göttingen 2000

D 7

Referent: Prof. R. Hustert

Korreferent: Prof. F. W. Schürmann

Tag der mündlichen Prüfung: 01. 11. 2000

Abkürzungen

Amyotrophe Lateralsklerose
α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionat /Kainat
Aktionspotential
Aminosäure
Adenosintriphosphat
Calcium
exzitatorischer postsynaptischer Strom
Glutamat
AMPA/KA-Rezeptorkanal Untereinheit 1
high voltage activated (hochspannungsaktiviert)
Inositoltriphosphat
inhibitorischer postsynaptischer Strom
exogene Pufferkapazität des Ca ²⁺ -Indikators
endogene Ca ²⁺ -Pufferkapazität
low voltage activated (niedrigspannungsaktiviert)
Miniatur-EPSC
N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-Rezeptoruntereinheit 1
Postnatal Tag 1 (1 Tag alt)
spontaner EPSC
Sarco/Endoplasmatisches Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
Superoxid Dismutase
Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Bedeutung der zellulären Ca ²⁺ -Homöostase in Motoneuronen	1
1.2 Ca ²⁺ -Einstrom durch Ionenkanäle in Motoneuronen	2
1.3 Die neurodegenerative Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose bewirkt eine selektive	
Motoneuronen-Schädigung	4
1.4 Mögliche Ursachen für die selektive Vulnerabilität von Motoneuronen bei der Amyotroph	en
Lateralsklerose	7
1.5 Zielsetzungen	7
Material und Methode	9
2.1 Versuchsobiekte	9
2.2 Funktionelle Bedeutung von Kerngebieten und Präparationsmethodik	9 Q
2.2.1 Nucleus hypoglossus)
2.2.2 Nucleus oculomotorius	10
2.2.3 Betz Zellen	12
2.3 Atemfrequenzmessungen	12
2.4 Pipetten und Medien	13
2.4.1 Pipetten	13
2.4.2 Medien	13
2.5 Applikation von Glutamatrezeptor Agonisten	15
2.6 Patch-clamp Ableitungen	15
2.6.1 Methode	15
2.6.2 Datenanalyse	19
2.7 Mikrofluorometrische Ca ²⁺ -Messungen	20
2.8 Quantitatives Modell zur Analyse der Ca ²⁺ -Homöostase und des Glutamatrezeptor vermitte	elten
Ca ²⁺ -Einstroms in Motoneuronen	22
2.8.1 Quantitatives Modell zur Ermittlung von Parametern der Ca ²⁺ -Homöostase	22
2.8.2 Quantitatives Modell zur Ermittlung des Glu-Rezeptor vermittelten Ca ²⁺ -Einstroms	25
Ergebnisse	27
3.1 Atemfrequenz junger Mäuse	27
3.2 Synaptische Aktivität in hypoglossalen Motoneuronen	29
3.2.1 Profil der AMPA/KA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs in hypoglossalen	l
Motoneuronen	31
3.2.2 Profil der NMDA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs in hypoglossalen	
Motoneuronen	34

3.3 Einzelkanalmessungen von NMDA-Rezeptorströmen in hypoglossalen Motoneuronen	38
3.4 Applikation von Glutamatrezeptor Agonisten und somatische Ca ²⁺ -Messungen in	
hypoglossalen Motoneuronen	40
3.4.1 Calciumanteil am Gesamteinstrom durch den AMPA/KA-Rezeptorkanal	40
3.4.2 Calciumanteil am Gesamteinstrom durch den NMDA-Rezeptorkanal	42
3.5 Synaptisches Modell der Glutamatrezeptor vermittelten Calciumtransienten	44
3.6 Ca ²⁺ -Homöostase in unterschiedlichen Neuronenpopulationen	47
3.6.1 Ca ²⁺ -Homöostase in oculomotor Neuronen	48
3.6.1.1 Quantitatives Modell der Ca ²⁺ -Homöostase in oculomotor Neuronen	55
3.6.2 Ca ²⁺ -Homöostase in Betz Zellen	58
3.6.3 Ca ²⁺ -Homöostase in hypoglossalen Motoneuronen von transgenen Mäusen mit einer	
Mutation in der Superoxid Dismutase	59
Diskussion	63
4.1 AMPA/KA-Rezeptor vermittelte Signale in den hypoglossalen Motoneuronen	63
4.2 NMDA-Rezeptor vermittelte Signale in den hypoglossalen Motoneuronen	66
4.3 Ca ²⁺ -Dynamik und Pufferung in Motoneuronenpopulationen, die im Verlauf der	
ALS-Erkrankung selektiv resistent oder vulnerabel sind	69
4.4 Heterogene Effekte von Ca ²⁺ -Puffern in unterschiedlichen Modellen der Neurodegeneration.	70
4.5 Zusammenspiel verschiedener Faktoren bei der ALS-Erkrankung	72
4.6 Auswirkungen der unterschiedlichen Ca ²⁺ -Homöostase für physiologische und	
pathophysiologische Abläufe	73
4.7 Ca ²⁺ -Homöostase in einem Maus-Tiermodell der ALS-Erkrankung	74
4.8 Klinische Aspekte und Ausblick	75
Zusammenfassung	77
Literaturverzeichnis	80
Anhang	

Einleitung

1.1 Bedeutung der zellulären Ca²⁺-Homöostase in Motoneuronen

Calcium-Ionen kommt eine besondere Bedeutung bei der Regulierung zellulärer Funktionen zu. In jeder eukaryotischen Zelle gibt es Proteine, die von Ca^{2+} moduliert werden. Ca^{2+} wirkt daher als zytoplasmatischer Botenstoff. Die meisten Ca^{2+} modulierbaren Proteine sind nicht selbst Enzyme, aber durch die mit der Ca^{2+} -Bindung verbundenen Konformationsänderung können sie Enzyme aktivieren oder Konformationsänderungen an Strukturproteinen hervorrufen (Kretsinger et al. 1981).

 Ca^{2+} -Signale in Neuronen werden von unterschiedlichen Prozessen beeinflußt, hierzu gehören Ca^{2+} -Einstrom, Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, Ca^{2+} -Pufferung, Aufnahme von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher und die Extrusion des Ca^{2+} über die Zellmembran (McBurny & Neering, 1987; Blaustein, 1988; Baimbridge et al. 1992; Neher, 1995). Die freie zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration wird in Neuronen sehr niedrig gehalten. An der Zellmembran liegt ein großer Ca^{2+} -Gradient an, der auf eine etwa 10.000fach erhöhte extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen ist.

Zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt es durch eine Steigerung der Ca²⁺-Leitfähigkeiten in der Zellmembran. Der Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgt zum einen über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, die während einer elektrischen Aktivität und einer damit verbundenen Membrandepolarisation der Neurone geöffnet werden, zum anderen über ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine Ca²⁺-Leitfähigkeit aufweisen und bei der Anbindung eines Neurotransmitters die Durchlässigkeit erhöhen. Im Ruhezustand liegt in Neuronen eine freie zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration von etwa 10⁻⁷M vor, die sich nach einem Ca²⁺-Einstrom aber kurzfristig auf 10⁻⁵M erhöhen kann.

Der Anstieg der freien zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration wird durch ein sofortiges Anbinden des einströmenden Ca^{2+} an negativ geladene Bindungsstellen von zellulären Proteinen und membranständigen Phospholipiden begrenzt. Großen, Ca^{2+} -bindenden Proteinen, wie dem Parvalbumin oder Calbindin kommt dabei die Aufgabe zu, einen übermäßigen zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg zu unterbinden. Sie wirken damit einer unspezifischen Aktivierung zellulärer Proteine entgegen und erfüllen in diesem Sinne eine Schutzfunktion (Ho et al. 1996).

Zur Abgabe des Ca^{2+} stehen verschiedene Extrusions- und Sequestrationsmechanismen zur Verfügung. Die Ca^{2+} -Abgabe über die Zellmembran geschieht mittels Na^+/Ca^{2+} -Antiportern oder Ca^{2+} -ATPasen (Fierro et al. 1998). Zur Absenkung der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration können aber auch zelleigene Speicher gefüllt werden. Diese sind vor allem das glatte endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. SERCA-Pumpen vollziehen die Sequestration in das endoplasmatische Retikulum, in den Mitochondrien wird diese Funktion von Ca^{2+} -Uniportern und Na^+/Ca^{2+} -Austauschern erfüllt (Gunter & Gunter, 1994; Fierro et al. 1998). Dieses zelleigene Ca^{2+} -Reservoir befähigt die Zellen bei Bedarf, durch Abgabe des gebundenen Ca^{2+} , die freie zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration erneut zu erhöhen. Im endoplasmatischen Retikulum kann dies über eine IP3-Rezeptor oder Ryanodinrezeptor abhängige Aktivierung erfolgen (Yamamoto & Kanaide, 1990).

Die verschiedenen Parameter, die auf die Verteilung des Ca²⁺ in der Zelle einwirken, müssen so aufeinander abgestimmt sein, daß eine Rückverteilung gewährleistet bleibt, und die zelluläre Ca²⁺-Homöostase somit erhalten bleibt. Eine Störung der zellulären Ca²⁺-Homöostase indes kann sich neurodegenerativ auswirken. Ein vermehrter Ca²⁺-Einstrom kann über ein "second messenger" System unter Beteiligung der Proteinkinase C durch eine Phosphorylierung von Ionenkanälen eine zusätzliche Verstärkung erfahren, letztendlich führt eine dauerhaft erhöhte freie zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration zur apoptotischen Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonucleasen, die eine Autolyse von Neuronen hervorrufen (Krieger et al. 1994, 1996; Morrison & Morrison, 1998).

Motoneuronen kommt in Verbindung mit einer Ca²⁺-vermittelten Schädigung eine besondere Bedeutung zu, da sie eine Vielzahl synaptischer Inputs erhalten und eine gesteigerte elektrische Aktivität in Verbindung mit der Notwendigkeit zur Kontrolle der Muskelbewegung aufweisen.

1.2 Ca²⁺-Einstrom durch Ionenkanäle in Motoneuronen

Der Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgt größtenteils über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle können in

3

niedrig spannungsaktivierte (LVA) und hochspannungsaktivierte (HVA) Ca²⁺-Kanäle gegliedert werden (Hille, 1992; Snutch & Reiner, 1992), wobei eine feinere Klassifizierung eine Zuordnung des T-Typ Kanals zu den LVA-Ca²⁺-Kanälen und der P-, Q-, N-, R- und L-Typ Kanäle zu den HVA-Ca²⁺ Kanälen erlaubt (Walker & De Waard, 1998).

Ein weiterer Ca²⁺-Einstrommechanismus besteht in der Aktivierung von Ligandengesteuerten Ionenkanälen. Der Neurotransmitter Glutamat vermittelt im Zentralnervensystem den Großteil der exzitatorischen synaptischen Übertragung (Mayer & Westbrook, 1987). Durch Glutamat-Agonisten werden zwei Hauptklassen von ionotropen Glu-Rezeptorkanälen aktiviert, die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und α -amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionat/Kainat (AMPA/KA) Rezeptoren (Collingridge & Lester, 1989; Weigand & Keller, 1998).

Der NMDA-Rezeptorkanal setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, wobei angenommen wird, daß eine pentamere Struktur aus fünf Untereinheiten zur Bildung des funktionellen Ionenkanals nötig ist (Nakanishi, 1992). Die Untereinheiten lassen sich in NR1 und NR2 Untereinheiten gliedern, wobei funktionelle NMDA-Rezeptorkanäle aus homomeren NR1 Untereinheiten geformt werden können (Moriyoshi et al. 1991) oder aus heteromeren NR1 und NR2 Untereinheiten. Von der NR2 Untereinheit existieren verschiedene Formen (NR2A bis NR2D), die bei Koexpression mit NR1 Ionenkanäle mit unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften bilden (Monyer et al. 1992; Vicini et al. 1998). Von der NR1 Untereinheit sind unterschiedliche Splice Varianten bekannt (NR1a, b, c, e und g; Sugihara et al. 1992, Hollmann et al. 1993), denen in neuerer Zeit ebenfalls modulatorische Eigenschaften zuerkannt wurden (Blahos II & Wenthold, 1996). Der NMDA-Rezeptorkanal zeichnet sich allgemein durch seine spannungsabhängige Blockierbarkeit durch Mg²⁺ aus, die dazu führt, daß dieser Glu-Rezeptorkanal erst aktiviert werden kann, wenn eine Depolarisation der postsynaptischen Endigung, in der Regel durch AMPA/KA-Rezeptorkanäle, eingesetzt hat (Nowak et al. 1984). Eine Anpassung an diesen Umstand bildet die langsame Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der NMDA-Rezeptoren, wodurch die NMDA-Rezeptorströme oft erst nach Abfall der AMPA/KA-Rezeptor vermittelten Ströme ihren Maximalwert erreichen, dann aber bei bestimmten Untereinheitenkombinationen mehrere hundert Millisekunden lang anhalten können (Hestrin et al. 1990; Vicini et al. 1998). Zur Aktivierung des NMDA-Rezeptorkanals wird zudem der Koagonist Glycin benötigt (Monyer et al. 1992, Moriyoshi et al. 1991). Eine weitere Eigenschaft des NMDA-

Rezeptorkanals besteht darin, daß er neben einer Leitfähigkeit für monovalenten Kationen

(Na⁺, Cs⁺, K⁺) auch eine hohe Ca²⁺-Leitfähigkeit aufweist (Ascher & Nowak, 1988; Burnashev et al. 1995). Dieses NMDA-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Signal wird als Auslöser von modulatorischen Wirkungen, wie der Langzeitpotenzierung in CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus angesehen (Bliss & Colindridge 1993), dem Ca²⁺-Signal wird aber auch eine pathophysiologische Wirkung zugeschrieben (Meldrum & Garthwaite, 1990).

Der AMPA/KA-Rezeptorkanal bildet vermutlich ebenfalls eine oligomere Struktur aus fünf Untereinheiten (Nakanishi, 1992). Die Untereinheiten können aufgrund ihrer Selektivität gegenüber Glutamat-Agonisten und Sequenzhomologien in drei Untergruppen eingeteilt werden. Die eine besteht aus vier Untereinheiten (GluR1 bis GluR4) und zeigt eine hohe Affinität gegenüber AMPA, jedoch ebenfalls gegenüber Kainat, wohingegen die anderen beiden Untergruppen eine selektive Affinität gegenüber Kainat aufweisen (GluR5 bis GluR7 sowie KA-1 und KA-2; Nakanishi, 1992). Bei den aus verschiedenen Untereinheiten geformten, heteromeren AMPA/KA-Rezeptorkanälen wurden Unterschiede in den elektrophysiologischen wie pharmakologischen Eigenschaften aufgedeckt (Keller et al. 1992; Moosbacher et al. 1994; Weigand & Keller, 1998), im allgemeinen weisen die AMPA/KA-Rezeptorkanäle aber schnelle Aktivierungs- und Deaktivierungszeiten auf (im Millisekundenbereich) sowie eine überwiegende Leitfähigkeit für monovalente Kationen (Monaghan et al. 1989). Die Ca²⁺-Leitfähigkeit der AMPA-Rezeptorkanäle wird durch die Anwesenheit editierter GluR2 Untereinheiten in den heteromeren Rezeptorkanälen limitiert (Burnashev et al. 1995).

1.3 Die neurodegenerative Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose bewirkt eine selektive Motoneuronen-Schädigung

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die zu einem Verlust von Motoneuronen in Rückenmark, Hirnstamm und Cortex führt (Brown, 1995). Die jährliche Erkrankungsrate liegt, weltweit mit regionalen Unterschieden, bei etwa 1 bis 2 zu 100.000. Damit gehört ALS zu den häufig auftretenden neuronalen Erkrankungen (Walling, 1999). ALS tritt, zumeist im fortgeschrittenen Alter, zu etwa 90% sporadisch auf, 10% Fälle der sind erblich bedingt. In Folge der Motoneuronendegeneration kommt es in den assoziierten Muskeln zu chronischen Lähmungserscheinungen, innerhalb von 3 bis 5 Jahren versterben die meisten Patienten an der bisher unheilbaren Krankheit, zumeist aufgrund von Ateminsuffizienz (Morrison & Morrison, 1998).

Im Krankheitsverlauf der erblichen und sporadischen ALS besteht kein Unterschied, daher vermutet man, daß in beiden Fällen ähnliche Mechanismen an der Krankheitsausprägung beteiligt sein können. In den 10% der erblich bedingten ALS-Fälle liegen zu etwa 20% Mutationen in der Cu, Zn Superoxid-Dismutase (SOD) vor. Etwa 50 unterschiedliche Punktmutationen im SOD-Enzym sind bei der erblichen ALS beschrieben worden (Siddique & Deng, 1996). Durch die Einführung einiger Punktmutationen des SOD-Enzyms in das Mäusegenom gelang es, die menschliche Erkrankung im Maus-Tiermodell zu reproduzieren, wodurch wissenschaftliche Untersuchungen der ALS-Erkrankung erheblich erleichtert wurden (Gurney et al. 1994).

Durch eine Mutation in der SOD kann es zum vermehrten Auftreten von Superoxidradikalen und damit zu oxidativen Streß kommen. Dieser scheint aber nicht ursächlich für die neuronalen Schädigungen verantwortlich zu sein, da die enzymatische Aktivität bei einigen Punktmutationen im SOD-Enzym voll intakt bleibt. Man nimmt daher an, daß das mutierte Enzym neue funktionelle Eigenschaften besitzt und durch abnorme Bindungen an zelleigene Proteine eine Störung zellulärer Funktionen hervorruft, die im Fall der spontanen ALS auch auf anderem Wege erfolgen könnten (Morrison & Morrison, 1998). In diesem Zusammenhang wurden Schädigungen der Mitochondrien beschrieben, die damit die Fähigkeiten verlieren, ATP zu produzieren und Ca²⁺ aufzunehmen. Dies könnte mit einer Unterbrechung der zellulären Ca²⁺-Sequestration und -Extrusion in den Motoneuronen einhergehen, und damit eine zellschädigende Erhöhung freier zytoplasmatischer Ca²⁺-Konzentrationen nach sich ziehen (Dal Canto & Gurney, 1995; Kong & Xu, 1998). Zum anderen wurden in Verbindung mit einer Mutation in der SOD Störungen des glialen Glutamattransporters GLT1 beschrieben, die eine vermehrte Aktivierung synaptischer Glutamatrezeptorkanäle und einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom nach sich ziehen könnten (Rothstein et al. 1995; Trotti et al. 1999). Dieser Effekt könnte durch die Anwesenheit von hoch Ca²⁺-permeablen Glutamatrezeptorkanälen noch eine Verstärkung erfahren (Roy et al. 1998; Shaw & Ince, 1997).

Aber auch eine Erhöhung der Leitfähigkeit von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen über Auto-Immunreaktionen wurde als Auslöser der ALS-Erkrankung diskutiert (Appel et al. 1995; Ho et al. 1996).

Zudem wurden auch Akkumulationen von Neurofilamentproteinen und mutierten SOD1-Enzymen beschrieben, was wiederum den axonalen Transport in Motoneuronen erschweren sowie die Ca²⁺-Pufferungsfähigkeit der Motoneuronen beeinträchtigen könnte, da Neurofilamentproteine vermutlich ebenfalls als Ca²⁺-Puffer fungieren (Krinks et al. 1988; Abercrombre et al. 1990).

Diese Befunde gingen in erster Linie auf eine Mutation in der Superoxiddismutase zurück, der Großteil der menschlichen ALS-Fälle steht jedoch nicht mit einer derartigen Mutation in Verbindung. Einige der Befunde ließen sich aber auch bei der spontanen menschlichen ALS-Form nachweisen. Hierzu gehört ein verminderter glialer Glutamattransport (Rothstein et al. 1992; 1995b) sowie eine Neurofilamentproteinakkumulation (Trost et al. 1992), als auch eine gesteigerte Leitfähigkeit von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen in Verbindung mit einer Autoimmunreaktion (Smith et al. 1992).

In klinischen Studien konnte zudem gezeigt werden, daß eine Reduktion des sowohl spannungsabhängigen als auch Glu-Rezeptor vermittelten Ca^{2+} -Einstroms durch spezifische Blocker mit einer Verlängerung der Lebensdauer von ALS-Kranken verbunden war (Gurney et al. 1996; Roy et al. 1998; Smith et al. 1992).

Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die neurodegenerative Wirkung der ALS Erkranung auf eine Störung der zellulären Ca²⁺-Homöostase zurückzuführen ist (Appel et al. 1995; De Paul et al. 1988; Shaw & Ince, 1997), wobei der auslösende Mechanismus im Fall der spontanen Erkrankung noch unbekannt ist.

Erstaunlicherweise werden nicht alle Motoneuronen-Populationen im Krankheitsverlauf gleichermaßen geschädigt. Einige craniale Motoneuronenkerngebiete, zu denen die Nuclei oculomotorius, trochlearis und abducens gehören, bleiben erhalten und werden daher als selektiv resistent bezeichnet, während andere, denen die Nuclei hypoglossus, trigeminus und facialis zuzurechnen sind, weitreichend geschädigt werden. Auch spinale Motoneurone oder corticale Neurone (Betz Zellen) aus dem primären Motorcortex gehören den selektiv vulnerablen Neuronenpopulationen an (Elliot & Snider, 1995; Ince et al. 1993; Medina et al. 1996; Reiner et al. 1995).

1.4 Mögliche Ursachen für die selektive Vulnerabilität von Motoneuronen bei der Amyotrophen Lateralsklerose

Ein wichtiger Bezugspunkt für die selektive Vulnerabilität von Hirnstamm-Motoneuronenpopulationen ist die niedrige Konzentration bestimmter endogener Pufferproteine, wie Calbindin oder auch Parvalbumin (Medina et al. 1996; Reiner et al. 1995; Ince et al. 1993). Dies deutet auf eine verminderte Fähigkeit zur Abpufferung freier zytoplasmatischer Ca²⁺-Konzentrationen und einer damit verbundenen Insuffizienz hin, Störungen der zellulären Ca²⁺-Homöostase entgegenzuwirken.

Demgegenüber gibt es Untersuchungen an Hippocampus Neuronen, aus denen hervorgeht, daß eine erhöhte endogene Pufferkapazität die neuronale Verwundbarkeit in Verbindung mit Glu-Rezeptor vermittelten exzitatoxischen Signalen erhöhen kann, da in diesem Fall die Ca²⁺-abhängige Inaktivierung spannungsaktivierter Ca²⁺-Kanäle gestört wird (Abdel-Hamid & Baimbridge, 1997; Chad, 1989; Klapstein et al. 1998; Nägerl & Mody, 1998). Andererseits wurde in einigen Studien demonstriert, daß eine verringerte endogene Pufferkonzentration zu einer verstärkten Schädigung von Motoneuronen in ALS-Modellsystemen führte (Alexianu et al. 1998; Reiner et al. 1995; Roy et al. 1998 Tymianski et al. 1994).

1.5 Zielsetzungen

Die Amyotrophe Lateralsklerose wird mit unterschiedlichen neurodegenerativen Mechanismen in Verbindung gebracht, hierzu gehören Störungen des Ca²⁺-Einstroms, spannungsabhängigen sowie Glutamatrezeptor vermittelten mitochondriale Schädigungen sowie Neurofilamentakkumulationen (Dal Canto & Gurney, 1995; Ho et al. 1996; Krinks et al. 1988; Roy et al. 1998; Trotti et al. 1999).

In Verbindung mit diesen Mechanismen soll es auf bisher ungeklärte Weise zu der Ca²⁺vermittelten neuronalen Schädigung kommen, die sowohl bei der menschlichen Erkrankungsform als auch in Tiermodellen nachgewiesen werden konnte (Bruijn et al. 1998; Krieger et al. 1994, 1996; Morrison & Morrison, 1998; Siklos et al. 1998; Williamson et al. 1998) Demgegenüber weisen einige Motoneuronenpopulationen eine Resistenz gegenüber diesen Mechanismen auf und werden im Krankheitsverlauf nicht geschädigt.

Folglich schließt sich die Frage an, ob die neurodegenerativen Mechanismen in den vulnerablen Motoneuronen besonders stark ausgeprägt sind und daher zu einer selektiven Vulnerabilität bestimmter Motoneurone führen oder ob Unterschiede in einzelnen Parametern der zellulären Ca^{2+} -Homöostase mit einem Schutz bestimmter Motoneuronenpopulationen einhergehen könnten.

Um dieser Frage nachzugehen wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an Hirnstamm- sowie Cortex-Gewebeschnittpräperaten der Maus vorgenommen.

Mit plethysmographischen sowie simultanen elektrophysiologischen und mikrofluorometrischen Messungen wurden die Glutamatrezeptor vermittelten Ca^{2+} -Einstrommechanismen bis hin zur molekularen Ebene im Vergleich zu dem spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom in den selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen überprüft.

Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt wurde mit der Bestimmung verschiedener Parameter der zellulären Ca^{2+} -Homöostase in den selektiv resistenten oculomotor Neuronen sowie in den selektiv vulnerablen Betz Zellen gebildet.

Zudem sollte an hypoglossalen Motoneuronen von transgenen Mäusen, die ein Maus-Tiermodell der ALS-Erkrankung darstellen (TgN(SOD1-G93A)1Gur-dl; Gurney et al. 1994) im Vergleich mit bereits bekannten Daten vom Wildtyp (Lips & Keller, 1998) überprüft werden, ob schon vor dem Krankheitsausbruch eine Änderung von Parametern der zellulären Ca²⁺-Homöostase nachzuweisen wäre, auf die sich gegebenfalls die selektive Vulnerabilität zurückführen ließe.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß zelluläre Adaptionen in den selektiv vulnerablen Motoneuronen mit einem funktionellen Vorteil bei der schnellen Signalweiterleitung verbunden sein können, gleichwohl aber das Risiko für neuronale Schädigungen unter pathophysiologischen Bedingungen erhöhen.

Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekte

Die Untersuchungen wurden an Wildtyp Mäusen des Stamm NMRI oder an transgenen Mäusen des Stamm B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur-dl mit einer menschlichen Mutation im Gen der SOD1 an Position 93, wo ein Austausch der AS Glycin mit Alanin eingeführt wurde, vorgenommen (Gurney et al. 1994). Im Zuge dieser Genomveränderung kommt es bei diesen Tieren nach Ablauf von 6 - 7 Lebensmonaten zur Ausprägung von Krankheitssymptomen, die auch bei der menschlichen ALS-Erkrankung auftreten. Innerhalb weiterer 1 - 2 Monate versterben diese Tiere. Die transgenen Mäuse wurden ursprünglich von The Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen und in der hauseigenen Tierzucht des Physiologischen Instituts Göttingen nachgezüchtet.

2.2 Funktionelle Bedeutung von Kerngebieten und Präparationsmethodik

Zur Vorbereitung der Versuchsobjekte für elektrophysiologische Untersuchungen wurden "dünne" Hirnschnitte aus dem jeweiligem Hirnbereich gewonnen (Edwards et al. 1989). Hierzu wurden die Tiere zunächst mit Äther betäubt und anschließend dekapitiert. Daraufhin wurde das Gehirn mit Mikroscheren von den Schädelknochen befreit. Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendbarkeit der Schnittpräparate war das Vorhandensein von intakten Neuronen nahe der Oberfläche. Hierfür wurden die mechanischen Beanspruchungen des Hirngewebes während der Präparation möglichst gering gehalten. Das Gewebe wurde anhaltend in Ringer gekühlt (4°C) und zur Erhaltung der metabolischen Funktionen ständig mit Sauerstoff versorgt. Drei unterschiedliche Schnittpräparate wurden in dieser Arbeit untersucht, sie enthielten die Hirnstamm-Motoneuronen Kerngebiete des Nucleus hypoglossus, des Nucleus oculomotorius oder den primären Motorcortex layer 5 aus dem Gyrus precentralis.

2.2.1 Nucleus hypoglossus

Die hypoglossalen Motoneurone bilden mit ihren Axonen den XII. Hirnnerv und steuern die Zungenmuskulatur (Musculus genioglossus, styloglossus und hyoglossus), welche beim Kauen, Schlucken und Saugen benötigt wird (Lowe, 1980). Der N. hypoglossus ist aber auch mit dem Atemrhythmus, der im Prä-Bötzinger Komplex generiert wird und für die unbewußt ablaufende Atmung benötigt wird, verbunden (Smith et al. 1991). Der ständige Signalinput soll eine Erschlaffung der Zungenmuskulatur und ein Verschlucken der Zunge, etwa während der Tiefschlafphase, verhindern (Barthlett et al. 1990), hat aber einen sich wiederholenden periodischen Ca²⁺-Einstrom über auch ständig spannungsaktivierte sowie ligandengesteuerte Ionenkanäle zur Folge (Frermann et al. 1998).

Zur Präparation des Nucleus hypoglossus wurde zunächst das Prosencephalon von Zerebellum und Hirnstamm durch einen Transversalschnitt abgetrennt. Anschließend wurde der Hirnstamm durch einen Horizontalschnitt zwischen Zerebellum und Hirnstamm isoliert. Dann wurde der Hirnstamm am rostralen Pol mit Sekundenkleber (Pattex, Henkel) in der Schnittkammer eines Vibratoms (75M Vibroslice, Campden Instruments, UK oder Vibracut, Liebscher) fixiert und mit eisgekühlter Ringerlösung umspült. Vom caudalen Pol beginnend wurde der Hirnstamm nun bis zum rostralen Ende der Area postrema heruntergeschnitten. Im Anschluß wurden etwa vier 200µM dicke Transversalschnitte in der Medulla oblongata gewonnen. Die hypoglossus Kerngebiete konnten in der Nähe des Zentralkanals oder 4ten Ventrikels visuell identifiziert werden (vgl. Abb. 2.1).



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Schnittebene des Nucleus hypoglossus in der Medulla oblongata. Die Kerngebiete des Nucleus ambiguus und des Nucleus tractus solitarius liegen in derselben Schnittebene.

Die Schnitte wurden anschließend zur Regeneration vor Meßbeginn 1h in mit Carbogen (95% 0_2 , 5% CO₂) begasten Ringer überführt. Zur Präparation wurden Mäuse im Alter von 0 - 8 Tagen verwendet, da bei älteren Tieren eine zunehmende Ausdifferenzierung der Hypoglossusregion einsetzt, wodurch eine erfolgreiche Präparation erschwert wird.

2.2.2 Nucleus oculomotorius

Die Motoneurone im Nucleus oculomotorius steuern mehrere Muskeln (M. rectus superior, inferior, medialis, M. obliquus superior) die zur Augenkoordination benötigt werden. Ihre Axone bilden den III Hirnnerv (Wasicky et al. 2000).

Unterschiedlich zur Präparation der hypoglossalen Motoneurone wurden die Transversalschnitte mit dem Nucleus oculomotorius weiter rostral im Mittelhirn gewonnen. Hierzu wurde der Hirnstamm bis zur Schließung des Aquedukts heruntergeschnitten, und in dieser Region wurden etwa zwei 200µm dicke Transversalschnitte gewonnen. Als wichtige Identifizierungshilfen zur visuellen Identifikation des Nucleus oculomotorius dienten Red Nucleus und die Ausprägung des dorsal angelagerten Hippocampus (vgl. Abb. 2.2). Um optimale Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Präparation an 2 - 6 Tage alten Mäusen vorgenommen.



Red Nucleus

Abbildung 2.2: A, Schematische Darstellung eines Transversalschnittes in der Mittelhirnregion des Nucleus oculomotorius. Der Nucleus oculomotorius (NOM) befindet sich in der Nähe zum Aquedukt und zum Kerngebiet des Red Nucleus. B, CCD-Kamerabild eines in A schematisch dargestellten Transversalschnittes mit vergrößerter Darstellung des Nucleus oculomotorius. Red Nucleus und Aquedukt sind ebenfalls erkennbar.

2.2.3 Betz Zellen

Betz Zellen sind große Pyramidalneurone im primären Motorcortex. Sie senden ihre Axone in den Corticospinalen Tract und formen direkte synaptische Verbindungen mit spinalen Motoneuronen. Eine Erregung der Betz Zellen führt daher zu einer direkten Auslösung von Muskelbewegungen in den Extremitäten. Deshalb werden die Betz Zellen auch als obere oder erste Motoneurone bezeichnet, während die Motoneurone mit direkter Muskelinnervation als untere oder zweite Motoneurone klassifiziert werden (Eyre et al. 1990).

Zur Gewinnung der Betz Zellen aus dem primären Motorcortex wurden Hirnstamm und Zerebellum zunächst durch einen Transversalschnitt vom Prosencephalon abgetrennt. Anschließend wurde das Prosencephalon durch einen Sagittalschnitt mittig durchtrennt, das Schnittpräparat auf die Sagittalschnittebene geklebt und von oben heruntergeschnitten. Nach dem Verwerfen der ersten Schnitte und dem deutlichen Erscheinen des Lateralventrikels sowie dem Caudate Putamen konnten beliebig viele Sagittalschnitte von 200µm Dicke von dem Schnittpräparat gewonnen werden. Im primären Motorcortex fehlt layer 4, dies erleichterte die visuelle Identifikation der Betz Zellen. Da sich die Pyramidalneurone im Cortex im Vergleich mit den Motoneuronen im Hirnstamm langsamer entwickeln, wurden ältere Tiere im Alter von 5 bis 10 Tagen verwendet.

2.3 Atemfrequenzmessungen

Eine Analyse der Atemfrequenz junger Mäuse sollte dazu dienen, physiologisch relevante Daten unter in vivo Bedingungen zu erhalten, um diese mit den unter veränderten Bedingungen erzielten elektrophysiologischen und mikrofluorometrischen Daten in Beziehung setzen zu können. Für diese plethysmographischen Messungen (Jacquin et al., 1996) wurden die Mäuse in eine durch UV-Licht angewärmte (31°C) Spritze (20ml und 50ml) gesetzt. Über eine Schlauchverbindung zu einem differentiellen Druck-Umformer (Validyne, Northridge CA, USA, DP 103-12) konnte die Atemluftbewegung über eine hochempfindliche Membran detektiert werden. Eine offset-Korrektur und Verstärkung des Signals erfolgte durch einen zugeschalteten Sinuswellenträger-Demodulator (Validyne, CD15). Das analoge Signal wurde über ein Interface an einen ATARI Computer übermittelt. Die Datenauswertung wurde mit der HEKA-Software E9-Screen vorgenommen. Alle statistischen Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

2.4 Pipetten und Medien

2.4.1 Pipetten

Die Meßpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) hergestellt. Der Innendurchmesser der Kapillaren betrug 1.5mm und der Außendurchmesser 1.8mm. Die Herstellung der Pipetten wurde an einem Elektrodenpuller vorgenommen, zu Beginn der Dissertation wurde dazu ein horizontal arbeitende Gerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg) verwendet, später dann ein vertikal arbeitendes (E.S.F.-electronic, L/M-3P-A, Friedland) eingesetzt. Der elektrische Widerstand der gefüllten Pipetten wurde nach dem Ziehen an der Meßapperatur überprüft und die Hitze an den Elektrodenpullern für die Pipettenzugphasen so gewählt, daß dieser zwischen 2 und 4M Ω lag. Der Spitzendurchmesser der Pipetten betrug dann ca. 1µm. Applikationspipetten wurden gewöhnlich mit weniger Hitze gezogen und mit einem Spitzendurchmesser von ca. 2µm verwendet.

Die Pipetten wurden zur Verwendung zunächst mit intrazellulärer Lösung gefüllt und auf einen chlorierten Silberdraht im Elektrodenhalter geschoben. Als Badelektrode diente ebenfalls ein Silberdraht. Die Chlorierung wurde täglich vorgenommen, um Potentialschwankungen zu vermeiden.

2.4.2 Medien

Als Präparations- und Standard-Meßlösung wurde ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet (in mM):

118 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 20 Glucose, begast mit Carbogen (95% 0₂, 5% CO₂) und eingestelltem pH 7.3.

Die Messungen von NMDA-Rezeptorströmen wurden in nominell Mg²⁺-freier Lösung vorgenommen, um einen spannungsabhängigen Mg²⁺-Block zu vermeiden.

Zur pharmakologischen Isolation synaptischer oder somatischer Ströme wurden folgende selektive Ionenkanalblocker zur Extrazellulärlösung zugegeben:

Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle: 1µM Tetrodotoxin (TTX, Sigma)

Blockade der GABA _A -Rezeptoren:	10µM Bicucullin Methiodid (Sigma)
Blockade der Glycin-Rezeptoren:	10µM Strychnin (Sigma)
Blockade der NMDA-Rezeptoren:	40µM Amino-Phosphonovaleronat (D-APV,
	Tocris)
Blockade der AMPA/KA-Rezeptoren:	10µM 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione
	(CNQX, Tocris)

Zur Auslösung von somatischen Strömen durch Badapplikation oder iontophoretische Applikation wurden folgende Agonisten der Extrazellulärlösung zugefügt:
 Aktivierung von AMPA/KA-Rezeptoren: 100µM – 10mM Kainat (Sigma)
 Aktivierung von NMDA Rezeptoren: 50µM – 20mM N-Methyl-D-Aspartate (NMDA, Sigma)

Die Intrazellulärlösung wurde dem Versuchsansatz entsprechend variiert und folgendermaßen verwendet (in mM):

-mikrofluorometrische Calciummessungen: 130 CsCl, 30 TEACl, 11 Hepes, 2.2 MgCl₂, 4.4 Na₂-ATP, 0.44 Na-GTP (mit CsOH auf pH 7.3 eingestellt). Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurde in Konzentrationen von 50-1000µM zur Pipettenlösung hinzugegeben (alternativ 500µM Mag-fura5). Die Verwendung von CsCl und TEA bewirkt eine Blockierung von Kaliumkanälen wodurch rauscharme Messungen ermöglicht werden. Alternativ wurde bei Messungen in Betz Zellen und teilweise in transgenen (SOD1) hypoglossalen Motoneuronen auch 160 KCl, 11 Hepes, 2.2 MgCl₂, 4.4 Na₂-ATP, 0.44 Na-GTP (mit KOH auf pH 7.3 eingestellt) benutzt und Fura-2 in Konzentrationen von 50-1000µM hinzugegeben.

-Synaptische Strommessungen: 140 CsCl, 10 Hepes, 2 MgCl₂, 4 Na₂-ATP, 0.4 Na-GTP, 10 EGTA, 1 CaCl₂ (mit CsOH auf pH 7.3 eingestellt). Die Verwendung von 1mM CaCl₂ erleichtert die Sealbildung bei den Patch-Clamp Messungen.

-Einzelkanalmessungen: 160 KGlu, 2 MgCl, 10 Hepes, 4 Na₂-ATP, 0.4 Na-GTP, 10 EGTA, 1 CaCl₂ (mit NaOH auf pH 7.3 eingestellt). Alternativ wurde auch 200µM Fura-2 als Calciumpuffer verwendet und ohne CaCl₂ gemessen. Mit der Verwendung von

Kaliumgluconat vermeidet man die unphysiologisch hohen intrazellulären Cloridkonzentrationen, die bei der Verwendung herkömmlicher Salze auftreten.

2.5 Applikation von Glutamatrezeptor Agonisten

Die Drogenapplikation erfolgte entweder über die Badperfusion oder über iontophoretische Applikation. Eine Badapplikation von $100 - 200\mu$ M Kainat über 2 - 4s bewirkte Ströme bis zu 400pA, eine Badapplikation von 50 – 200 μ M NMDA über 10s resultierte in Strömen von bis zu 500pA. Für die iontophoretische Applikation wurden standard Patch-Pipetten in Verbindung mit einem Axoclamp 2A Meßverstärker (Axon Instruments, USA) oder einem TEC01C Meßverstärker (npi Elektronik, Tamm) in der Iontophorese-Einstellung verwendet. Dazu wurden die Pipetten mit extrazellulärer Lösung und 10mM Kainat oder 20mM NMDA gefüllt. Um ein Austreten der Agonistensubstanzen aus der Spitze der Iontophoresepipette zu vermeiden, wurde ein konstanter Rückhaltestrom von +40 - 50nA angelegt. Unter diesen Bedingungen bewirkten iontophoretische Ströme von 200nA – 1 μ A über einen Zeitraum von 25 – 50ms neuronale Glu-Rezeptor Ströme von bis zu 800pA bei der Kainat-Applikation und bis zu 500pA bei der NMDA-Applikation.

Zur Vermeidung eines spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstroms wurde das Haltepotential bei den Applikationsmessungen auf negativere Werte als gewöhnlich eingestellt, typischerweise auf -80mV.

2.6 Patch-clamp Ableitungen

2.6.1 Methode

Die Patch-clamp Messungen wurden mit einem "Single Electrode Clamp System" (SEC) vorgenommen, so daß im Spannungsklemm-Modus an einer Meßelektrode das Membranpotential vorgegeben und zugleich Ionenströme registriert werden konnten. Für die Patch-clamp Ableitungen wurde ein EPC9 Verstärker (Heka Elektronik, Lamprecht) in

Verbindung mit einem Macintoshcomputer verwendet. Die Patch-clamp Technik (Hamill et al., 1981) erlaubt eine rauscharme Registrierung von sehr kleinen Ionenströmen. An dem in dieser Arbeit verwendeten Setup (Abb. 2.3) konnten Ionenströme von bis zu 3pA eindeutig vom Hintergrundrauschen getrennt werden. Dies ist möglich, weil die Pipette einen sehr engen Kontakt zu der abschließenden Zellmembran bildet.



Abb. 2.3: Experimentelles Setup für Patch-clamp und mikrofluorometrische Messungen. Die im Mikroskop sichtbaren Neurone können auch im Videomonitor dargestellt werden. Der EPC9 Verstärker ist über einen A/D Wandler mit einem Macintosh Computer verbunden, dies ermöglicht die Aufzeichnung von Meßdaten.

Vor den Messungen wurden die Hirnschnitte zunächst in einer superfundierten Plexiglaskammer an einem mit Nylonfäden bespannten U-förmigen Platindraht (Grid) befestigt und bei Raumtemperatur (22° C) mit Extrazellulärlösung perfundiert. Anschließend erfolgte eine visuelle Identifikation der zu untersuchenden Kerngebiete mittels eines aufrecht stehenden Lichtmikroskops (Zeiss) bei 100-facher Vergrößerung. Die zu untersuchenden Neurone wurden bei 630-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektives (Zeiss Achroplan 63 x 0.9w) identifiziert und nach

morphologischen Kriterien wie Somagröße oder Ausprägung der distalen Dendriten, aber auch nach ihrer physiologischen Fitneß ausgewählt (Abb. 2.4). Zellen die aufgeschwemmt wirkten oder bei denen der Zellkern hervortrat, wurden nicht verwendet.



Abbildung 2.4: A, Interferenz-Kontrastbild von oculomotor Neuronen im Schnittpräparat. Erkennbar sind die für Motoneurone typischen großen Somata und distalen Dendriten. B, Fluoreszenzbild eines oculomotor Neurons nach Füllung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2. Die vollständige Beladung der Motoneurone mit dem Farbstoff erfolgte nach 10 - 12 Minuten. Dendritische Verzweigungen können hier besser erkannt werden.

Anschließend wurde die gefüllte Patchpipette mit Mikromanipulatoren (Spindler & Hoyer, Göttingen) bis in die Nähe der Zelloberfläche gebracht und anschließend mit einer Piezoelektrischen-Blocktranslatorsteuerung (PI, Waldborn) an die Zellmembran herangeführt. Das Anlegen eines Überdrucks während der gesamten Eintauchphase bis zur Sealbildung der Pipette war erforderlich, um zunächst eine Verschmutzung der Pipette im Medium zu verhindern, und anschließend, um das die Zellmembran umgebende Neuropil beiseite zu schieben. Befand sich die Pipettenspitze unmittelbar an der Zelloberfläche wurde die Zellmembran leicht eingedellt. Jetzt konnte der Überdruck weggenommen werden und die Membran durch leichtes Saugen an der Pipette in die Pipettenspitze eingesogen werden. Unter günstigen Bedingungen führte dies zur vollständigen Verschließung der Pipettenspitze, was sich durch die Bildung eines nahezu unendlich hohen Widerstandes zwischen Patchpipette und Badelektrode -eines sogenannten

Gigaseals- bemerkbar machte (Abb. 2.5). Im Anschluß wurde die Pipettenkapazität abkompensiert. Damit befand sich die Zelle in der cell-attached Konfiguration, die eine Messung elektrischer Aktivität in dem angesaugtem Membranfleck bereits ermöglicht. Nach dem Erreichen der cell-attached Konfiguration wurde vorsichtig an der Membran gesaugt, bis diese nach innen aufbrach und so ein elektrischer Zugang zur gesamten Zelle ermöglicht wurde (Ganzzell (whole-cell) -Konfiguration, Abb. 2.5)). Während der Messungen nach dem Spannungsklemme (voltage clamp) –Verfahren wurde gewöhnlich ein Haltepotential von –70mV eingestellt.



Abbildung 2.5: Pipettenströme nach depolarisierenden Spannungspulsen (+10mV, 5ms) relativ zum Haltepotential von -70mV in verschiedenen Phasen einer whole-cell Patch-clamp Ableitung. A, der Pipettenwiderstand wird durch die Haltestromamplitude angezeigt (hier $2M\Omega$). B, Haltestrom nach Ausformung eines Gigaseals in der cell-attached Konfiguration. C, passive Membraneigenschaften eines hypoglossalen Motoneurons nach Ausbilden der wholecell Konfiguration.

Neurone, die einen Serienwiderstand von mehr als $20M\Omega$ aufwiesen, wurden für die Analyse nicht verwendet. Im Anschluß erfolgte teilweise eine Serienwiderstandkompensation von bis zu 50% (Llano et al. 1991). Auf eine Kompensation des Lösungs-Übergangs-Potentials ("Liquid Junction Potential") wurde verzichtet.

Bis auf die Einzelkanalmessungen wurden alle elektrophysiologischen Messungen in der Ganzzell-Konfiguration durchgeführt. Bei den Einzelkanalmessungen wurde zunächst die Pipettenspitze nach dem Erreichen der Ganzzell-Konfiguration mit Hilfe der Piezosteuerung vorsichtig schräg nach oben zurückgezogen. Dies ermöglichte unter günstigen Bedingungen ein langsames Abscheren der Zellmembran und ein erneutes Zusammenschließen der Zellmembran um die Pipettenspitze. Die Außenseite der Zellmembran bleibt bei diesem Verfahren außen, man erhält daher einen outside-out Patch.

2.6.2 Datenanalyse

Die Ganzzell-Ströme wurden nach Filterung (3-Pol-Bessel Filter10kHz, 4-Pol-Bessel Filter 2.9kHz) mit einer Datenaufnahmefrequenz von 100Hz – 5kHz aufgezeichnet, die Einzelkanalmessungen mit 10kHz. Zur Steuerung des Patch-clamp Verstärkers, Datenaufnahme, online-Analyse sowie zur Steuerung der Applikationspulse wurde die Software Pulse 8.09 (HEKA Elektronic, Lambrecht) verwendet. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software Pulsfit (HEKA Elektronic, Lambrecht) und Igor Pro (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, USA).

Zur Rauschminimierung wurden die Daten gegebenenfalls mit 1 kHz gefiltert. Die Anstiegszeit der EPSCs wurde als die Zeit zwischen 10 – 90% der maximalen Amplitude der EPSCs definiert. Zur Bestimmung der EPSC-Abfallzeitkonstanten wurde zumeist ein einzelexponentieller "least square fit" an die Stromspur angelegt. Bei doppelexponentiellen EPSCs wurde eine gewichtete, durchschnittliche Abfallzeitkonstante (τ_w) gebildet, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten:

$$\tau_{\rm w} = [I_{\rm f} / (I_{\rm f} + I_{\rm s})] * \tau_{\rm f} + [I_{\rm s} / (I_{\rm f} + I_{\rm s})] * \tau_{\rm s} \text{ (Vicini et al. 1998),}$$
(1)

 I_f und I_s sind die Stromamplituden der schnellen und langsamen Abfallzeitkonstanten-Komponente, τ_f und τ_s sind die assoziierten Abfallzeitkonstanten.

Zur Bestimmung des Gesamtladungseinstroms bei Applikationsexperimenten wurde mit Hilfe der Software Pulsfit ein Stromintegral berechnet. Zur Abbildungserstellung wurde die Software Canvas (Deneba Systems) verwendet. Alle statistischen Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

2.7 Mikrofluorometrische Ca²⁺-Messungen

Für die mikrofluorometrischen Ca^{2+} -Messungen wurde ein computergesteuertes Monochromator/Photomultipier (Polychrome I, TILL Photonics, München) –System verwendet. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 2.6 schematisch dargestellt. Der Monochromator war mit dem Mikroskop über einen Quarzlichtleiter (Durchmesser 1.25mm, NA 0.25) verbunden und konnte innerhalb von 3ms die Anregungswellenlänge wechseln, wodurch schnelle ratiometrische Calciummessungen ermöglicht wurden.

Als Ca²⁺-Indikator wurde vorwiegend der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (Grynkewicz et al. 1985) verwendet (Abb. 2.6; vgl. auch Abb. 2.4).



Abbildung 2.6: Anregungsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen (alle Angaben in μ M). Die Fluoreszenzintensität wurde bei 510nm gemessen (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

Dieser Farbstoff weist die gleichen Ca²⁺-Bindungsstellen wie EGTA auf und vermindert die Fluoreszenzintensität Calciumbindung bei nach einer Anregung mit monchromatischem Licht mit längerer Wellenlänge als 360nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 360nm (F360) weist dieser Farbstoff jedoch einen sogenannten isosbestischen Punkt auf, hier ändert sich die Fluoreszenzintensität bei Calciumbindung nicht. Dies ermöglicht die Messung eines Ca²⁺-unabhängigen Fluoreszenzsignals, dessen Lichtintensität allein durch die verwendete Furakonzentration bestimmt wird. Das Ca²⁺- abhängige Fluoreszenzsignal (F390) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 390nm gemessen. Die vergleichsweise größere Intensitätsänderung bei 340nm konnte nicht genutzt werden, da das verwendete Wasserimmersionsmikroskop für Licht kürzerer Wellenlänge als 360nm eine schlechte Durchlässigkeit aufweist.

Mittels eines mit dem Photomultiplier verbundenem Viewfinders wurde über eine CCD-Kamera ein kleiner quadratischer Bereich (ca. $25\mu m^2$) ausgewählt, in dem die somatischen Ca²⁺-Messungen stattfinden sollten. Vor dem Durchbrechen der Membran und Füllen des Neurons mit Fluoreszenzfarbstoff wurde die gegebenenfalls vorhandene Hintergrundfluoreszenz mit offset-Potentiometern subtrahiert.

Das durch einen dichroischen Spiegel vom Anregungswellenlicht getrennte Fluoreszenzlicht wird in den Photomultiplier zurückgeworfen. Dieser registriert die Lichtintensität über Photonenaufschläge und wandelt diese in ein Spannungssignal um. Die Bildung des Verhältnisses bzw. Ratio (R) aus beiden Fluoreszenzsignalen liefert ein Maß für die intrazelluläre Calziumkonzentration, unabhängig von der verwendeten Fura-2 Konzentration:

$$R = F360 / F390.$$
 (2)

Die absolute freie intrazelluläre Calciumkonzentration [Ca]_i läßt sich ermitteln durch:

$$[Ca]_i = K_d * (R_{max} R_{min}) * (R - R_{min}) / (R_{max} - R).$$
(3)

 K_d ist die Dissoziationskonstante von Fura-2, R_{max} ist ein Kalibrationswert für unendlich hohe [Ca]_i und R_{min} für unendlich niedrige [Ca]_i. Diese wurden nach Grynkiewicz et al. (1985) ermittelt, indem die Neurone mit folgenden Pipettenlösungen gefüllt wurden (in mM):

 R_{min} : 130 CsCl, 30 TEACl, 11 HEPES, 2.2 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 0.44 Na-GTP, 10 BAPTA (auf pH 7.3 eingestellt mit KOH) und R_{max} : 130 CsCl, 30 TEACl, 11 HEPES, 2.2 MgCl₂, 4.4 Na₂ATP, 0.44 Na-GTP, 10 CaCl₂.

Die Dissoziationskonstante von Fura-2 (K_d) wurde für das verwendete mikrofluorometrische Setup experimentell nach Gleichung (3) ermittelt, indem für [Ca]_i ein von der Kalibrationslösung R_{medium} definierter Wert eingesetzt wurde.

R_{medium} (in mM): 130 CsCl, 30 TEACl, 11 HEPES, 2.2 MgCl₂, 4.4 Na₂ATP, 0.44 Na-GTP, 9.9 BAPTA, 6.6 CaCl₂ ergibt eine Endkonzentration von 450nM [Ca]_i.

Die Kalibrationskonstanten K_d , R_{max} und R_{min} wurden nach einigen Experimentiertagen nachbestimmt, um kleinen, vom mikrofluorometrischen Setup verursachten Änderungen zu entsprechen. Typische Werte für K_d , R_{min} und R_{max} waren 242nM, 0.2 und 3.

Neben Fura-2 wurde nur bei wenigen Pufferkapazitätsmessungen im Nucleus oculomotorius auch mag-Fura5 verwendet. Der niedrig-affine Fluoreszenzfarbstoff mag-Fura5 (Kd 31 μ M, Zhao et al. 1996) detektiert Ca²⁺-Änderungen im Bereich von ca. 1 - 100 μ M, besitzt ansonsten aber die gleichen spektralen Eigenschaften wie Fura-2 und kann in deutlich höheren Konzentrationen (500 μ M) eingesetzt werden, ohne daß eine starke Veränderung zelleigener Ca²⁺-Pufferungseigenschaften einsetzt. Dies ermöglicht eine Detektion von meßbaren Fluoreszenzänderungen unter annähernd physiologischen Bedingungen.

Zur Steuerung und Aufzeichnung der Fluoreszenzmessungen wurde die Software Pulse-Fit 8.09 (HEKA) eingesetzt, die Analyse von [Ca]_i erfolgte off-line nach dem Experiment mit der Software Igor Pro (Wavematrics, Oregon, USA).

Um einen standardisierten Fluoreszenzwert angeben zu können, der den Vergleich verschiedener mikrofluorometrischer Systeme möglich macht, wurde die Fluoreszenzintensität kleiner Plättchen (Durchmesser ca. 5 μ M), sog. bead units (BU, Cat. No. 184340, Polysciences Inc, PA, USA) regelmäßig gemessen und die Fluoreszenzintensität der [Ca]_i-Messungen in BU angegeben (Zhou & Neher, 1993). Alle statistischen Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, falls dies nicht anders gekennzeichnet wurde.

2.8 Quantitatives Modell zur Analyse der Ca²⁺-Homöostase und des Glu-Rezeptor vermittelten Ca²⁺-Einstroms in Motoneuronen

2.8.1 Quantitatives Modell zur Ermittlung von Parametern der Ca²⁺-Homöostase

In dieser Arbeit wurde die Ca²⁺-Homöostase in Motoneuronen nach der "added buffer" Methode von Neher & Augustine (1992) untersucht. Mit dieser Methode werden die komplex ausgeformten Neurone vereinfacht als ein kugelförmiges Gebilde mit homogenen Innenraum betrachtet. Da Ca²⁺-Konzentrationsänderungen in dem ausgewählten somatischen Bereich integriert werden, läßt sich über den Beitrag einzelner lokaler Ionenkanäle keine Aussage treffen. Diese Methode eignet sich jedoch, um die Gesamtheit der zytoplasmatischen Ca²⁺-Änderungen darzustellen und einen Vergleich der Ca²⁺-Homöostase zwischen verschiedenen Motoneuronenpopulationen herzustellen.

Nach dieser Methode stehen endogene, zelleigene Ca²⁺-bindende Substanzen, vor allem Proteine (Baimbridge et al. 1992), aber auch niedermolekulare Anionen (Zhou & Neher, 1993), negativ geladene Makromoleküle und Phospholipide (S), im Wettbewerb mit dem zugeführten Fluoreszenzfarbstoff, der als exogener Calciumpuffer (B) wirkt.

Die Ca²⁺-Pufferkapazität der endogenen Puffer (κ_s) und die Ca²-Pufferkapazität des zugeführten Ca²⁺-Indikators (κ_B ·) wird definiert durch:

$$\kappa_{\rm S} = \Delta [{\rm CaS}]_i / \Delta [{\rm Ca}^{2+}]_i ; \kappa_{\rm B} = \Delta [{\rm CaB}]_i / \Delta [{\rm Ca}^{2+}]_i.$$
(4)

 $[CaS]_i$ und $[CaB]_i$ stehen für die Konzentration des an endogene und an den exogenen Puffer gebundenen Calciums, $[Ca^{2+}]_i$ steht für die freie intrazelluläre Calciumkonzentration. Die während des Füllprozesses zunehmende Ca²⁺-Pufferkapazität ($\kappa_{B'}$) des Indikator-Farbstoffs wird ermittelt durch (Neher & Augustine, 1992; Neher, 1995; Helmchen et al. 1997):

$$\kappa_{B'} = [B]_T * K_d / (([Ca^{2+}]_{rest} + K_d) * ([Ca^{2+}]_{peak} + K_d)),$$
(5)

wobei $[Ca^{2+}]_{rest}$ die freie Calciumkonzentration im Ruhezustand, etwa vor einem depolarisierenden Spannungspuls, und $[Ca^{2+}]_{peak}$ die Spitzenkonzentration von freiem zytoplasmatischen Calcium danach darstellt. $[B]_T$ ist die Furakonzentration und K_d ist die Dissoziationskonstante des Ca²⁺-Indikators.

Das Absenken einer erhöhten freien zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration, eines sog. Calciumtransienten, läßt sich mit einer exponentiell abfallenden Zeitkonstante (τ) beschreiben (Neher & Augustine, 1992):

$$\tau = (1 + \kappa_{B'} + \kappa_S) / \gamma.$$
(6)

Die Abfallzeitkonstante (τ) der Calciumtransienten hängt zum einen von den existierenden Pufferkapazitäten ($\kappa_{B'} + \kappa_{S}$) ab, die in Wechselwirkung mit dem Calcium stehen und eine Absenkung des zytoplasmatisch erhöhten Ca²⁺ somit verlangsamen. Zum anderen hängt τ von der zellulären Extrusionsrate (γ) ab. γ gibt an, mit welcher Geschwindigkeit das zytoplasmatisch erhöhte Ca²⁺ aus der Zelle durch Pumpmechanismen über die Zellmembran entfernt wird oder durch Austauschmechanismen in zelleigene Kompartimente aufgenommen wird. Vereinfachend werden alle Extrusions- und Sequestrationsmechanismen in einer Extrusionsrate (γ) zusammengefaßt und als ungesättigt angesehen. Wichtig sind hierbei membranständige Ca^{2+} -ATPasen und Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (Fierro et al. 1998) sowie die Aufnahme von Ca^{2+} in das endoplasmatische Retikulum oder die Mitochondrien. Da κ_S und γ in der Regel als konstant angesehen werden, lassen sich die experimentell bestimmten Werte von κ_{B^+} und τ dazu nutzen, nach graphischer Analyse κ_S und γ zu bestimmten.

Auf ähnliche Weise werden die Amplituden der Calciumtransienten durch die Formel:

$$1 / A = (1 + \kappa_{B'} + \kappa_S) / (qCa^{2+}/2F)$$
(7)

beschrieben, wobei qCa²⁺ den Ca²⁺-vermittelten Ladungseinstrom pro Volumenelement beschreibt und F die Faraday-Konstante darstellt. Auch hier kann κ_S durch graphische Analyse bestimmt werden.

Eine weitere Analysemethode der endogenen Pufferkapazität ergibt sich aus der Zunahme der Fluoreszenzsignaländerung des 390er Signals (dF_{390}) nach einem stimulierten Ca²⁺-Einstrom mit zunehmender Pufferkonzentration, weil dann mehr Ca²⁺ vom Fluoreszenzfarbstoff gebunden werden kann (Neher, 1995; Helmchen et al. 1996; 1997):

$$dF_{390} = dF_{max} * \kappa_{B'} / (1 + \kappa_{B'} + \kappa_S),$$
(8)

wobei F_{max} den Sättigungswert von dF_{390} repräsentiert. Läßt sich dF_{390} auch bei zunehmender exogener Pufferkonzentration nicht mehr steigern, dann hat sich der exogene Puffer weitestgehend gegen endogene Puffer durchgesetzt und dF_{max} angenähert. Da sich der exogene Puffer (κ_B ·) per Definition bei dF_{max} vollständig gegen endogene Puffer durchgesetzt hat, sollte bei dem dF_{390} -Wert, der dF_{max} / 2 erreicht, ein Gleichgewicht zwischen der endogenen und exogenen Pufferkapazität vorliegen. Bei dF_{max} / 2 gilt daher $\kappa_S = \kappa_B$ ·. Experimentell wurde diese Analyse durch das Auftragen der dF_{390} -Werte gegen die κ_B ·-Werte durchgeführt, anschließend wurde ein fit analog zu Gleichung (8) mit zwei unbekannten (dF_{max} und κ_S) angelegt.

Um die Bedeutung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase für lokale Ca^{2+} -Signale sichtbar zu machen, muß zunächst die Zeit berücksichtigt werden, die ein Ca^{2+} -Ion durch einen Ionenkanal in das Zytoplasma diffundieren kann, bevor es von endogenen Puffern abgefangen wird (Neher, 1986):

$$t = (k_{on} * [B])^{-1},$$
 (9)

wobei k_{on} die Geschwindigkeit repräsentiert, mit der Calcium gebunden wird und [B] die Konzentration endogener zytoplasmatischer Ca²⁺-Puffer. K_{on} liegt für große Ca²⁺-bindende

Proteine wie Calbindin oder Parvalbumin im Bereich von 10^8 M/s. Mit einem vorgegebenem Wert für die Ca²⁺-Diffusionskonstante (D_{Ca} ca. 220µm² * s⁻¹) läßt sich durch diesen Prozeß ein schalenförmiger Bereich einer ungepufferten, freien Ca²⁺-Konzentrationserhöhung um offene Ca²⁺-Kanäle mit folgendem Durchmesser (L) definieren (Neher, 1986):

$$L = 2 \left(D_{Ca} / k_{on} * [B] \right)^{1/2}.$$
 (10)

Unter der Annahme, daß zytosolische Calciumpuffer überwiegend eine niedrige Ca^{2+} -Affinität mit K_d Werten um 10µM >> [Ca]_i (Zhou & Neher, 1993; Klingauf & Neher, 1997) aufweisen, folgt:

$$[\mathbf{B}] = \mathbf{K}_{\mathrm{d}} * \kappa_{\mathrm{S}}. \tag{11}$$

Dies ermöglicht eine Abschätzung der endogenen Pufferkonzentration, wenn die endogene Pufferkapazität bekannt ist. Hierdurch konnte die Größe von lokalen (ungepufferten) Ca²⁺-Domänen in Abhängigkeit von der endogenen Pufferkapazität ermittelt werden.

2.8.2 Quantitatives Modell zur Analyse des Glu-Rezeptor vermittelten Ca²⁺-Einstroms

Für die Ermittlung des Calciumanteils am Gesamtstrom, der durch Glu-Rezeptor vermittelte Ströme in die Neurone getragen wird, wurde im weiteren wie folgt vorgegangen:

Die Gesamtmenge Ca^{2+} ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$), die in die Neurone einströmt, läßt sich in drei Kompartimente aufteilen:

$$\Delta[Ca^{2+}]_{tot} = \Delta[Ca]_i + \Delta[CaB]_i + \Delta[CaS]_i, \qquad (12)$$

wobei Δ [Ca]_i die freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration darstellt; Δ [CaB]_i bildet das vom exogenen Puffer gebundene Ca²⁺ und Δ [CaS]_i das von endogenen Puffern gebundene Ca²⁺. Dies läßt sich umformen zu (vgl. Formel 4):

$$\Delta[\operatorname{Ca}^{2+}]_{\text{tot}} = \Delta[\operatorname{Ca}]_{i} * (1 + \kappa_{B'} + \kappa_{S}).$$
(13)

Für die Glu-Rezeptor abhängigen Ca^{2+} -Messungen war es notwendig, daß $\kappa_{B^{+}}$ weitestgehend über κ_{S} dominiert, damit einströmendes Ca^{2+} maximale Fluoreszenzänderungen hervorrufen konnte und damit auch der Großteil des einströmenden Ca^{2+} detektiert werden konnte. Hypoglossale Motoneurone werden durch

eine niedrige endogene Pufferkapazität ($\kappa_s = 41$) charakterisiert (Lips & Keller, 1998). Dies zeigt, daß relativ hohe exogene Pufferkonzentrationen (z. B. 400µM Fura-2) bereits weitgehend über die endogenen Puffer dominieren können. Der Anteil des Glu-Rezeptor abhängigen Ca²⁺-Einstroms am Gesamteinstrom wurde mit zwei unterschiedlichen Analysemethoden untersucht. Die direktere Methode war, zunächst die Änderungen im dF390-Fluoreszenzsignal (Δ f390) nach stimulierten hochspannungsaktivierten (HVA) reinen Calciumeinströmen zu detektieren (Hille, 1992). Dies führt zu maximalen Fluoreszenzänderungen (fmax):

$$fmax = \Delta f390 / ICa^{dt}, \tag{14}$$

wobei ICa^{dt} das Stromintegral des HVA-Calciumeinstroms darstellt (pA * s). Der Vergleich von fmax mit f vom Glu-Rezeptor vermittelten partiellen Calciumeinstrom f = $\Delta f390 / I^{dt}$ führt zu:

$$f / fmax = ICa^{dt} / I^{dt} = P_f,$$
(15)

wobei P_f (fraktionaler Calciumstrom) den Calciumanteil am Glu-Rezeptor vermittelten Gesamtstrom (I^{dt}) repräsentiert (Schneggenburger et al. 1993). Mit verwendeten Fura-2 Konzentrationen von mindestens 400µM in der Pipettenlösung und bei voller Beladung der Neurone mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurden bei jeder Glu-Rezeptor Agonist abhängigen Applikationsmessung fmax-Konditionen weitgehend erreicht. Die fmax-Werte wurden an jedem Experimentiertag neu ermittelt, um kleinen vom mikrofluorometrischen Setup bedingten Änderungen vorgreifen zu können. Ein typischer Wert für fmax war 8.9 * 10⁻³ bead units (BU) / pC (1mM Fura-2).

Die andere Analysemethode bestand darin, die Änderungen der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration für durch einen Spannungssprung ausgelöste reine (HVA) Calciumströme und Glu-Rezeptor vermittelte Ströme nach Formel 3 zu bestimmen:

$$[Ca]_i = Kd * (R_{max} / R_{min}) * (R - R_{min}) / (R_{max} - R).$$
(3)

Dies führt zu einem prozentualen Wert (P(Ca)), der einen quantitativen Vergleich zwischen Ca^{2+} -Erhöhungen zuläßt, denen unterschiedliche Ca^{2+} -Einstrommechanismen zugrunde liegen:

$$P(Ca) = (\Delta[Ca]_i / ICa^{dt}) / (\Delta[Ca]_i / I^{dt}).$$
(16)

Ein typischer Wert für eine hochspannungsaktivierte Calciumstrom vermittelte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung war 1.3pC / 1nM (1mM Fura-2).

Ergebnisse

In den bei der ALS-Erkrankung selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen (De Paul et al. 1988; Elliot & Snider, 1995) kommt es in Verbindung mit der exzitatorischen synaptischen Aktivität zu einem Glutamat-Rezeptor vermittelten Ca²⁺-Einstrom (Ghosh & Greenberg, 1995). Dieser Ca²⁺-Einstrom wird durch AMPA/KA- und NMDA-Rezeptor vermittelte Ionenströme ausgelöst (Burnashev et al. 1995). Beeinträchtigungen der Glu-Rezeptor vermittelten Ströme in Verbindung mit einer Störung der zellulären Ca²⁺-Homöostase wurden in vorherigen Untersuchungen mit der selektiven Vulnerabilität der hypoglossalen Motoneurone in Zusammenhang gebracht (Choi, 1987; Medina et al. 1996, Meldrum & Gathwaite, 1990; Rothstein et al. 1992; Rothstein et al. 1995). Andererseits wurden Änderungen der spannungsabhängigen Ca²⁺-Signale mit einer neurodegenerativen Wirkung in Verbindung gebracht (Appel et al. 1995; Ho et al. 1996; Smith et al. 1992). Eine quantitative Analyse des Glu-Rezeptor vermittelten Ca²⁺-Einstroms sollte die

Eine quantitative Analyse des Glu-Rezeptor vermittelten Ca⁻⁺-Einströms sollte die Bedeutung der Glu-Rezeptor vermittelten Signale für die zelluläre Ca²⁺-Homöostase aufklären. Zudem sollte überprüft werden, welche Bedeutung für die zelluläre Ca²⁺-Homöostase demgegenüber der AP-vermittelten, elektrischen Aktivität zukommt, die zu einem Ca²⁺-Einström durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle führt (Hille, 1992; Snutch & Reiner, 1992; Umemiya & Berger, 1994).

3.1 Atemfrequenz junger Mäuse

Die Atemfrequenz von 16 postnatalen Mäusen im Alter von P1 bis P5 wurde mit plethysmographischen Messungen untersucht (Jacquin et al., 1996; vgl. Methode). Es ist bekannt, daß im Nucleus hypoglossus eine rhythmische elektrische Aktivität generiert wird, die mit dem Atemrhythmus gekoppelt ist (Brockhaus et al. 1993). In Verbindung mit jedem Atemzug kommt es zu einer synchron gesteigerten synaptischen Aktivität in den hypoglossalen Motoneuronen, die ihrerseits die Generierung mehrerer Aktionspotentiale (in Salven) nach sich zieht. Im Zuge dieser Zunahme der elektrischen Aktivität in Verbindung mit jedem Atemzug kommt es auch zu Erhöhungen der zytosolischen Ca²⁺- Konzentration (Freermann et al. 1998, Lips et al. 1999). Mit Hilfe der plethysmographischen Messungen sollte geklärt werden, wie häufig ein mit dem Atemrhythmus verbundener vermehrter Ca^{2+} -Einstrom unter natürlichen Bedingungen (in vivo) auftreten kann, der unter Umständen mit der selektiven Vulnerabilität der hypoglossalen Motoneurone im Zusammenhang steht.

Bei dem Atemverhalten wurde zwischen Ruheatmung und Streßatmung unterschieden. Bei der Ruheatmung bewegten sich die Mäuse nicht und machten einen entspannten Eindruck, während die Mäuse bei der Streßatmung unruhig wirkten und sich teilweise bewegten (Abb. 3.1).



Abbildung 3.1: Plethysmographische Atemfrequenzanalyse an jungen Mäusen. Die Atemfrequenz ist von postanatalen Mäusen (P1 bis P5) in Hertz \pm SEM angegeben (n = 16 Mäuse, 3 bis 4 Mäuse pro Alter). Die Atemfrequenz stieg von P1 bis P5, sowohl bei der Ruheatmung, als auch bei der Streßatmung. Oben links ist das unterschiedliche Atemverhalten einer P5-Maus demonstriert.

Bei beiden Atemverhalten wurden entwicklungsabhängige Änderungen von P1 bis P5 festgestellt, wobei ein langsamer Anstieg der Atemfrequenz von P1 (Ruheatmung 2.5 \pm 0.4Hz; Streßatmung 3.2 \pm 0.3 Hz; SEM, n = 3 Mäuse) bis P4 (Ruheatmung 3.0 \pm 0.3Hz; Streßatmung 4.2 \pm 0.4Hz; SEM, n = 4 Mäuse) zu beobachten war und ein großer Anstieg

der Atemfrequenz bis P5 (Ruheatmung 4.0 ± 0.1 Hz; Streßatmung 5.8 ± 0.4 Hz; SEM, n = 4 Mäuse).

3.2 Synaptische Aktivität in hypoglossalen Motoneuronen

Während der Ganzzell Patch-clamp Messungen in hypoglossalen Motoneuronen wurden spontane synaptische Ströme bis zu einer Frequenz von 20Hz gemessen (Abb. 3.2). Bei Verwendung von CsCl als Hauptbestandteil der Pipettenlösung (vgl. Methode 2.4.2) erschienen die inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSCs) als einwärtsgeleitete Ionenströme, da die hohe intrazelluläre Cloridkonzentration bei einer Öffnung von Cloridleitenden Ionenkanäle einen Ausstrom von Clorid-Anionen hervorruft. Unter physiologischen Bedingungen würde die Öffnunung dieser Ionenkanäle einen Clorid-Einstrom hervorrufen. Die IPSCs in hypoglossalen Motoneuronen werden überwiegend durch glycinerge, teilweise auch durch gabaerge Rezeptorkanäle geleitet und machen den Hauptbestandteil der spontanen synaptischen Aktivität aus. Nach der Blockierung der IPSCs mit Strychnin (glycinerge) und Bicucullin (gabaerge) konnten die verbliebenen exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs) pharmakologisch als AMPA/KA- und NMDA-Rezeptor vermittelte Ionenströme identifiziert werden (Abb. 3.2), die selektiv mit CNOX und APV blockiert werden konnten. NMDA EPSCs wurden aufgrund der spannungsabhängigen Blockierbarkeit des NMDA-Rezeptorkanals auch durch extrazelluläres Magnesium bei einem Haltepotential von -70mV unterbunden. Daher wurden die Messungen der NMDA EPSCs in nominell Mg²⁺-freier extrazellulärer Lösung vorgenommen. Die zusätzliche Badapplikation des NMDA-Rezeptor Koagonisten Glycin (10µM) erbrachte keine Steigerung der synaptischen Aktivität. Zur pharmakologischen Isolation der AMPA/KA EPSCs wurde Standardringer mit 2mM Mg²⁺ verwendet (Abb. 3.2). Weitere synaptische Ionenströme wurden nicht detektiert.

Für die Messung der Miniatur-EPSCs wurde 1µM TTX zu der Meßlösung hinzugegeben. TTX blockiert selektiv spannungsabhängige Natriumkanäle, damit wird eine synaptische Signalweiterleitung in den Neuronen unterbunden. Spontane Vesikelentleerungen an der präsynaptischen Membran können aber weiterhin zur Aktivierung von Rezeptorkanälen führen. Man erhält daher einen elementaren synaptischen Strom, der durch die Entladung eines Vesikels an der präsynaptischen Membran ausgelöst wurde.



Abbildung 3.2: Pharmakologische Isolation von spontanen Glu-Rezeptor vermittelten Ionenströmen. A, unter Kontrollbedingungen oder bei der Verwendung von extrazellulärer Lösung ohne Mg²⁺ wurde eine hohe synaptische Aktivität festgestellt, die bis zu 20Hz erreichen konnte. Nach der Zugabe von 10µM Strychnin und Bicucullin wurden die meisten synaptischen Ströme unterbunden. Dies zeigt, daß der Großteil der synaptischen Ströme in hypoglossalen Motoneuronen von glycinergen und gabaergen Rezeptorkanälen vermittelt wird. Nach Zugabe von 10µM CNQX konnten die NMDA-Rezeptorströme isoliert werden, die durch die Zugabe von 40µM APV selektiv blockiert wurden. Der APV-Effekt war reversibel. B, AMPA/KA-Rezeptorströme wurden in Standard Extrazellulärlösung (enthält 2mM Mg²⁺) und durch die Zugabe von 10µM Strychnin und Bicucullin isoliert. Die synaptische Aktivität wurde anschließend vollständig durch die Zugabe von 10µM CNQX blockiert.

3.2.1 Profil der AMPA/KA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs in hypoglossalen Motoneuronen

Mit Ganzzell-Ableitungen im Spannungsklemm Modus bei einem angelegten Haltepotential von –70mV konnten AMPA/KA vermittelte spontane und Miniatur-EPSCs pharmakologisch isoliert werden (vgl. 3.2). Der Abfall der Stromamplituden der AMPA/KA-Rezeptorströme konnte gut mit einer einzelexponentiellen Funktion beschrieben werden. Die spontanen AMPA/KA EPSCs erreichten durchschnittliche Amplituden von 30.4 ± 12.7 pA (n = 8 Zellen). Die Abfallzeitkonstante der spontanen AMPA/KA-Rezeptorströme betrug 3.4 ± 1.8 ms (n = 8 Zellen). Die Anstiegszeit der spontanen AMPA/KA EPSCs von 0.64 ± 0.26 ms (10 – 90%; n = 8 Zellen) sowie die Abfallzeitkonstante entsprachen der typisch schnellen Aktivierung und Deaktivierung dieses Glutamatrezeptortyps (Abb. 3.3).

Die AMPA/KA Miniatur-EPSCs erreichten durchschnittliche Amplituden von 19.4 \pm 6.8pA (n = 6 Zellen), damit erreichten die elementaren AMPA/KA EPSCs 64% der spontanen EPSC Amplituden. Die durchschnittliche Abfallzeitkonstante der AMPA/KA Miniatur-EPSCs war mit 3.7 \pm 1.5ms (n = 6 Zellen) vergleichbar mit der spontanen EPSC Abfallzeitkonstante, und auch die Anstiegszeit der AMPA/KA Miniatur-EPSCs erreichte mit 0.69 \pm 0.22ms (10 – 90%; n = 6 Zellen) vergleichbare Werte (Abb. 3.3).


Abbildung 3.3: Profil der AMPA/KA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs in hypoglossalen Motoneuronen. A, spontane AMPA/KA EPSCs nach pharmakologischer Isolation (vgl. 3.2). B, AMPA/KA Miniatur-EPSCs wurden unter Hinzugabe von 1 μ M TTX zur Meßlösung gemessen. Die elementaren synaptischen Ereignisse erreichten geringere Amplituden. C, Diagramm der Abfallzeitkonstanten, Amplituden und Anstiegszeiten (10 – 90%) der spontanen (n = 6 Zellen) und Miniaturströme (n = 8 Zellen) der AMPA/KA-Rezeptoren. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

In Abbildung 3.4 erkennt man die relativ große Variabilität in den Stromamplituden und Abfallzeitkonstanten der spontanen AMPA/KA EPSCs in hypoglossalen den Motoneuronen (n = 7 Zellen). Dies deutet auf eine variable Aktivierung einzelner präsynaptischer exzitatorischer Fasern hin. Diese Variabilität könnte aber auch auf unterschiedliche AMPA/KA-Rezeptorkanalmengen an einzelnen postsynaptischen Membranen zurückzuführen sein oder auch auf Fluktuationen der in

Öffnungswahrscheinlichkeit einzelner Rezeptorkanäle (O'Brien et al. 1997; Faber et al. 1992), da auch bei den AMPA/KA Miniatur-EPSCs eine Variabilität in den Amplituden und Abfallzeitkonstanten detektiert werden konnte. Abb. 3.4 verdeutlicht auch, daß zwischen den Abfallzeitkonstanten der spontanen AMPA/KA EPSCs und den Stromamplituden keine Abhängigkeit bestand (Pearson's r = 0.12, n = 7 Zellen). Zwischen den Anstiegszeiten (10 - 90%) und den Abfallzeitkonstanten wurde jedoch eine gewisse Abhängigkeit festgestellt (Pearson's r = 0.47; n = 7 Zellen). Verlangsamte Anstiegszeiten hatten auch vermehrt langsame Abfallzeitkonstanten der spontanen EPSCs zur Folge. Dies deutet darauf hin, daß elektrotonische Filterung teilweise für langsame EPSC-Abfallzeitkonstanten distalen Dendriten verantwortlich war, von da langsame Anstiegszeiten auf vom Soma entfernt liegende synaptische Ereignisse hinweisen, und hier nur eine unvollständige Spannungskontrolle während schneller Leitfähigkeitsänderungen besteht (Hestrin et al. 1990, Spruston et al. 1994).



Abbildung 3.4: Variabilität der Amplituden, Abfallzeitkonstanten und Anstiegszeiten der spontanen AMPA/KA EPSCs. A, Auftragung der Amplituden der sEPSCs AMPA/KA gegen die Abfallzeitkonstanten. Ein angelegter linearer Regressionsfit (Pearson's r = 0.12) verdeutlicht die annähernde Unabhängigkeit beider Parameter (n = 7Zellen). B, in B sind die Anstiegszeiten (10 – 90%) der AMPA/KA sEPSCs gegen die Abfallzeitkonstanten aufgetragen. Ein linearer Regressionsfit verdeutlicht eine leichte Abhängigkeit beider Parameter (r = 0.47; n = 7 Zellen).

3.2.2 Profil der NMDA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs in hypoglossalen Motoneuronen

Die pharmakologische Isolierung der NMDA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs (vgl. 3.2) konnte bei unterschiedlich angelegten Haltepotentialen (HP -70mV und +50mV) im Spannungsklemm-Modus erzielt werden (Abb. 3.5). Um eine spannungsabhängige Blockierung der NMDA-Rezeptorkanäle durch Magnesium zu vermeiden, wurden die Messungen in magnesiumfreier extrazellulärer Lösung durchgeführt. Der Abfall der NMDA-Rezeptor EPSCs vollzog sich teilweise in unterschiedlichen Phasen und konnte dann am besten mit einer biexponentiellen Funktion erfaßt werden. Um eine Vergleichbarkeit der überwiegend monoexponentiell abfallenden NMDA EPSCs mit den biphasischen EPSCs zu gewährleisten, wurde eine gewichtete mittlere Abfallzeitkonstante (τ_w) gebildet (vgl. 2.6.2).

Die spontanen NMDA EPSCs wiesen eine hohe Variabilität in der durchschnittlichen Amplitude von 46.4 ± 34.3 pA (n = 30 Zellen) bei einem vorgegebenen Membranpotential von -70mV und 42.7 ± 26.9 pA (n = 9 Zellen) bei einem eingestellten Membranpotential von +50mV auf. Dies deutet darauf hin, daß variable Mengen von präsynaptischen Endungen während eines EPSCs aktiviert wurden, kann aber auch auf unterschiedliche NMDA-Rezeptorkanalmengen an einzelnen postsynaptischen Membranendigungen oder auch auf Fluktuationen in der Öffnungswahrscheinlichkeit einzelner Rezeptorkanäle zurückzuführen sein (O'Brien et al. 1997; Faber et al. 1992), da auch bei den NMDA Miniatur-EPSCs variable Amplituden und Abfallzeitkonstanten beobachtet wurden (Abb. 3.5). Zudem traten bei den spontanen NMDA EPSCs variable, aber generell schnelle Abfallzeitkonstanten von 32.2 ± 14.9 ms (n = 30 Zellen) bei dem angelegten Haltepotential von -70mV und 49.4 ± 20.4 ms (n = 9 Zellen) bei dem angelegten Haltepotential von +50mV auf. Dies zeigt aufgrund der verlängerten Abfallzeitkonstanten bei dem angelegten Haltepotential von +50mV eine Spannungsabhängigkeit der NMDA-Rezeptorkanal Aktivität in den hypoglossalen Motoneuronen an. Die schnelleren Abfallzeiten bei –70mV könnten aber auch teilweise durch eine Verunreinigung der nominell magnesiumfreien Meßlösung im nanomolaren Bereich und einer damit verbundenen partiellen spannungsabhängigen Inaktivierung des NMDA-Rezeptorkanals hervorgerufen worden sein. Die Anstiegszeiten der spontanen NMDA EPSCs waren vergleichbar bei -70mV mit 5.6 ± 3.1 ms (10 – 90%) und bei +50mV mit 5.5 ± 2.9 ms (10 – 90%; n = 9 Zellen).





Abbildung 3.5: Profil der NMDA-Rezeptor vermittelten spontanen und Miniatur-EPSCs in hypoglossalen Motoneuronen. A, spontane NMDA EPSCs nach pharmakologischer Isolation (vgl. 3.2) in Mg²⁺-freier Meβlösung. Die EPSCs weisen eine hohe Variabilität in den Amplituden,

Abfallzeiten und zum Teil auch in den Abfallphasen auf. B, die NMDA Miniatur-EPSCs wurden unter den gleichen Bedingungen wie die spontanen EPSCs unter Hinzugabe von 1 μ M TTX zur Meßlösung (vgl. 3.2) detektiert. Die aus einzelnen Vesikelentladungen hervorgehenden EPSCs wiesen geringere Amplituden als die sEPSCs auf. C, Diagramm der Abfallzeitkonstanten, Amplituden und Anstiegszeiten (10 – 90%) der spontanen NMDA EPSCs bei einem vorgegebenen Membranpotential von –70mV (n = 21 Zellen; schwarze Säulen) und +50mV (n = 9 Zellen); im Vergleich NMDA Miniatur-EPSCs bei einem vorgegebenen Membranpotential von –70mV (n = 6 Zellen; schwarze Säulen) und +50mV (n = 3 Zellen). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die NMDA Miniatur-EPSCs wiesen durchschnittliche Amplituden von 20.7 ± 10.0 pA (n = 6 Zellen) bei –70mV und 19.0 ± 6.9 pA (n = 3 Zellen) bei +50 mV auf (Abb. 3.5). Dies zeigt, daß die NMDA Miniatur-EPSCs durchschnittlich weniger als die Hälfte der sEPSC-Amplituden erreichten. Die durchschnittlichen Abfallzeitkonstanten der NMDA Miniatur-EPSCs unterschieden sich weniger bei unterschiedlichen Haltepotentialen als die spontanen, mit 40.1 ± 15.0 ms (HP –70mV; n = 6 Zellen) und 42.8 ± 21.9 ms (HP +50mV; n = 3 Zellen). Die durchschnittlichen Anstiegszeiten der NMDA Miniatur-EPSCs waren vergleichbar bei dem angelegten Haltepotential von –70mV mit 6.4 ± 3.2 ms (10 - 90%, n = 6 Zellen) und bei dem angelegten Haltepotential von +50mV mit 5.7 ± 3.0 ms (10 - 90%; n = 3 Zellen).

In Abbildung 3.6 ist die Variabilität in den durchschnittlichen Amplituden, Anstiegszeiten und Abfallzeitkonstanten der spontanen NMDA EPSCs dargestellt (n=7 Zellen; HP -70mV). Hier wird deutlich, daß keine wesentliche Korrelation zwischen den Amplituden und Abfallzeitkonstanten der NMDA sEPSCs bestand (Pearson's r=0.11). Zudem bestand keine Abhängigkeit zwischen den durchschnittlichen Anstiegszeiten (10 – 90%) und den Abfallzeitkonstanten der NMDA sEPSCs (Pearson's r= 0.07).

Dies verdeutlicht, daß die ermittelte Kinetik der NMDA EPSCs von den Eigenschaften der Ionenkanäle bestimmt wurde und, bietet keinen Hinweis auf elektrotonische Filterung.



Abbildung 3.6: Variationen der Amplituden, Abfallzeitkonstanten und Anstiegszeiten der NMDA-Rezeptor vermittelten spontanen EPSCs. A, Amplituden der NMDA sEPSCs als Funktion der Abfallzeitkonstanten (n = 7 Zellen; HP –70mV). Ein angelegter linearer Regressionsfit (Pearson's r = 0.11) belegt die annähernde Unabhängigkeit beider Parameter. B, Anstiegszeiten (10 - 90%) der NMDA sEPSCs als Funktion der Abfallzeitkonstanten (n = 7 Zellen, HP –70mV). Ein angelegter linearer Regressionsfit (Pearson's r = 0.11) belegt die annähernde Unabhängigkeit beider Parameter. B, Anstiegszeiten (10 - 90%) der NMDA sEPSCs als Funktion der Abfallzeitkonstanten (n = 7 Zellen, HP –70mV). Ein angelegter linearer Regressionsfit (Pearson's r = 0.07) belegt keine Korrelation.

3.3 Einzelkanalmessungen von NMDA-Rezeptorströmen in hypoglossalen Motoneuronen

Um die ionalen Eigenschaften der NMDA-Rezeptorkanäle weiter untersuchen zu können, wurden Einzelkanalmessungen vorgenommen. Hierzu wurde die Öffnung der NMDA-Rezeptorkanäle durch Badapplikation von NMDA induziert. Um eine spannungsabhängige Mg²⁺-induzierte Inaktivierung der NMDA-Rezeptorkanäle zu vermeiden, wurden auch diese Messungen in nominell Mg²⁺-freier Meßlösung durchgeführt. Um überhaupt NMDA Einzelkanalströme isoliert messen zu können, wurden die Einzelkanalmessungen im Spannungsklemm-Modus an outside-out Patches (vgl. 2.6.1) vorgenommen. Andere Membranleitfähigkeiten wurden bei den Einzelkanalmessungen durch Zugabe von selektiven Ionenkanalblockern in die Meßlösung, so weit wie möglich, unterdrückt (10µM Bicucullin, Strychnin, CNQX, 30mM TEA, 1µM TTX; vgl. 2.4.2).

In Abb. 3.7 ist die NMDA-Einzelkanalaktivität in den hypoglossalen Motoneuronen nach Badapplikation von 10µM NMDA bei einem eingestellten Membranpotential von -70mV dargestellt. Die Einzelkanalaktivität konnte zur pharmakologischen Isolation nach Zugabe von 40µM APV oder 2mM Mg²⁺ vollständig selektiv blockiert werden (vgl. Kontrolle). Die Analyse der NMDA-Einzelkanalströme ergab eine durchschnittliche Leitfähigkeit der $(56.9 \pm 2.6; n)$ NMDA-Rezeptorkanäle von 57pS =5 Zellen), mit Einzelkanalstromamplituden von 3.98 ± 0.18 pA (n = 5 Zellen) bei dem angelegten Haltepotential von -70mV. Dies zeigt, daß 5 NMDA-Rezeptorkanäle während eines durchschnittlichen Miniatur-EPSC gleichzeitig geöffnet waren (vgl. 3.2.1; mEPSC-Amplitude: 20.7 ± 10.0 pA; HP –70mV). Nur gelegentlich wurden Einzelkanalöffnungen mit anderen Leitwerten beobachtet. Bei den Messungen an allen analysierten outside-out Patches (n = 5) traten die Einzelkanalöffnungen zumeist gedrängt, in sogenannten Clustern auf (Gibb & Colquhoun, 1991). Diese gesteigerten Aktivitätsphasen dauerten jeweils deutlich weniger als 100ms an und entsprachen damit den schnellen NMDA EPSC Abfallzeitkonstanten (vgl. Abb. 3.6).



Abbildung 3.7: Einheitliche Aktivität der NMDA-Rezeptorströme in outside-out Patches der hypoglossalen Motoneurone. A, NMDA Einzelkanalströme in der outside-out Patch Konfiguration, bei einem angelegten Haltepotential von –70mV aufgenommen, während einer Badapplikation von 10µM NMDA. Jede Spur wurde an einem anderen outside-out Patch aufgenommen. In allen Fällen (n = 5 Zellen) wurden überwiegend Amplituden um 4pA (gepunktete Linie) detektiert; dies führt zu einem Hauptleitwert von 57pS für die NMDA Einzelkanalströme. B, die Kanalöffnungen traten gehäuft, in sogenannten Clustern auf. Die gesteigerten Aktivitätsphasen der NMDA-Rezeptorkanäle hielten jeweils nur für kürzere Zeiträume als 100ms an, dies erklärt die schnellen Abfallzeiten der NMDA EPSCs.

3.4 Applikation von Glutamatrezeptor Agonisten und somatische Ca²⁺-Messungen in hypoglossalen Motoneuronen

Zur Auslösung von Glu-Rezeptor vermittelten Calciumströmen wurden durch iontophoretische Applikation oder Badapplikation die Glu-Rezeptor Agonisten Kainat und NMDA appliziert (vgl. 2.5). Die hierdurch ausgelösten Gesamteinströme wurden mit somatischen Calciummessungen in Beziehung gesetzt, um den Ca^{2+} -Anteil am Gesamtstrom ermitteln zu können (vgl. 2.8.2). Die iontophoretische Applikation bietet den Vorteil, daß schnell ansteigende und abfallende Glu-Rezeptor abhängige Summenströme lokal ausgelöst werden können, welche die Zuordnung eines klar definierten Stromsignals zu einer somatischen Ca^{2+} -Antwort zulassen. Allerdings werden hierdurch keine so großen Glu-Rezeptor abhängige Summenströme ausgelöst wie bei der Badapplikation, was bei der vergleichsweise geringen Ca^{2+} -Permeabilität der AMPA/KA-Rezeptorkanäle eine Detektion von somatischen Ca^{2+} -Änderungen erschwerte. Deshalb wurden beide Verfahren angewendet.

3.4.1 Calciumanteil am Gesamteinstrom durch den AMPA/KA-Rezeptorkanal

Die iontophoretische Applikation von 10mM Kainat auf das Zellsoma im Ganzzell Spannungsklemm Modus resultierte in einem Ca²⁺-Einstrom, der auf maximal 1% des Gesamtladungseinstroms eingeschätzt wurde (Abb. 3.8; n = 4 Zellen), aufgrund des hohen Rauschfaktors aber nicht genauer analysiert werden konnte. Die Badapplikation von 100 -200µM Kainat ermöglichte es, viel größere Glu-Rezeptor abhängige Ladungseinströme auszulösen und in Verbindung damit größere Calciumeinströme. Die Analyse des Ca²⁺-Anteils am AMPA/KA-Rezeptor vermittelten Gesamtladungseinstrom führte zu einem Wert für den fraktionalen Calciumstrom (Schneggenburger et al. 1993; P_f) von 1.2 ± 0.5% (n = 4 Zellen; Abb. 3.8). Bei dieser Analysemethode wurde der Ca²⁺-Anteil des AMPA/KA-Rezeptor abhängigen Gesamteinstroms direkt über Änderungen des dF390er Fluoreszenzsignals ermittelt (vgl. 2.8.2). Eine andere Analysemethode bestand darin, die Änderungen der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration nach der Applikation von Glu-Rezeptor Agonisten und nach dem Auslösen von reinen HVA Calciumeinströmen in Beziehung zu setzen. Auch hieraus ließ sich ein prozentualer Wert des Ca²⁺-Anteils am





Abbildung **3.8**: AMPA/KA-Ca²⁺-Rezeptorkanal vermittelte Permeabilität. Der Glu-Rezeptor Agonist Kainat wurde iontophoretisch (n=4 Zellen) oder durch Badperfusion (n=4 Zellen) appliziert, die ausgelösten und Ströme und intrazellulären Änderungen der Ca²⁺-Konzentration simultan gemessen. А, eine iontophoretische Applikation von 10mM Kainat führte in diesem Experiment einem Gesamtzu ladungseinstrom von 400pC (eingegrenzt durch gestrichelte Linien) und einer damit verbundenen Erhöhung der freien zytoplasmatischen Calciumkonzentration [Ca]_i von unter 2nM, die aufgrund des stark verrauschten Signals nicht näher quantifiziert werden konnte. Dies führte zu einer Abschätzung

des Ca²⁺-Anteils am Gesamtladungseinstrom von unter 1% (P_f & P(Ca)). Das Haltepotential wurde in diesem Experiment auf –100mV eingestellt, um einen spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstrom, bedingt durch eine iontophoretisch ausgelöste Membrandepolarisation, zu vermeiden. B, Badapplikation von 200 μ M Kainat über 2s (durch Balken angezeigt). Während der Badapplikation wurde das Haltepotential auf –80mV eingestellt. In diesem Experiment bewirkte die Badapplikation einen Glu-Rezeptor vermittelten Gesamtladungseinstrom von 4753pQ (durch gestrichelte Linien eingegrenzt) und eine damit verbundenen Änderung in [Ca]_i von 15nM. Dies führte in der Analyse zu Werten von P_f = 0.9% und P(Ca) = 0.35% (vgl. 2.8.2).

3.4.2 Calciumanteil am Gesamteinstrom durch den NMDA-Rezeptorkanal

Für eine detaillierte Analyse der NMDA-Rezeptorströme in den hypoglossalen Motoneuronen wurden im Spannungsklemm-Modus iontophoretisch ausgelöste, somatische NMDA Applikationen bei einer schrittweisen Änderung des Haltepotentials vorgenommen (Abb. 3.9). Die NMDA Applikation wurde in diesem Fall unter physiologischen Bedingungen durchgeführt (2mM Mg²⁺ in der Meßlösung). Die Ganzzell-Ströme zeigten einen nahezu linearen Anstieg bei positiveren Haltepotentialen als 0mV an. Bei negativen Haltepotentialwerten konnte der spannungsabhängige Magnesiumblock des NMDA-Rezeptorkanals beobachtet werden, der bei -80mV eine vollständige Blockierung auslöste. Die bei der eingestellten Membranspannung von +50mV auftretende Stromamplitude wurde bei -50mV nur noch zu ~10% erreicht (Abb. 3.9).



Abbildung 3.9: Schrittweise ausgelöste iontophoretische **NMDA** Applikation im Spannungsklemm-Ganzzell Modus. Mit 2mM Mg²⁺ in der Meßlösung konnte der spannungsabhängige Magnesiumblock des NMDA-Rezeptorstroms detektiert werden. durch А, iontophoretische Applikation von 20mM NMDA auf das Zellsoma ausgelöste NMDA-Rezeptorströme. Das Haltepotential wurde in 10mV Schritten von -70mV bis

verändert.

Β.

der

+50mV

Diagramm

Stromamplituden der NMDA-Rezeptorströme als Funktion des eingestellten Membranpotentials. Die Stromamplitude bei dem vorgegebenen Haltepotential von –50mV (30.4pA) erreicht nur 11.9% der Stromamplitude bei dem eingestellten Membranpotential von +50mV (255.7pA). Eine vollständige Blockierung des NMDA-Rezeptorstroms wurde erst bei einem Membranpotential von –80mV erzielt.

Die Analyse des Ca²⁺-Anteils am Glu-Rezeptor vermittelten Gesamtladungseinstrom nach iontophoretischer Applikation von 20mM NMDA führte zu Werten von $P_f = 10.4 \pm 8.5\%$ und P(Ca) = $8.4 \pm 2.5\%$ (Abb. 3.10; n = 3 Zellen). Die der Badapplikation von $50 - 200\mu$ M NMDA nachgestellte Analyse ergab $P_f = 7.3 \pm 2.2\%$ und P(Ca) = $7.6 \pm 4.7\%$ (Abb. 3.10; n = 4 Zellen).



Abbildung 3.10: NMDAvermittelte Ca²⁺-Rezeptorkanal Permeabilität. Der Glu-Rezeptor NMDA Agonist wurde iontophoretisch (n = 3 Zellen) oder mittels Badperfusion (n = 4 Zellen) auf das Soma von hypoglossalen Motoneuronen appliziert, und die ausgelösten Ströme und Ca^{2+} zytosolischen

Konzentrations-änderungen wurden simultan aufgezeichnet. A, im abgebildeten Experiment führte eine iontophoretische Applikation von 20mM NMDA zu einem Gesamtladungseinstrom von 453pQ (durch gestrichelte Linien eingegrenzt) und einer damit verbundenen Änderung der freien Ca²⁺zytoplasmatischen Konzentration [Ca_i] um 38nM. Dies führte in der Analyse zu Werten von $P_f = 9.4\%$ und P(Ca) =

10.9%. Das Haltepotential lag in diesem Experiment bei -80mV. B, eine Badapplikation von 200 μ M NMDA über 10s führte in dem abgebildeten Experiment zu einem Gesamtladungseinstrom von 2870pQ (eingegrenzt von gestrichelten Linien) und einer damit verbundenen Änderung von [Ca_i] um 161nM. Daraus ergaben sich die Werte von P_f = 4.9% und P(Ca) = 7.2%. Das Haltepotential wurde hier ebenfalls mit -80mV vorgegeben.

3.5 Synaptisches Modell der Glutamatrezeptor vermittelten Calciumtransienten

Ein wesentlicher Punkt der in dieser Arbeit angeführten Analysen ist die Bedeutung der Glu-Rezeptor vermittelten Ladungseinströme für die zelluläre Ca²⁺ Homöostase unter physiologischen Bedingungen. Lips et al. (1999) haben dokumentiert, daß ein einzelnes Aktionspotential in hypoglossalen Motoneuronen zu einer zytosolischen freien Ca²⁺-Konzentrationserhöhung von 6nM, in Verbindung mit einem reinen Calciumeinstrom von 2.1pC, führt. Die zuvor angeführten Analysen der Glu-Rezeptor vermittelten Ströme haben gezeigt, daß die AMPA/KA-Rezeptorkanäle in hypoglossalen Motoneuronen eine durchschnittliche Ca²⁺-Permeabilität von 1.2% aufweisen (Pf & P(Ca); vgl. 3.4.1). Ferner wurde gezeigt, daß die AMPA/KA vermittelten Miniatur-EPSCs durchschnittliche Amplituden von 19.4pA und Abfallzeitkonstanten von 3.7ms aufweisen. Die Anstiegszeit (10 – 90%) von 0.69ms basiert auf einer tatsächlichen Anstiegszeit der AMPA/KA Miniatur-EPSCs von 0.86ms (vgl. 3.2.1). Diese Daten ermöglichen eine Abschätzung des reinen Ca²⁺-Ladungseinstroms (Q_{Ca}) pro durchschnittlichem elementaren AMPA/KA vermittelten synaptischen Ereignis (Miniatur-EPSC):

$$Q_{Ca} = (A * \tau + ((A * rt) / 2)) * P,$$
(17)

wobei A die Stromamplitude bezeichnet, τ die Abfallzeitkonstante, rt die Anstiegszeit und P den prozentualen Wert der Calciumpermeabilität (vgl. Abb. 3.11).



Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Zusammensetzung eines EPSCs zur Ladungsmengenermittlung. Die Amplitude (A) mit der Abfallzeitkonstanten (τ) multipliziert gibt bereits einen Wert für einen Großteil der durch das EPSC transportierten Ladungsmenge, genauer wird diese Berechnung jedoch, wenn die mit der EPSC Anstiegszeit (rt) korrelierte Ladungsmenge in die Gesamtladungsmenge mit einbezogen wird. Dies führt zu einem Wert von $Q_{Ca} = 9.6 * 10^{-4}$ pC und zeigt an, daß etwa 2200 AMPA/KA Miniatur-EPSCs zugleich ausgelöst werden müßten, um einen somatischen Calciumeinstrom von 2.1pQ zu bewirken, der unter gleichen Bedingungen von einem Aktionspotential ausgelöst werden kann (Abb. 3.12), bzw. von etwa 1400 spontanen AMPA/KA EPSCs (mEPSC Amplituden 64% der sEPSC Amplituden; vgl. 3.2.1).

Unter physiologischen Bedingungen werden die NMDA-Rezeptorkanäle nahezu vollständig durch einen spannungsabhängigen Mg²⁺-Block bei dem bevorzugten Membranpotential von -70mV gehemmt (vgl. 3.4.2). Daher muß die Membran zunächst -hauptsächlich durch AMPA/KA EPSCs- an der postsynaptischen Endigung depolarisiert werden, bevor synaptische NMDA Ströme auftreten können. Ein typischer Wert für die Membrandepolarisation vor einer NMDA-Rezeptorkanal Aktivierung könnte bei -50mV liegen. Wie in Abb. 3.9 gezeigt wurde, erreichen die NMDA-Rezeptorkanal Ströme bei einem vorgegebenem Membranpotential von -50mV ~10% der Amplitude, die bei einem vorgegebenem Membranpotential von +50mV, wo kein Mg²⁺-Block auftritt, erreicht wird. Daher wurde für die durchschnittliche NMDA Miniatur-EPSC Amplitude unter physiologischen Bedingungen, bei einer angenommenen vorhergehenden Membrandepolarisation auf -50mV, ein Wert von 1.9pA angenommen (HP +50mv -> Miniatur-EPSC Amplitude = 19pA; vgl. 3.2.1). Die weiterführende Analyse der NMDA mEPSCs mit einer ermittelten Calciumpermeabilität von 9.4% (Mittelwert aus Pf & P(Ca); iontoph. Appl.; vgl. 3.4.2), einer mittleren Amplitude von 1.9pA (s. o.), einer Abfallzeitkonstanten von 40.1ms sowie einer Anstiegszeit von 8ms im Mittel (mEPSC Anstiegszeit (10 –90%): 6.4ms, HP –70mV; vgl. 3.2.2) führt zu einem reinen Calciumeinstrom (Q_{Ca}) von 7.8 * 10⁻³pQ (vgl. Formel 3.17). Dies zeigt, daß etwa 270 NMDA Miniatur-EPSCs zugleich ausgelöst werden müßten, um eine somatische Ca²⁺-Konzentrationserhöhung um 6nM zu bewirken, die unter gleichen Bedingungen von einem Aktionspotential ausgelöst werden kann (Abb. 3.12), bzw. von etwa 120 NMDA sEPSCs (mEPSC Amplituden erreichen 45% der sEPSC Amplituden, HP –70mV; vgl. 3.2.2).



Abbildung 3.12: Synaptisches Modell eines hypoglossalen Motoneurons mit Glu-Rezeptor abhängiger Aktivität im Vergleich zu AP-abhängigen Calciumsignalen. In hypoglossalen Motoneuronen wurden durchschnittliche Amplituden der AMPA/KA sEPSCs mit einem erhöhten Faktor von 1.5 gegenüber den mEPSCs gemessen (vgl. 3.2.1). Dies verdeutlicht, daß während einer Einzelfaseraktivierung im Mittel 1 - 2 synaptische Endungen aktiviert werden. Bei den AMPA/KA Strömen konnte ferner ein Calciumanteil der insgesamt einströmenden Ladungsmenge von 1.2% nachgewiesen werden. Daraus läßt sich folgern, daß ein AMPA/KA mEPSC zu einem reinen Calciumeinstrom von etwa 9.6*10⁻⁴pC führen würde (vgl. 3.5). Ein einzelnes Aktionspotential löst im Vergleich dazu einen reinen Calciumeinstrom von 2.1pC aus (Lips et al. 1999). Daher würden nahezu 2200 AMPA/KA mEPSCs zugleich benötigt werden, um den gleichen Effekt zu erzielen. Die NMDA sEPSCs wiesen Amplituden auf, die um den Faktor 2.2 gegenüber den mEPSCs erhöht waren, daher wurden während einer Einzelfaseraktivierung im Mittel 2 - 3 synaptische Endungen aktiviert. Die NMDA-Rezeptorströme wiesen zudem einen Calciumanteil von 9.4% auf; ein mEPSC führt daher im Mittel zu einem reinen Calciumeinstrom (Q_{Ca}) von 7.8*10⁻³pC (vgl. 3.2.2). Daher würde die gleichzeitige Auslösung von etwa 220 NMDA mEPSCs benötigt, um den gleichen Calciumeinstrom zu erzielen wie ein Aktionspotential.

3.6 Ca²⁺-Homöostase in unterschiedlichen Neuronenpopulationen

Nachdem die Bedeutung der Glu-Rezeptor vermittelten Signale für die zelluläre Ca²⁺-Homöostase in den selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen im Vergleich zur AP-vermittelten elektrischen Aktivität gering erschien, wurden Untersuchungen vorgenommen, die unterschiedliche Parameter der zellulären Ca²⁺-Homöostase in selektiv vulnerablen und resistenten Neuronenpopulationen aufklären sollten. Dies sollte zu einer Klärung beitragen, inwieweit auch geringe Störungen der zellulären Ca²⁺-Homöostase zu einer selektiven Schädigung führen könnten.

Zu diesen Untersuchungen wurden selektiv resistente Motoneurone aus dem Nucleus oculomotorius (Ince et al. 1993; Reiner et al. 1995) und selektiv vulnerable Pyramidalneurone aus dem primären Motorcortex, sog. Betz Zellen (De Paul et al. 1988; Hammer et al. 1979; Nihei et al. 1993), herangezogen. Zudem sollte an hypoglossalen Motoneuronen transgener Mäuse, die ein Maus-Tiermodell der ALS-Erkrankung darstellen (Gurney et al. 1994), überprüft werden, ob es in Verbindung mit der ALS-Erkrankung bereits im postnatalem Alter zu einer Änderung von Parametern der zellulären Ca²⁺-Homöostase kommt.

3.6.1 Ca²⁺-Homöostase in oculomotor Neuronen

In Abb. 3.13A sind Ca^{2+} -Messungen in einem oculomotor Neuron dargestellt. Hierzu wurden HVA Ca^{2+} -Einströme durch depolarisierende Spannungspulse (+10mV, 500ms) ausgelöst und die Änderungen im Fluoreszenzsignal bei 360nm und 390nm in Abhängigkeit von der Beladung der Zelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 simultan Die Änderungen im Ca²⁺-unabhängigen 360er Fluoreszenzsignal geben den erfaßt. Beladungszustand des Neurons wieder, während die zunehmende Auslenkung im Ca2+abhängigen 390er Fluoreszenzsignal die zunehmende Anbindung von Ca²⁺ an Fura-2 wiederspiegelt (vgl. 2.7). Der vollständige Austausch der Pipetten- und somatischen Lösung erfolgte mit einer Zeitkonstante von 2.8 ± 0.8 min (SEM; n=5 Zellen; Abb. 3.13B). Mit diesen Meßdaten ließ sich nach Formel 3 (vgl. 2.7) die absolute, freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration [Ca_i] ermitteln. Eine wichtige Annahme bei der quantitativen Analyse nach der "added buffer" Methode (Neher & Augustine, 1992; vgl. 2.8.1) ist, daß der absolute Ca²⁺-Einstrom im Verlauf eines Experiments konstant bleibt. Um dies zu überprüfen, wurde das Produkt aus den Amplituden und Abfallzeitkonstanten der Diese "Ca²⁺-Integrale" vergrößerten sich Calciumtransienten gebildet (Abb. 3.13C). während eines Experiments nur geringfügig, daher war die Annahme, daß der Ca2+-Einstrom konstant bleibt, generell gerechtfertigt. Eine leichte Zunahme des Ca²⁺-Einstroms während lang anhaltender Messungen steht vermutlich mit der Beladung der Zellen mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2 im Zusammenhang, da dieser durch seine Ca^{2+} -Pufferungseigenschaften die Ca²⁺-abhängige Inaktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen herabsetzen kann (Palacek et al. 1999). In Abb. 3.13D ist dieser Effekt auch in Abhängigkeit zur exogenen Pufferkapazität von Fura-2 ($\kappa_{B'}$, vgl. 2.8.1) dargestellt.



Abbildung 3.13: Stimulationsbedingte Fluoreszenzsignal Änderungen während allmählicher Erhöhung der zytosolischen Fura-2 Konzentration. A, Ca^{2+} -abhängige (F₃₉₀) und unabhängige (F₃₆₀) Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Zeitabständen nach der Etablierung der Ganzzell Patch-clamp Konfiguration. Während der unterschiedlichen Beladungsphasen wurden depolarisierende Spannungssprünge (+10mV) für 500ms Dauer ausgelöst (siehe Pfeil). Die Zunahme der Auslenkung des 390er Fluoreszenzsignals spiegelt die zunehmende Bindung des Calciums an Fura-2 wieder (500µM in der Pipettenlösung). Die Erholung von F₃₉₀ verlängert sich mit zunehmender Beladung des Neurons mit Fura-2, weil die Wechselwirkung zwischen Fura-2 und Ca²⁺ zunimmt und Extrusionsmechanismen daher verlangsamt ablaufen. B, Ca²⁺ unabhängiges F₃₆₀ Signal in bead units (BU) als Funktion unterschiedlicher Zeitintervalle nach Erreichen der Ganzzell Patch-clamp Konfiguration. Die Zunahme von F₃₆₀ repräsentiert die Zunahme der zytosolischen Fura-2 Konzentration. Zur Ermittlung einer Zeitkonstante für den Beladungsprozeß wurde ein einzelexponentieller "least square fit" angelegt ($\tau = 2.54$ min). C, integrierte Ca²⁺ Antworten als Funktion der Meßdauer. Die Calciumintegrale nahmen während der Beladungsphase mit Fura-2 leicht zu. Die Datenpunkte wurden mit einem "line-fit" verbunden. Den schwarzen Kreisen entsprechen Calciumintegrale, die aus den in Abb. 3.13A gezeigten Ca²⁺-Signalen hervorgingen. D, Calciumintegrale als Funktion der exogenen Pufferkapazität des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 ($\kappa_{B^{\circ}}$). $\kappa_{B^{\circ}}$ hängt stark von der zunehmenden zytosolischen Fura-2 Konzentration ab (vgl. Formel 5).

Wie zuvor beschrieben wurde waren die Ca²⁺-abhängigen Auslenkungen in F_{390} (dF₃₉₀) proportional zu der relativen Menge der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration, die von Fura-2 gepuffert wurde. Entsprechend erhöhte sich dF₃₉₀ mit zunehmender Fura-2 Konzentration, und der maximale Wert für dF₃₉₀ zeigt an, daß der Calciumindikator sich weitgehend gegen zelleigene endogene Puffer durchgesetzt hat (vgl. 2.8.1). Dieser Prozeß läßt sich mit der Formel

$$dF_{390} = dF_{max} * \kappa_{B'} / (1 + \kappa_{B'} + \kappa_{S})$$
(8)

beschreiben, wobei dF_{max} den Sättigungswert von dF₃₉₀ darstellt, der bei hohen Fura-2 Konzentrationen nahezu, aber nicht vollständig erreicht wird, da die endogenen Puffer nicht gänzlich vom exogenem Puffer verdrängt werden können. κ_s und $\kappa_{B'}$ repräsentieren die zelleigene endogene Pufferkapazität und die exogene Pufferkapazität des Fluoreszenzfarbstoffs.

In Abbildung 3.14 wurde eine exemplarische Auftragung von dF₃₉₀ Werten als Funktion von $\kappa_{B^{\circ}}$ vorgenommen. An diese Datenpunkte wurde anschließend ein Fit nach Formel 8 angelegt. Dies führte zu einem Wert von dF_{max} = 3.34 ± 0.11BU (bei dF_{max}/2 gilt $\kappa_s = \kappa_{B^{\circ}}$) und zu einem Wert für die endogenen Pufferkapazität von $\kappa_s = 277 \pm 24$ (n = 14) in oculomotor Neuronen.



Analyse (vgl. Text) ergab $\kappa_s = 277.0 \pm 24$ und $dF_{max} = 3.34 \pm 0.11BU$. Bei $dF_{max} / 2$ gilt: $\kappa_s = \kappa_B \cdot$ (mit Linien eingezeichnet).

Die Ca²⁺-Einströme waren von der Höhe der Membrandepolarisation abhängig. Wie in Abb. 3.15 gezeigt wird, waren Menbrandepolarisationen auf positivere Werte als -40mV nötig, um einen stabilen HVA-Calciumeinstrom auszulösen. Die Amplituden der Calciumtransienten erreichten bei –20mV einen halbmaximalen Wert und gingen ab 0mV in Sättigung.



Abbildung 3.15: Depolarisationsbedingte Ca²⁺-Antworten in oculomotor Neuronen. Somatische Ca²⁺-Antworten während definierter Spannungssprünge von –70mV auf +40mV (mit 10mV Intervall) für jeweils 1s Dauer. Um überwiegend HVA Ca²⁺-Kanäle zu aktivieren, wurde das Membranpotential vor jedem Spannungssprung auf –70mV gehalten (Hille, 1992; Snutch & Reiner, 1992). Spannungssprünge positiv von –40mV führten zu stabilen Ca²⁺-Antworten. Halbmaximale Ca²⁺-Antworten wurden bei –20mV ausgelöst. Membrandepolarisationen ab 0mV führten zu einer Sättigung der Ca²⁺-Antwort. Bei Membrandepolarisationen über +30mV nahm die Ca²⁺-Antwort wieder ab. Die Erholung von erhöhten zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen auf Basalwerte ließ sich durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben.

Für eine systematische Analyse der Ca²⁺-Transienten und -Homöostase wurden die Stimulationen (stets +10mV, 500ms Dauer) mit zeitlichen Abständen von 30 – 80s durchgeführt. Dies gewährleistete eine vollständige Erholung der Ca²⁺-Transienten und ein damit verbundenes Absenken von [Ca]_i zwischen den Stimulationen. Unter diesen Bedingungen wurde eine Ca²⁺-Ruhekonzentration ([Ca_{rest}]) von 77 ± 24nM (n = 12 Zellen) in den oculomotor Neuronen ermittelt. Reproduzierbare Messungen der Ca²⁺-Signale waren unter Standardbedingungen für eine Dauer von bis zu 1h möglich.

Für die weitere Analyse von Parametern der zellulären Ca²⁺-Homöostase wurden die Amplituden und Abfallzeitkonstanten der Ca²⁺-Transienten in Abhängigkeit von der Fura-2 Beladung der Neurone und der daraus resultierenden exogenen Pufferkapazität des Ca²⁺-Indikators (κ_{B} ·) herangezogen. In Abb. 3.16A erkennt man den Einfluß der steigenden exogenen Pufferkapazität auf die Amplituden und Abfallzeiten der Calciumtransienten. Bei wenig zugeführtem Puffer und damit verbundener niedriger exogener Pufferkapazität (κ_{B} ·) treten bei gleichem Ca²⁺-Einstrom große Änderungen in der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration auf, während diese bei hohen κ_{B} · klein bleiben, da das einströmende Ca²⁺-Transienten bei hochgepufferten Neuronen, da die Wechselwirkung zwischen Fura-2 und Ca²⁺ hier die zelleigenen Extrusionsmechanismen verlangsamt. Dieser Zusammenhang läßt sich mit einer linearen Funktion beschreiben (vgl. 2.8.1):

$$\tau = (1 + \kappa_{B'} + \kappa_S) / \gamma, \qquad (6)$$

wobei τ die Abfallzeitkonstante der Calciumtransienten repräsentiert. $\kappa_{B^{\circ}}$ und κ_{S} bilden die exogene und endogene Pufferkapazität, γ gibt die zelleigene Extrusionsrate wieder. In Abb. 3.16B sind die Abfallzeitkonstanten der depolarisations-bedingten Ca²⁺-Transienten als Funktion von $\kappa_{B^{\circ}}$ aufgetragen. Analog zu Gleichung 6 (vgl. 2.8.1) ergibt sich durch das Anlegen einer Regressionsgerade ein einfacher linearer Zusammenhang. Der Punkt, an dem die Regressionsgerade einen Schnittpunkt mit der X-Achse bildet, gibt κ_{S} + 1 an. Dies führte zu einem Wert von 264 ± 25 (n = 11 Zellen) für die endogene Pufferkapazität (κ_{S}) der oculomotor Neurone. Das bedeutet, daß unter physiologischen Bedingungen in den oculomotor Neuronen neben 264 an zelleigene Puffer gebundene Ca²⁺-Ionen nur ein freies zytoplasmatisches Ca²⁺-Ion vorliegt. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse liefert einen Wert für die Abfallzeitkonstante der Ca²⁺-Transienten unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B'} = 0$), $\tau = 1.7 \pm 0.1s$ (n = 11 Zellen). Zudem ließ sich aus der Steigung der Regressionsgerade die Extrusionsrate $\gamma = 156 \pm 20$ (n = 11 Zellen) ermitteln.



А

Pufferkapazität von Fura-2 ($\kappa_{B^{\cdot}}$). A, Ca²⁺-Transienten, die durch Spannungssprünge auf +10mV für 500ms ausgelöst wurden. Die Abfallphase der Calciumtransienten wurde zur Ermittlung einer Abfallzeitkonstanten mit einer monoexponentiellen Funktion gefittet. Die linke Spur zeigt die Ca²⁺-Antwort direkt nach Erreichen der Ganzzell-Konfiguration und einer damit verbundenen niedrigen $\kappa_{B^{\cdot}}$. Dies bedingt eine schnelle Abfallzeitkonstante des Ca²⁺-Transienten. Die rechte Spur zeigt eine Ca²⁺-Antwort nach vollständiger Beladung des Neurons mit Fura-2. Dies führt zu einer hohen $\kappa_{B^{\cdot}}$ und einer langsamen Abfallzeitkonstante des Ca²⁺-Transienten (1mM Fura-2 in der Pipettenlösung). B, Abfallzeitkonstanten der Ca²⁺-Transienten als Funktion von $\kappa_{B^{\cdot}}$ von Fura-2 und mag-Fura5. Ein linearer Regressionsfit wurde an die Meßpunkte angelegt; der X - Achsenschnittpunkt führt zu $\kappa_{S} = 263.8 \pm 25.1$ (n = 11 Zellen).

Ein ähnlicher Zusammenhang ergibt sich auch für die Amplituden der Calciumtransienten in Abhängigkeit von $\kappa_{B^{\cdot}}$. Wie in Abb. 3.17 dargestellt wird, konnte aus den Amplituden der Ca²⁺-Transienten nach Gleichung 7 (vgl. 2.8.1) eine unabhängige Analyse von κ_S vorgenommen werden. Diese Analyse führte zu einem Wert von $\kappa_S = 258 \pm 29$ (n = 18) in den oculomotor Neuronen. Zudem konnte die Amplitude der Ca²⁺-Transienten unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B^{\cdot}} = 0$) mit A₀ = 1.08 ± 0.11µM für den definierten depolarisations-bedingten Ca²⁺-Einstrom (+10mV, 500ms) bestimmt werden. Durch Umformung von Gleichung 7 erhält man aus der Analyse der Amplitude der Calciumtransienten als Funktion von $\kappa_{B^{\cdot}}$ auch eine quantitative Abschätzung des somatischen Ca²⁺-Einstroms pro Volumenelement (qCa²⁺):

$$qCa^{2+} = 2 * (1 + \kappa_{B'} + \kappa_{S}) * A * F,$$
(7)

wobei A die Amplitude der Ca²⁺-Transienten darstellt und F die Faraday Konstante. Dies führte zu einer Einschätzung des somatischen Ca²⁺-Einstroms auf 54.9 \pm 7.7pC/pl nach einer 500ms andauernden Membrandepolarisation auf +10mV in den oculomotor Neuronen.



Abbildung 3.17: Amplituden der Calciumtransienten als Determinante der endogenen Ca²⁺-Pufferkapazität (κ_s). Die inverse Amplitude der Ca²⁺-Transienten wurde als Funktion der exogenen Pufferkapazität des Ca²⁺-Indikators Fura-2 ($\kappa_{B'}$) aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade angelegt. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse gibt den Wert $\kappa_s + 1$ an, dies führte zu einer endogenen Pufferkapazität von 258.3 \pm 28.7 (n = 18). Der Schnittpunkt mit der Y-Achse gibt den Wert für die Amplitude der Calciumtransienten unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B'} = 0$) wieder, dies führte zu einem Wert A₀ = 1.08 \pm 0.11µM.

3.6.1.1 Quantitatives Modell der Ca²⁺-Homöostase in oculomotor Neuronen

Mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Analysemethoden ließ sich eine Abschätzung verschiedener Parameter der zellulären Ca²⁺-Homöostase unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B^{+}} = 0$) vornehmen. Aus Abb. 3.16 geht der Wert für die Abfallzeitkonstante der spannungsabhängig aktivierten Calciumtransienten bei $\kappa_{B^{+}} = 0$ mit 1.7 ± 0.1s hervor. Die Amplitude der Ca²⁺-Transienten für $\kappa_{B^{+}} = 0$ wurde in Abb. 3.17 mit A₀ = 1.1 ± 0.1µM ermittelt. Um diese Parameter der zellulären Ca²⁺-Homöostase im Hinblick auf einen möglichen Schutz gegen Ca²⁺ vermittelte Degeneration und neurodegenerative Erkrankungen (Elliot & Snider, 1995; Ince et al. 1993; Reiner et al. 1995; Morrison & Morrison, 1998) transparent zu machen, wurde ein quantitatives Modell der Ca²⁺-Homöostase entworfen.

In Abb. 3.18A ist die kalkulierte Amplitude und Abfallzeit eines somatischen Ca^{2+} -Transienten in oculomotor Neuronen dargestellt, der nach einer definierten Membrandepolarisation auf +10mV für die Dauer von 500ms auftritt (entspricht einem Ca^{2+} -Einstrom von 54.9pC/pL). Zum Vergleich ist in Abb. 3.18B die Amplitude und Abfallzeit eines Calciumtransienten in spinalen Motoneuronen dargestellt, der von einem gleich großen Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst wurde. Die Daten hierzu (Palacek et al., 1999) stammen aus einem vergleichbaren Modell der zellulären Ca^{2+} -Homöostase. Die Ca^{2+} -Transienten in den spinalen Motoneuronen weisen um den Faktor 5.3 vergrößerte Amplituden auf, aber auch wesentlich schneller abfallende Ca^{2+} -Transienten. Dies ist auf die deutlich niedrigere endogene Pufferkapazität bei einer vergleichbaren Extrusionsrate in den spinalen Motoneuronen zurückzuführen.

Ein verallgemeinerndes Modell der Ca²⁺-Antworten als Funktion der endogenen Pufferkapazität ist in Abb. 3.19A abgebildet. Hier wurde die Extrusionsrate mit $145s^{-1}$ vorgegeben, welches den ermittelten Werten für γ sowohl in oculomotor Neuronen als auch in spinalen Motoneuronen annähernd entsprach. Hier wird deutlich, daß sich eine verringerte endogene Pufferkapazität in einer exponentiell zunehmenden Amplitude der Ca²⁺-Transienten äußert. In den niedrig gepufferten Neuronen führt dies zu einer Erhöhung der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration ([Ca]_i) um einige mikromolar, während sich [Ca]_i bei einer hohen endogenen Pufferkapazität kaum verändert.



Abbildung 3.18: Quantitatives Modell der Ca²⁺-Homöostase in oculomotor Neuronen und spinalen Motoneuronen. A, Simulation eines somatischen Ca²⁺-Transienten in oculomotor Neuronen, nach einer 500ms andauernden Membrandepolarisation auf +10mV und einem damit verbundenem Ca²⁺-Einstrom von 54.9pC/pl. B, Entsprechende Simulation eines Ca²⁺-Transienten in spinalen Motoneuronen bei einem angenommenen vergleichbaren Ca²⁺-Einstrom von 54.9pC/pl. Die Daten von κ_s , γ und τ in spinalen Motoneuronen wurden von Palacek et al. 1999 entnommen.



Abbildung 3.19: Einfluß der endogenen Pufferkapazität (κ_s) auf die Ca²⁺-Homöostase in Motoneuronen. A, Modell der Ca²⁺-Amplituden und Abfallzeitkonstanten (τ) der Ca²⁺-Transienten auf Grundlage der Oculomotor und spinalen Motoneurone als Funktion der endogenen Pufferkapazität (Extrusionsrate 145s⁻¹, Ca²⁺-Einstrom 54.8pC/pl). Bemerkenswert ist der exponentielle Amplitudenabfall der Calciumtransienten mit steigender endogener Pufferkapazität; die Abfallzeitkonstante der Ca²⁺-Transienten verlängert sich bei steigender κ_s dagegen linear. B, kalkulierter Durchmesser (L) der lokalen ungepufferten Ca²⁺-Domänen an offenen Ca²⁺-Kanälen als Funktion der endogenen Pufferkapazität (κ_s). Bei spinalen Motoneuronen (SMN) führte diese Analyse zu L =59.4nm (κ_s = 50; Palacek et al. 1999), bei oculomotor Neuronen (OMN) zu L = 25.8nm (κ_s = 264); vgl. Gleichung 10.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Ca²⁺-Homöostase in Motoneuronen liefert die Größe eines einen Ca²⁺-Kanal umgebenden Bereiches, in dem eine erhöhte Ca²⁺-Konzentration vorkommen kann, ohne daß zelleigene Puffer hier wirksam werden. Eine quantitative Abschätzung dieser "Schale" eines ungepufferten Bereiches in der unmittelbaren Umgebung eines Ca²⁺-Kanals wurde in dieser Arbeit vorgenommen (Neher, 1998; vgl. 2.8.1, Formel 10). In Abb. 3.19B ist der Durchmesser dieser "Schale" bzw. dieser Mikrodomäne in Abhängigkeit zu der endogenen Pufferkapazität (κ_s) dargestellt. Dabei wird vorausgesetzt, daß die endogenen Puffer durch große Proteine mit kon-Raten von $5*10^8 \mu$ M/s gestellt werden und eine niedrige Ca²⁺-Affinität aufweisen, entsprechend $K_d = 10\mu M \gg [Ca]_i$ (vgl. 2.8.1). Wie in der Abbildung ersichtlich wird, führt die hohe endogene Pufferkapazität ($\kappa_s = 264$) in den oculomotor Neuronen zu kleinen ungepufferten Ca²⁺-Domänen mit einem Durchmesser (L) von 26nm, während die niedrige endogene Pufferkapazität ($\kappa_s = 50$) in spinalen Motoneuronen einen großen Durchmesser der ungepufferten Ca²⁺-Domänen von 60nm bedingt (siehe auch Tabelle 1). Dies bietet ein Beispiel für die generelle Annahme, daß hohe Pufferkonzentrationen gegenüber lokal erhöhten Ca²⁺-Konzentrationen ausgleichend wirken und diese verringern (Roberts, 1994; Klingauf & Neher, 1997). Eine Voraussetzung hierfür ist, daß die lokal einströmende Ca²⁺-Menge so klein ist, daß eine Absättigung der endogenen Puffer ausbleibt. Bei einer großen einströmenden Ca²⁺-Menge können lokale Pufferkonzentrationen zeitlich begrenzt weitestgehend gesättigt werden, so daß der Anteil der einströmenden Ca²⁺-Ionen, die zu einer Erhöhung der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration ([Ca]_i) beitragen, stark zunehmen kann (Roberts, 1994; Klingauf & Neher, 1997). Dieser Effekt kann jedoch wesentlich eher in niedriggepufferten Neuronen auftreten, was die Größe der ungepufferten Ca²⁺-Domänen in den niedriggepufferten, spinalen und hypoglossalen Motoneuronen gegenüber den hochgepufferten oculomotor Neuronen noch erhöhen würde.

Zelltyp	OMN sel. resistent	SM N* sel. vulnerabel	HMN* sel. vulnerabel
κ _S	264	50	41
γ	156s ⁻¹	140s ⁻¹	60s ⁻¹
L	26nm	60nm	66nm
τ	1.7s	0.4s	0.7s
А	1.08µM	5.72µM	6.9¢µМ

Tabelle 1: Ein quantitativer Vergleich von wichtigen Parametern der zellulären Ca²⁺-Homöostase in selektiv resistenten und verwundbaren Motoneuronen-Populationen. Die Parameter stehen für die endogene Pufferkapazität (κ_S), die Extrusionsrate (γ), den Durchmesser von lokalen, ungepufferten Ca²⁺-Domänen um einzelne Ca²⁺-Ionenkanäle (L), sowie für die Abfallzeitkonstante (τ) und die Amplitude (A) der Ca²⁺-Transienten unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B^*} = 0$); der Ca²⁺-Einstrom wurde bei allen Motoneuronentypen mit 54.9pC/pl angenommen. Die selektiv vulnerablen Motoneuronenpopulationen weisen gegenüber den selektiv resistenten oculomotor Neuronen (OMN) deutlich geringere endogene Pufferkapazitäten auf. Hieraus ergeben sich die großen Amplituden der Calciumtransienten, die Abfallzeitkonstanten sind dagegen deutlich schneller. * Die Daten von den spinalen Motoneuronen (SMN) wurden von Palacek et al. 1998 entnommen, die Daten der hypoglossalen Motoneurone (HMN) von Lips & Keller, 1999.

3.6.2 Ca²⁺-Homöostase in Betz Zellen

Die Analyse wichtiger Parameter der zellulären Ca²⁺-Homöostase in selektiv vulnerablen Betz Zellen gemäß Gleichung 6 (vgl. 2.8.1 bzw. 3.6.1) ist in Abb. 3.20 dargestellt. Wie zuvor wurde ein HVA Ca²⁺-Einstrom (Hille, 1992, Snutch & Reiner, 1992) durch einen 500ms andauernden depolarisierenden Spannungspuls auf +10mV ausgelöst. Auch in diesem selektiv vulnerablen Neuronentyp wurde eine niedrige endogene Pufferkapazität (κ_S) von 41.7 ± 29.0 (n = 9 Zellen) detektiert. Dies zeigt, daß eine Störung der zellulären Ca²⁺-Homöostase und ein damit verbundener vermehrter Einstrom von Ca²⁺-Ionen sich auch hier mit einer vergleichsweise großen Erhöhung der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration [Ca]_i auswirken würde, die letztendlich zu neurodegenerative Prozessen führen könnte (DePaul et al. 1988; Krieger, 1996). Die Abfallzeitkonstante der Ca²⁺-Transienten (τ) unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B'} = 0$) wurde auf 0.47 ± 0.32s (n = 9 Zellen) ermittelt. Hieraus ergibt sich der Wert für die Extrusionsrate γ (($\gamma = (1 + \kappa_S) / \tau$) bei $\kappa_{B'} = 0$; vgl. Gleichung 6) von 93 ± 89s⁻¹ (n = 9 Zellen). Die Extrusionsrate erreicht damit einen geringeren Wert als in den selektiv resistenten oculomotor Neuronen und den selektiv vulnerablen spinalen Motoneuronen, jedoch einen größeren Wert als in den selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen (vgl. Tabelle 1).



Abbildung 3.20: Abfallzeitkonstanten der durch einen depolarisierenden Spannungspuls (+10mV, 500ms) ausgelösten Ca²⁺-Transienten als Funktion der exogenen Pufferkapazität von Fura-2 in Betz Neuronen. Ein linearer Regressionsfit wurde an die Meßpunkte angelegt; der X-Achsenschnittpunkt führt zu $\kappa_s = 41.7 \pm 29.0$ (n = 9 Zellen), der Y-Achsenschnittpunkt zeigt die Abfallzeit der Ca²⁺-Transienten unter physiologischen Bedingungen an ($\tau = 0.47 \pm 0.32s$; n = 9 Zellen), aus der Steigung der Geraden folgt $\gamma = 93 \pm 89s^{-1}$ (n = 9 Zellen).

3.6.3 Ca²⁺-Homöostase in hypoglossalen Motoneuronen von transgenen Mäusen mit einer Mutation in der Superoxid Dismutase

Die Untersuchung der Ca²⁺-Homöostase in hypoglossalen Motoneuronen von transgenen Mäusen vom Typ TgN(SOD1G93A)Gur-dl sollte zu einer Klärung beitragen, ob im postnatalem Alter (P2 – P3 verwendet) bereits eine Änderung in der zellulären Ca²⁺-Homöostase gegenüber dem Wildtyp festzustellen ist, die gegebenenfalls als krankheitsauslösende Ursache bei der ALS-Erkrankung in Betracht kommt. Hierzu wurden erneut depolarisierende Spannungssprünge auf +10mV über 500ms dazu genutzt, einen HVA Ca²⁺-Einstrom (Hille, 1992, Snutch & Reiner, 1992) auszulösen. In Abb. 3.21A sind Ca²⁺-Messungen in einem transgenen hypoglossalen Motoneuron dargestellt. Auch hier geben die Änderungen im Ca²⁺-unabhängigen 360er Fluoreszenzsignal den Beladungszustand des Neurons wieder, während die zunehmende Auslenkung des Ca²⁺abhängigen 390er Fluoreszenzsignal die zunehmende Anbindung von Ca²⁺ an Fura-2 wiederspiegelt (vgl. 2.7). Der Austausch der Pipetten- und somatischen Lösung erfolgte in dem angegebenem Beispiel mit einer Zeitkonstante von 3min 24s (Abb. 3.21B).



Abbildung 3.21: Stimulationsbedingte Änderungen des Fluoreszenzsignals während allmählicher Erhöhung der zytosolischen Fura-2 Konzentration in transgenen hypoglossalen Motoneuronen. A, Ca²⁺-abhängige (F_{390}) und unabhängige (F_{360}) Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Zeitabständen nach der Etablierung der Ganzzell Patch-clamp Konfiguration. Bei unterschiedlichen Beladungsphasen wurden depolarisierende Spannungssprünge (+10mV) für 500ms Dauer ausgelöst (siehe Pfeil). Die Zunahme der Auslenkung des 390er Fluoreszenzsignals spiegelt die zunehmende Bindung des Ca²⁺ an Fura-2 wieder (250µM in der Pipettenlösung). B, Ca²⁺ unabhängiges F_{360} Signal in bead units (BU) als Funktion unterschiedlicher Zeitintervalle nach erreichen der Ganzzell Patch clamp Konfiguration. Die Zunahme von F_{360} repräsentiert die Zunahme der somatischen Fura-2 Konzentration. Zur Ermittlung einer Zeitkonstante für den Beladungsprozeß wurde ein einzelexponentieller "least square fit" angelegt ($\tau = 3min 24s$).

Zur Analyse der Ca²⁺ -Transienten und -Homöostase wurden die Spannungspulse mit zeitlichen Abständen von 30 – 60s ausgelöst. Dies gewährleistete eine vollständige Erholung der Ca²⁺-Transienten, und ein damit verbundenes Absenken von [Ca]_i zwischen den Stimulationen. Unter diesen Bedingungen wurde eine Ca²⁺-Ruhekonzentration von 79 \pm 17nM (n = 7 Zellen) in den transgenen hypoglossalen Motoneuronen ermittelt. Reproduzierbare Messungen der Ca²⁺-Signale waren unter Standardbedingungen auch hier für eine Dauer von bis zu 1h möglich. Die Analyse der endogenen Pufferkapazität analog Gleichung 6 (vgl. 2.8.1 bzw. 3.6.1) ist in Abb. 3.22 dargestellt. Bei dieser Analyse wurde eine endogene Pufferkapazität (κ_S) von 33.5 \pm 21.8 (n = 7 Zellen) ermittelt, zudem eine Abfallzeitkonstante (τ) der Ca²⁺-Transienten von 0.4 \pm 0.2s (n = 7 Zellen) unter physiologischen Bedingungen und eine Extrusionsrate (γ) von 90 \pm 74s⁻¹ (n = 7 Zellen).



Abbildung 3.22: A, Ca^{2+} -Transienten nach kurzfristiger Beladung eines (TgN(SOD1 transgenen G93A)Gur-dl) hypoglossalen Motoneurons mit Fura-2 (linke Spur) und nach vollständiger Beladung des Neurons (rechte Spur, Fura-2 500µM in der Pipettenlösung). Β, Abfallzeitkonstanten der durch einen depolarisierenden Spannungspuls (+10mV, 500ms) ausgelösten Ca²⁺-Transienten als Funktion der exogenen Pufferkapazität von Fura-2 in transgenen hypoglossalen Motoneuronen. Ein linearer Regressionsfit wurde an die

Meßpunkte angelegt, der X-Achsenschnittpunkt führt zu $\kappa_s = 33.5 \pm 21.8$ (n = 7 Zellen), der Y-Achsenschnittpunkt zeigt die Abfallzeit der Ca²⁺-Transienten unter physiologischen Bedingungen an ($\tau = 0.4 \pm 0.2s$; n = 7 Zellen), die Steigung der Geraden belegt $\gamma = 90 \pm 74s^{-1}$ (n = 7 Zellen).

Ein Vergleich von einigen Parametern der zellulären Ca²⁺-Homöostase in transgenen- und Wildtyp (wt) Motoneuronen aus dem Nucleus hypoglossus ist in Tabelle 2 wiedergegeben (wt-Daten entnommen aus Lips & Keller, 1998). Hier erkennt man, daß die endogene Pufferkapazität (κ_s) in den transgenen Motoneuronen gegenüber der im wt dokumentierten um 21% verringert ist. Der Unterschied von κ_s zwischen den wt und transgenen Motoneuronen erscheint aber gering, wenn man die relativ hohe Variabilität der einzelnen Messungen berücksichtigt.

Die Extrusionsrate γ ist in den transgenen Motoneuronen mit 90s⁻¹ um ein Drittel höher analysiert worden als sie in den wt Motoneuronen angegeben wurde. Entsprechend fallen die Ca²⁺-Transienten in den transgenen Mäusen auch deutlich schneller ab ($\tau = 0.4$ s gegenüber $\tau = 0.7$ s im Wildtyp).

TgN(SOD1G93A)Gur-dl	wt (NMRI)*	
34 ± 22	41 ± 12	
$90 \pm 74 \text{ s}^{-1}$	$60 \pm 30 \text{ s}^{-1}$	
0.4 ± 0.2 s	$0.7 \pm 0.2 \text{ s}$	
	TgN(SOD1G93A)Gur-dl 34 ± 22 $90 \pm 74 \text{ s}^{-1}$ $0.4 \pm 0.2 \text{ s}$	TgN(SOD1G93A)Gur-dl wt (NMRI)* 34 ± 22 41 ± 12 $90 \pm 74 \text{ s}^{-1}$ $60 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ $0.4 \pm 0.2 \text{ s}$ $0.7 \pm 0.2 \text{ s}$

*Lips & Keller, 1998

Tabelle 2: Ein quantitativer Vergleich einiger Parameter der zellulären Ca^{2+} -Homöostase in Wildtyp (wt) und transgenen hypoglossalen Motoneuronen. Die Parameter stehen für die endogene Pufferkapazität (κ_s), die Extrusionsrate (γ) sowie für die Abfallzeitkonstante (τ) der Ca^{2+} -Transienten unter physiologischen Bedingungen ($\kappa_{B^+} = 0$).

* Daten entnommen von Lips & Keller, 1998.

Diskussion

In vorherigen Studien wurden überzeugende Hinweise dafür erbracht, daß die Degeneration von Motoneuronen sowohl bei der menschlichen Amyotrophen Lateralskerose als auch in entsprechenden Tier-Modellen mit einer Störung der zellulären Ca²⁺-Homöostase in Verbindung steht (Appel et al. 1995; Alexianu et al. 1994; Krieger et al. 1996; Reiner et al. 1995; Rothstein & Kuncl, 1995; Shaw & Ince, 1997). Verschiedene Ursachen wurden für diese Störung diskutiert, hierzu gehören hoch Ca²⁺-permeable Glutamatrezeptor Kanäle (Bar Peled et al. 1999; Carriedo et al. 2000; Roy et al. 1998; Shaw & Ince, 1997), ein gesteigerter Ca²⁺-Einstrom durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (Appel et al. 1995; Ho et al. 1996; Smith et al. 1992) und eine niedrige endogene Ca²⁺-Pufferkapazität (Alexianu et al. 1994; Lips & Keller, 1998; Palacek et al. 1999; Reiner et al. 1995). Hypoglossale Motoneurone werden im Verlauf der ALS-Erkrankung ausgesprochen stark geschädigt (Reiner et al. 1995). Um zu überprüfen, ob der Glu-Rezeptor (AMPA/KA und NMDA) vermittelte Ca²⁺-Einstrom in Verbindung mit der besonderen Verwundbarkeit der hypoglossalen Motoneurone auch außergewöhnlich hoch ausfällt, wurde Hilfe elektrophysiologischen mit von simultanen und mikrofluorometrischen Messungen eine quantitative Analyse des Glu-Rezeptor vermittelten Ca2+-Einstroms vorgenommen. In den hypoglossalen Motoneuronen wird zudem eine rhythmische Aktivität erzeugt, die zur periodischen Generierung mehrerer Aktionspotentiale führt und damit einen massiven spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstrom nach sich zieht (Lips & Keller, 1999). Ein quantitativer Vergleich des Glu-Rezeptor vermittelten und spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstroms erschien daher interressant, um die Bedeutung dieser beiden Ca²⁺-Einstrommechanismen für die zelluläre Ca²⁺-Homöostase abschätzen zu können.

4.1 AMPA/KA-Rezeptor vermittelte Signale in den hypoglossalen Motoneuronen

Die kinetischen Eigenschaften der AMPA/KA EPSCs in den hypoglossalen Motoneuronen erschienen im Vergleich mit anderen Neuronenpopulationen nicht außergewöhnlich. Die

durchschnittliche Abfallzeitkonstante der AMPA/KA-Rezeptor vermittelten spontanen EPSCs betrug 3.4ms (vgl. 3.2.1). Ähnliche Werte wurden auch in NTS-Neuronen (3.5ms, Titz & Keller, 1997), in menschlichen spinalen Motoneuronen (3.7ms, Konnerth et al. 1990), sowie in Hippocampus Neuronen (4.8ms, Jonas et al. 1993) ermittelt. Auch die mittlere Amplitude der AMPA/KA-sEPSCs in den hypoglossalen Motoneuronen (30.4pA) wies im Vergleich mit anderen Neuronenpopulationen keinen ungewöhnlich hohen Wert auf, teilweise wurden die Amplituden von AMPA/KA sEPSCs in anderen Neuronenpopulationen deutlich höher oder niedriger beschrieben (54pA in Neuronen des Nucleus cochlearis ventralis, Isaacson & Walmsley, 1996; 14pA in NTS Neuronen, Titz et al. 1997).

Aus der um den Faktor 1.6 vergrößerten mittleren Amplitude der AMPA/KA-Rezeptor vermittelten sEPSCs gegenüber den Miniatur-EPSCs wird deutlich, daß die sEPSCs aus Rezeptorkanalaktivierungen an 1 bis 2 postsynaptischen Endigungen hervorgingen (vgl. 3.2.1). Vorherige Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß AMPA/KA-Rezeptorkanäle an einer synaptischen Endigung zumeist nicht vollzählig durch einen Glutamatvesikel aktiviert werden (Liu & Tsen, 1995; Forti et al. 1997). In corticalen Neuronen konnte die Absättigung auf 70% abgeschätzt werden (Umemiya et al. 1999), so daß die einem Aktionspotential folgende quantale Vesikelausschüttung an einer synaptischen Endigung teilweise ausreichen dürfte, um die ermittelte spontane EPSC-Amplitude zu erreichen.

Weiterhin haben die Messungen gezeigt, daß die Ca²⁺-Permeabilität der AMPA/KA-Rezeptorkanäle in den hypoglossalen Motoneuronen nicht über 1.2% hinausreicht. Ähnliche Werte sind auch von anderen Studien bekannt, so konnten Schneggenburger et al. 1993 einen fraktionalen Ca²⁺-Einstrom (P_f) von 1.4% nach Kainatapplikation in Neuronen des medialen Septums nachweisen. In Purkinje Zellen wurde ein P_f-Wert von 0.6% ermittelt (Tempia et al. 1996). Von rekombinierten heteromeren AMPA-Rezeptoren bestehend aus GluR1 und editierten GluR2 Untereinheiten ist ein P_f-Wert von 0.54% bekannt, eine Expression von homomeren AMPA-Rezeptorkanälen aus der GluR1 Untereinheit ergab einen fraktionalen Ca²⁺-Einstrom von 3.2% (Burnashev et al. 1995). Der in den hypoglossalen Motoneuronen nachgewiesene fraktionale Ca²⁺-Einstrom von 1.2% deutet daher darauf hin, daß neben niedrig Ca²⁺-permeablen heteromeren AMPA-Kanälen, die eine editierte GluR2 Untereinheit enthalten, mit geringerem Anteil auch höher Ca²⁺-permeable AMPA/KA-Rezeptorkanäle (GluR1 bis GluR4) ohne editierte GluR2 Untereinheit vorliegen. Ob hierbei den KA Untereinheiten (GluR5 bis GluR7, KA-1 und KA-2) eine Bedeutung zukommt, kann nach dem in dieser Arbeit vorgenommenen experimentellen Ansatz nicht geklärt werden. Dies erscheint aber möglich, da anhand einer immumocytochemischen PCR-Analyse im Nucleus hypoglossus die RNA nahezu aller GluR Untereinheiten nachgewiesen werden konnte (GluR1 bis GluR6, GluR7 in Spuren, Ka-1, jedoch nicht KA-2; Paarmann et al. 2000).

Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß ein elementares synaptisches Ereignis (Miniatur-EPSC) mit einem Ca²⁺-vermittelten Ladungseinstrom von weniger als 0.001pC einhergeht (vgl. 3.5). Wenn man davon ausgeht, daß ein einzelnes Aktionspotential in den hypoglossalen Motoneuronen im Durchschnitt eine Erhöhung der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration um 6nM in Verbindung mit einem Ca²⁺-Einstrom von 2.1pC auslöst (Lips & Keller, 1999), dann ergibt sich hieraus, daß etwa 2200 AMPA/KA Miniatur-EPSCs beziehungsweise 1400 AMPA/KA sEPSCs ausgelöst werden müßten, um den gleichen Effekt zu erzielen (vgl. 3.5).

In den hypoglossalen Motoneuronen tritt in Verbindung mit dem Atemrhythmus, der wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte unter in vivo Bedingungen eine dauerhafte Frequenz von 5Hz in den juvenilen Mäusen erreichen kann (vgl. 3.1), eine wiederkehrende gesteigerte elektrische Aktivität auf, die zur Generierung mehrerer Aktionspotentiale führt. In Verbindung mit dieser elektrischen Aktivität kommt es zu einem Ca²⁺-Einstrom durch Glu-Rezeptor vermittelte Ionenströme, vor allem aber auch durch die Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle, wobei Ca²⁺-Oszilationen in Verbindung mit dem Atemrhythmus mit einer Frequenz von bis zu 10Hz beschrieben wurden (Ladewig & Keller, 2000; Lips & Keller, 1999; Palacek et al. 1999). Der AMPA/KA vermittelte Ca²⁺-Einstrom erscheint indes im Vergleich zum spannungsabhängig ausgelösten so gering, daß diesem in den hypoglossalen Motoneuronen auch keine große Bedeutung für eine Ca²⁺-Akkumulation zuzukommen scheint, welche mit einer neurodegenerativen Wirkung, insbesondere bei der Amyotrophen Lateralsklerose, einhergehen könnte. Zudem wurde in Studien nahegelegt, daß die selektive Vulnerabilität einigen von Motoneuronenpopulationen mit einer außerordentlichen Expression von hoch Ca²⁺permeablen AMPA/KA-Rezepeptorkanälen einherginge (Pellegrini-Giampetro et al. 1997; Williams et al. 1997). Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse lassen nicht darauf schließen, daß dies im Falle der selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneurone zutrifft. Allerdings wurden die Ca²⁺-Leitfähigkeiten der AMPA/KA-Rezeptorkanäle als

Durchschnittswert in einem somatischen Kompartiment erfaßt, daher kann nach diesem experimentellen Ansatz nicht ausgeschlossen werden, ob einzelne hoch Ca²⁺- permeable AMPA/KA-Rezeptorkanäle in den hypoglossalen Motoneuronen lokal gehäuft auftreten und daher eine lokale Ca²⁺-vermittelte exzitatoxische Störung verursachen könnten.

4.2 NMDA-Rezeptor vermittelte Signale in den hypoglossalen Motoneuronen

Aus der Analyse der NMDA-Rezeptorkanal Eigenschaften in den hypoglossalen Motoneuronen ging hervor, daß die NMDA EPSCs vergleichsweise schnelle Abfallzeitkonstanten aufweisen, jedoch keine außergewöhnlichen Amplituden (3.2.2). In einer anderen Untersuchung (O'Brien et al. 1997) sind vergleichbare Amplituden der NMDA Miniatur-EPSCs von hypoglossalen Motoneuronen in juvenilen Ratten bekannt (16 ± 4pA, HP +50mV), sowie vergleichbare Abfallzeitkonstanten bei einem angelegten Haltepotential von -80mV (42 ± 12ms) beschrieben worden, jedoch verlängerte Abfallzeitkonstanten bei einem angelegten Haltepotential von +50mV (94 ± 19ms). In vielen anderen Hirnregionen wurden demgegenüber deutlich verlängerte NMDA-Rezeptorstrom Abfallzeitkonstanten dokumentiert, die sich zudem überwiegend nur mit einer langsamen (τ_f) und einer schnellen (τ_s) Abfallzeitkonstante beschreiben ließen (z. B. Hippocampus Neurone: $\tau = 60 - 150ms$, Hestrin et al. 1990; $\tau_f = 46ms$, $\tau_s = 235ms$, Keller et al. 1991).

Die Einzelkanalmessungen der NMDA-Rezeptorkanal Aktivität ergaben eine überwiegende Leitfähigkeit von 57pS (vgl. 3.3). Ein vergleichbarer Wert der NMDA Einzelkanalleitfähigkeit wurde in spinalen Motoneuronen von Ratten nachgewiesen (Palacek et al. 1999; 56.3pS neben 19.2, 38.4 und 69.6pS), in Hippocampus Neuronen betrug dieser 52pS (Keller et al. 1991), bei anderen Untersuchungen wurden überwiegende NMDA Einzelkanlleitfähigkeiten zwischen 40 und 50pS detektiert, zum Beispiel in Zentralneuronen von Mäusen (Ascher et al. 1988) und in zerebellaren Granular Zellen von Ratten (Howe et al. 1991). Insgesamt deutet die in dieser Arbeit ermittelte vergleichsweise hohe überwiegende NMDA Einzelkanalleitfähigkeit sowie die vergleichsweise schnelle durchschnittliche Abfallzeitkonstante der NMDA EPSCs auf eine außergewöhnliche Kombination von NMDA-Rezeptor Untereinheiten oder assozierter Proteine in den hypoglossalen Motoneuronen hin.

Bei rekombinierten NMDA-Rezeptorkanälen, die aus unterschiedlichen Splice Varianten der NR1 Untereinheit (NR1a, b, c, e und g) und NR2A Untereinheiten gebildet wurden, konnten in menschlichen HEK Zellen jeweils schnelle Abfallzeitkonstanten der NMDA-Rezeptorströme nachgewiesen werden, im Falle der Untereinheitenkombination NR1a mit NR2A betrug diese 54ms. Bei anderen Untereinheitenkombinationen (NR1a mit NR2B, NR2C und NR2D) wurden deutlich langsamere Abfallzeitkonstanten mit bis zu mehreren hundert Millisekunden Dauer detektiert (Vicini et al. 1998). Dies deutet darauf hin, daß in den hypoglossalen Motoneuronen überwiegend funktionelle heteromere NMDA-Rezeptorkanäle mit der Untereinheitenkombination NR1 und NR2A vorliegen.

Mittels "in sito Hybridisierungsanalysen" am Mäusehirnstamm in der Hypoglossusregion konnte auch ein überwiegendes Vorkommen von mRNA der NR1 und NR2A Untereinheiten in 21 Tage alten Mäusen nachgewiesen werden (Watanabe et al. 1994), entwicklungsabhängige Untersuchungen ließen aber darauf schließen, daß in der Hypoglossusregion von 7 Tage alten Mäusen neben NR2A Untereinheiten auch NR2B und NR2D Untereinheiten vorkommen (Watanabe et al. 1992). Mittels PCR-Experimenten an hypoglossalen Motoneuronen juveniler Mäuse wurde kürzlich auch RNA der NR2B und NR2D Untereinheiten nachgewiesen (Paarmann et al. 2000), was darauf hindeutet, daß die Abfallzeitkonstanten der NMDA-Rezeptorströme teilweise deutlich langsamer zu erwarten wären als sie in dieser Arbeit überwiegend nachgewiesen wurden.

Möglicherweise können aus Splice Varianten der NR1 Untereinheit (NR1b, c, e und g; Hollmann et al. 1993) in Kombination mit unterschiedlichen NR2 Untereinheiten (NR2B, D) heteromere NMDA-Rezeptorkanäle mit außergewöhnlich schnellen kinetischen Eigenschaften und außergewöhnlichen Einzelkanalleitfähigkeiten in den hypoglossalen Motoneuronen gebildet werden. Eine plausibler erscheinende Möglichkeit wäre, daß im Rahmen des entwicklungsabhängigen Wechsels von NMDA-Rezeptorkanälen mit langsamer Kinetik (NR2B und NR2D) hin zu NMDA-Rezeptorkanälen mit schneller Kinetik (NR2A, Watanabe et al. 1992) eine modulatorische Inaktivierung der langsamen NMDA-Rezeptorkanäle bereits vorzeitig einsetzt bzw. aus nachweisbarer RNA bestimmter Untereinheiten keine funktionellen NMDA-Rezeptorkanäle mehr gebildet werden.

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, daß die NMDA-Rezeptorkanäle in den hypoglossalen Motoneuronen im Durchschnitt eine Ca²⁺-Leitfähigkeit von 9.4% des
Gesamtladungseinstroms aufwiesen (Mittelwert aus $P_f \& P(Ca)$, vgl. 3.5). Ähnliche Werte wurden auch in anderen Neuronenpopulationen nachgewiesen, Schneggenburger et al. (1993) ermittelte einen fraktionalen Ca²⁺-Einstrom (P_f) von 6.8% in Neuronen des medialen Septums, Garaschuk et al. (1996) beschrieben einen fraktionalen Ca²⁺-Einstrom von 10.7% durch den NMDA-Rezeptorkanal in Hippocampus Neuronen.

NMDA-Rezeptoren weisen eine hohe Affinität gegenüber Glutamat auf, es kann daher angenommen werden, daß ein Vesikel zumeist ausreicht um alle NMDA-Rezeptoren an einer postsynaptischen Endigung abzusättigen (Platneu & Mayer, 1990). In den hypoglossalen Motoneuronen werden während der spontanen synaptischen Aktivität der NMDA-Rezeptorkanäle demnach durchschnittlich 2-3 postsynaptische Endungen aktiviert (vgl. 3.2.2).

Ein elementares synaptisches Ereignis (Miniatur-EPSC) konnte mit einem Ca^{2+} vermittelten Ladungseinstrom von weniger als 0.01pC in Verbindung gebracht werden. Der Vergleich mit dem durch ein Aktionspotential ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom in den hypoglossalen Motoneuronen von 2.1pC (Lips et al. 1999) zeigt, daß etwa 270 NMDA Miniatur-EPSCs bzw. 120 NMDA sEPSCs ausgelöst werden müßten (vgl. 3.5) um den gleichen Eintrag von Ca^{2+} hervorzurufen.

Der eher geringe Ca^{2+} -Einstrom in Verbindung mit der NMDA-Rezeptorkanal Aktivität deutet auch hier darauf hin, daß diesem unter physiologischen Bedingungen keine zentrale Bedeutung bei der selektiven Vulnerabilität der hypoglossalen Motoneurone zukommt, insbesondere wenn man berücksichtigt, daß es in Verbindung mit dem Atemrhythmus zu einem periodischen Ca²⁺-Eintrag durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle kommt, der den Ca²⁺-Eintrag durch die NMDA-Rezeptorkanäle bei weitem übersteigt.

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß der NMDA-Rezeptorkanal unter veränderten Bedingungen an der Auslösung von ALS-vermittelten neuronalen Schädigung beteiligt sein könnte, etwa in Verbindung mit einer Störung des glialen Glutamattransporters GLT1 (Rothstein et al. 1992, 1995; Trotti et al. 1999).

4.3 Ca²⁺-Dynamik und Pufferung in Motoneuronenpopulationen, die im Verlauf der ALS-Erkrankung selektiv resistent oder vulnerabel sind

Nicht alle Motoneuronenpopulationen werden im Verlauf der ALS-Erkrankung geschädigt, der Nucleus oculomotorius verbleibt intakt, schwere neuronale Schädigungen treten dagegen in hypoglossalen Motoneuronen, in spinalen Motoneuronen oder auch in corticalen Betz Zellen auf (Elliot & Snider, 1995; Ince et al. 1993; Reiner et al. 1995). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zelluläre Adaptionen der Neurone zu erfassen, die mit der selektiven Vulnerabilität in Verbindung stehen könnten. Nach der "added buffer"-Methode (Neher & Augustine, 1992) wurde die endogene Pufferkapazität in den oculomotor Neuronen und corticalen Betz Zellen erstmals gemessen.

In den oculomotor Neuronen wurde die endogene Pufferkapazität mit $\kappa_s = 264$ ermittelt, die damit um den Faktor 5 bis 6 höher lag als in den selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen mit $\kappa_s = 41$ sowie in den spinalen Motoneuronen mit $\kappa_s = 50$ und den corticalen Betz Zellen mit $\kappa_s = 42$ (siehe auch Tabelle 1; Lips & Keller, 1998; Palacek et al. 1999; Abb. 3.20). Die endogene Pufferkapazität in den oculomotor Neuronen war damit immer noch um den Faktor 3.5 kleiner als in Purkinje Zellen ($\kappa_s = 900$; 6 Tage alte Mäuse; Fierro & Llano, 1996), aber vergleichbar mit $\kappa_s = 160 - 207$ in Hippocampus CA1 Neuronen (Helmchen et al. 1996). Die Extrusionsrate wurde in den oculomotor Neuronen mit $\gamma = 156s^{-1}$ ermittlet, ein vergleichbarer Wert mit $\gamma = 140s^{-1}$ wurde in spinalen Motoneuronen dukomentiert. Diese Raten waren im Vergleich mit denen in der Calyx von Held (400s⁻¹; Helmchen et al. 1997) gering, aber größer als in Betz Zellen ($\gamma = 93s^{-1}$), und mehrfach größer als in hypoglossalen Motoneuronen ($\gamma = 60s^{-1}$; Lips & Keller, 1998) und adrenalinen Chromaffin Zellen ($\gamma = 13s^{-1}$; Neher & Augustine, 1992). Der durch eine Ca²⁺-Einstrom Membrandepolarisation induzierte in verschiedenen war Motoneuronenpopulationen ebenfalls heterogen. Ein 500ms andauernder depolarisierender Spannungspuls auf +10mV löste in oculomotor Neuronen einen Ca^{2+} -Einstrom von 55 ± pC/pl und in spinalen Motoneuronen von $21 \pm 5pC/pl$ aus (Palacek et al. 1999). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten daher darauf hin, daß Unterschiede in der endogenen Pufferkapazität, jedoch nicht Unterschiede in der Extrusionsrate oder dem spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstrom, eine Erklärung der selektiven Vulnerabilität auf zellulärer Ebene ermöglichen.

Die Annahme, daß eine hohe Ca²⁺-Pufferkapazität mit einem Schutz selektiv resistenter Motoneurone einhergehen könnte, wird durch vorherige Untersuchungen zur Expression von Ca²⁺-bindenden Proteinen unterstützt (Alexianu et al. 1994; Baimbridge et al. 1992; Elliot & Snider, 1995; Ince et al. 1993; Reiner et al. 1995). In einer Studie konnte mit immunozytochemischen Untersuchungen eine hohe Pufferkonzentration von Parvalbumin in den oculomotor Neuronen nachgewiesen werden, wohingegen diese in hypoglossalen und spinalen Motoneuronen gering ausfiel (De Paul et al. 1988). Zudem wurde in mehreren Untersuchungen an Zellkulturen gezeigt, daß erhöhte Konzentrationen einzelner Ca²⁺-bindender Proteine mit einer Verminderung der ALS-vermittelten Motoneuronenschädigung einhergehen können (Ho et al. 1996; Tymianski et al. 1994).

4.4 Heterogene Effekte von Ca²⁺-Puffern in unterschiedlichen Modellen der Neurodegeneration

Andere Untersuchungslinien haben Hinweise erbracht, daß erniedrigte endogene Pufferkapazitäten zu einem Schutz von Neuronen gegen Ca²⁺-vermittelte Schädigungen beitragen könnten ("Neuroprotektion Typ I", Chad, 1989; Abdel Hamid & Baimbridge, 1997; Nägerl & Mody, 1998). Im Fall der gut untersuchten Hippocampus Neurone wurde dokumentiert, daß erniedrigte Pufferkonzentrationen zu einem Schutz gegen Ischämie vermittelte Degeneration beitragen können, vermutlich durch eine Erhöhung lokaler Ca²⁺-Konzentrationen und einer damit verbundenen vermehrten Ca²⁺-abhängigen Inaktivierung der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle, wodurch der Gesamteinstrom von Ca²⁺ in Folge langanhaltender Membrandepolarisationen verringert würde. Dieses Konzept wurde durch Untersuchungen an transgenen Mäusen unterstützt (Klapstein et al. 1998), wo ein genetischer "knock out" des Ca²⁺-bindenen Proteins Calbindin zu einem Schutz von Hippocamus Neuronen während ischämischer Episoden beitrug. Unterschiedliche Erklärungen wurden für dieses Ergebnis angeführt. Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, daß Calbindin in Verbindung mit großen Ca²⁺-Mengen selbst toxische Wirkungen entfalten kann. Elektrophysiologische Studien des spannungsabhängigen Ca²⁺-Einstroms haben aber auch hier Hinweise erbracht, daß eine erniedrigte Ca²⁺-Pufferung die Inaktivierung der Ca²⁺-Kanäle begünstigt und den netto-Calciumeintrag somit verringert, was wiederum einen neuroprotektiven Effekt zur Folge haben soll (Klapstein et al. 1998).

Dieses Konzept (Neuroprotektion Typ I) ist mit meinen eigenen Ergebnissen nicht in Einklang zu bringen, da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß die bei der ALS-Erkrankung selektiv resistenten oculomotor Neurone im Gegensatz zu den vulnerablen Motoneuronenpopulationen eine hohe endogene Pufferkapazität aufweisen. Diese Ergebnisse stimmen demgegenüber mit dem "Neuroprotektion Typ II" Konzept überein, welches hohe Pufferkapazitäten mit einem Schutz von Motoneuronen in Verbindung bringt (Elliot & Snider, 1995; Ince et al. 1993; McMahon et al. 1998; Reiner et al. 1995). Die unterschiedliche Interpretation beider Neuroprotektions-Konzepte scheint mit verschiedenen Wirkungsweisen der endogenen Puffer in den jeweiligen Neuronenpopulationen zusammenzuhängen. In hochgepufferten Zellen, wie den Hippocampus Neuronen, könnten die Amplituden der Ca²⁺-Transienten durch eine zusätzliche Erhöhung der endogenen Pufferkonzentration kaum noch verringert werden (Abb. 3.19A), vielmehr bestünde hier das oben angeführte Risiko, daß lokale ungepufferte Ca²⁺-Domänen verkleinert würden und dadurch eine Ca²⁺-abhängige Inaktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen vermindert würde (Abb. 3.19B). Demgegenüber können in hypoglossalen und spinalen Motoneuronen oder auch in Betz Zellen, die durch eine niedrige endogene Pufferkapazität charakterisiert werden, erhöhte endogene Pufferkonzentrationen offenbar einer exzessiven Akkumulation von Calcium an offenen Ca²⁺-Kanälen entgegenwirken und somit die freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration unterhalb einer kritischen Menge halten (Abb. 3.19A). Unter "exzitatoxischen" Bedingungen vermindert dies das Risiko der Aktivierung von apoptotischen "second messenger" Kaskaden einschließlich Ca²⁺-abhängiger Nucleasen und Proteasen, von denen bekannt ist, daß sie von Ca^{2+} -Erhöhungen über den mikromolaren Bereich abhängen (Alexianu et al. 1994; Baimbridge et al. 1992; Choi, 1988; Krieger et al. 1994).

Eine Verhinderung von Ca^{2+} -Akkumulationen könnte auch das Risiko für eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung und Produktion von Sauerstoffradikalen verhindern, deren Auftreten in vulnerablen Motoneuronenpopulationen in Verbindung mit einem exzessiven Glutamatrezeptor vermittelten Ca^{2+} -Einstrom dokumentiert wurden (Carriedo et al. 2000).

4.5 Zusammenspiel verschiedener Faktoren bei der ALS-Erkrankung

Unter Berücksichtigung der vielen unterschiedlichen molekularen Mechanismen, die mit der neurodegenerativen Wirkung der Amyotrophen Lateralsklerose in Zusammenhang gebracht werden (Abdel-Hamid et al. 1997, Bruijn et al. 1998; Choi, 1988; Cleveland, 1999; Morrison & Morrison, 1998; Reiner et al. 1995; Rothstein et al. 1995) wird klar, daß es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt. Den meisten angeführten Mechanismen ist jedoch gemeinsam, daß einer Ca²⁺-Signal Komponente eine wichtige Bedeutung zukommt. Zum Beispiel wurde in einigen Studien gezeigt, daß Ca²⁺-permeable Glutamatrezeptoren (AMPA) in selektiv vulnerablen Motoneuronenpopulationen hochexprimiert vorliegen können (Bar Peled et al. 1999; Roy et al. 1998; Shaw & Ince, 97; Shaw et al. 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Ca²⁺-Permeabilität der AMPA/KA-Kanäle in den selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen nachgewiesen werden, die jedoch überwiegend auf niedrig Ca²⁺-permeable AMPA/KA-Kanäle hinweist. Die Ca2+-Permeabilität der NMDA-Kanäle erschien ebenfalls nicht übermäßig groß. Dennoch würde aufgrund der niedrigen endogenen Pufferkapazität in den selektiv vulnerablen Motoneuronen (hypoglossale, spinale und corticale Motoneurone) eine 5 bis 6-fach erhöhte Glutamatrezeptor vermittelte Ca²⁺-Antwort im Vergleich mit den selektiv resistenten oculomotor Neuronen auftreten (Abb. 3.19). Dem könnte bei einer Störung der Glutamtrezeptor vermittelten Signale, etwa durch eine Beeinträchtigung des Glutamattransporters GLT1 und einer damit verbunden gesteigerten synaptischen Aktivität (Rothstein et al. 1992, 1995; Trotti et al. 1999), ebenfalls eine wichtige Rolle bei der selektiven Vulnerabilität bestimmter Motoneuronenpopulationen zukommen. Und obwohl sehr verschiedene Ca²⁺-abhängige Mechanismen mit der ALS-Erkrankung in Verbindung gebracht wurden (Alexianu et al. 1994, Cleveland, 1999; Morrison & Morrison, 1998; Shaw & Ince, ist die Wirkung im Hinblick auf eine selektive 1997) Motoneuroenenschädigung dennoch gleich. Auf der Basis der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse läßt sich diese vergleichbare Wirkung gut mit dem vereinheitlichenden Modell erklären, daß niedrige endogene Ca²⁺-Pufferkapazitäten einen erhöhten Risikofaktor darstellen.

4.6 Auswirkungen der unterschiedlichen Ca²⁺-Homöostase für physiologische und pathophysiologische Abläufe

Eine niedrige endogene Pufferkapazität kann das Risiko für neuronale Schädigungen erhöhen, bietet aber gleichwohl einen wichtigen funktionellen Vorteil für rhythmisch aktive Zellen. Wie in Abbildung 3.19A gezeigt wird, fallen Ca²⁺-Transienten bei niedrigen Pufferkapazitäten deutlich schneller ab, wenn die anderen Parameter der zellulären Ca²⁺-Homöostase konstant bleiben (Neher & Augustine, 1992). In rhythmisch aktiven hypoglossalen oder spinalen Motoneuronen, wo Aktionspotential-vermittelte Ca2+-Oszilationen mit maximaler Frequenz von 10Hz auftreten können (Ladewig & Keller, 2000; Lips & Keller, 1999; Palacek et al. 1999), ist der schnelle Rückgang von intrazellulären Ca²⁺-Erhöhungen eine essentielle Voraussetzung für die Erhaltung der physiologisch wichtigen zellulären Funktion, da eine Ca²-Akkumulation sich auf Dauer neurodegenerativ auswirken würde (Krieger et al. 1994). In diesem Zusammenhang könnte eine gesteigerte Extrusionsrate ebenfalls einen vermehrten Rückgang von freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentrationen bewirken. Auch der kürzlich dokumentierte neuroprotektive Effekt des ATP-Puffers Kreatin-Phosphat in einem Mausmodell der menschlichen ALS-Erkrankung läßt sich möglicherweise auf eine gesteigerte Abfallrate von Aktivitäts-vermittelten Ca^{2+} -Transienten zurückführen (Klivenyi et al. 1999). Doch obwohl eine schnelle Abfallzeit der Ca²⁺-Transienten in hochgepufferten Neuronen durch eine gesteigerte Extrusionsrate erreicht werden könnte, wäre dies doch mit einem deutlich höheren Energieaufwand in einem rhythmisch aktiven System verbunden, da ATPabhängige Extrusionsmechanismen dann vermehrt betrieben werden müßten (Lips & Keller, 1999; Palacek et al. 1999). Insgesamt deuten die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse demnach darauf hin, daß zelluläre Adaptionen, die schnelle Ca²⁺-Signale bei geringen Kosten ermöglichen, auch das Risiko für neuronale Schädigungen unter pathophysiologischen Bedingungen erhöhen, wie dies bei den selektiv vulnerablen hypoglossalen und spinalen Motoneuronen in Verbindung mit der ALS-vermittelten Motoneuronendegeneration anzutreffen ist.

4.7 Ca²⁺-Homöostase in einem Maus-Tiermodell der ALS-Erkrankung

Die Untersuchungen an den transgenen Mäusen mit einer Mutation in der Superoxiddismutase sollten zu einer Klärung der Frage beitragen, ob in diesem jungen Stadium (P2 - P3) bereits Störungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase zu verzeichnen sind. Die selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen boten sich hierbei als Untersuchungsobjekt an. Die am allgemeinsten anerkannte Wirkungsweise des mutierten SOD1-Enzyms liegt in einer inhibitorischen Wirkung auf GLT1-Transporter in Gliazellen (Trotti et al., 1999). Dies könnte mit einem vermehrten, zunächst Glu-Rezeptor vermittelten, in Folge aber auch spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (McClesky, 1994) und einer damit verbundenen "zellulären Streßantwort" einhergehen, in deren Folge es zur Hochregulation des endogenen Ca^{2+} -Puffers Calbindin und damit zu einer deutlichen Erhöhung der endogenen Pufferkapazität kommt (Dassesse et al. 1998).

Zudem wurden abnorme Akkumulationen von Neurofilamentproteinen sowohl in Maus-Tiermodellen mit einer Mutation in der SOD als auch bei ALS-Patienten beschrieben (Morrison et al. 1996; Tu et al. 1996). Neurofilamentproteine weisen sowohl hoch als auch niedrig affine Ca²⁺-Bindungsstellen auf und fungieren daher vermutlich als endogener Ca²⁺-Puffer (Krinks et al. 1988; Abercrombie et al. 1990). Eine SOD1 vermittelte Störung des Neurofilamentproteins in transgenen Tiermodellen und ALS-Patienten könnte demnach durch eine Verringerung der endogenen Pufferkapazität angezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte an den SOD1-mutierten transgenen Mäuse keine deutliche Änderung der endogenen Pufferkapazität (κ_s) festgestellt werden (vgl. 3.6.3), sowohl im Wildtyp als auch in den transgenen Tieren war κ_s niedrig, die oben angeführten Mechanismen ließen sich daher nicht nachweisen.

Außerdem wurden in Verbindung mit einer Mutation in der SOD morphologische Änderungen der Mitochondrien beschrieben (Dal Canto & Gurney, 1995; Kong & Xu, 1998). In einer anderen Studie wurde eine depolarisationsbedingte Abkopplung der Mitochondrien von der Atmungskette beschrieben (Carri et al. 1997). Die Mitochondrien erfüllen bei der Absenkung einer zytoplasmatisch erhöhten Ca²⁺-Konzentration eine wichtige Rolle. Eine gestörte Sequestration in den Mitochondrien müßte sich auch mit einer Verminderung der zellulären Extrusionsrate auswirken. Zudem stellen die Mitochondrien das ATP bereit, welches für membranständige Ca²⁺-ATPasen und Na⁺/Ca²⁺-Austauscher benötigt wird. Dies müßte zusätzlich mit einer verminderten Extrusionsrate einhergehen. Eine verminderte Extrusionrate gegenüber dem Wildtyp konnte in dieser Arbeit anhand der transgenen Mäuse nicht nachgewiesen werden (vgl. 3.6.3), dies spricht ebenfalls dagegen, daß hier zellschädigende Mechanismen bereits ausgelöst wurden. Vermutlich lassen sich durch das mutierte SOD1-Enzym ausgelöste Änderungen von Parametern der zellulären Ca^{2+} -Homöostase erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt nachweisen, möglicherweise erst kurz vor dem Einsetzen der Krankheitssymptome nach etwa 6 Lebensmonaten (Gurney et al. 1994).

4.8 Klinische Aspekte und Ausblick

Im Hinblick auf einen klinischen Schutz von Motoneuronen gegen die ALS-vermittelte Schädigung können im Rahmen dieser Arbeit einige Aussagen getroffen werden. Zunächst könnte eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Pufferkonzentration in den selektiv vulnerablen Motoneuronen ähnliche Ca²⁺-Pufferungseigenschaften wie in den ALS-resistenten Motoneuronen schaffen und damit einen Schutz bewirken; indem die Amplituden "exzitatoxischer" Ca²⁺-Transienten verringert würden und dadurch das Auftreten neurodegenerativer Kaskaden verhindert würde (Abb. 3.19A). Dennoch würde eine Puffererhöhung mit einer Verzögerung der Ca²⁺-Signale während rhythmischer Aktivität verbunden sein, was wiederum zu einer "exzitatoxischen" Ca²⁺-Akkumulation in den hochrhythmischen hypoglossalen und spinalen Motoneuronen führen könnte (Ladewig & Keller, 1998; Lips & Keller, 1999; Palacek et al. 1999). Dieses Problem könnte jedoch möglicherweise durch eine Erhöhung der zellulären ATP-Konzentration in Verbindung mit einer Steigerung der zellulären Extrusionsrate gemindert werden, da der Abfall der Ca²⁺-Transienten dann wieder schneller erfolgen würde. Für eine abschließende Bewertung dieser Hypothese wären jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Ein anderer Aspekt bietet sich in der Änderung des spatialen Ca²⁺-Profils in Abhängigkeit von der endogenen Ca²⁺-Pufferkapazität. Wie in Abbildung 3.19B dargestellt ist, wird durch erhöhte Pufferungseigenschaften die Größe lokaler ungepufferter Ca²⁺-Domänen an offenen Ca²⁺-Kanälen verringert (Klingauf & Neher, 1997; Neher, 1998; Roberts, 1994). Dies trägt vermutlich zu einer Neuroprotektion in den oculomotor Neuronen und Zellkultur-Modellen von Motoneuronenerkrankungen bei (Alexianu et al. 1994; 1998; Roy et al. 1998; Shaw & Ince, 1997). Bei ALS-Patienten muß man aber davon ausgehen, daß hier komplexere Bedingungen als in den Zellkultur-Modellen vorliegen, welche sich auf eine Neuronenpopulation beschränken lassen. Eine Verringerung der Ausdehnung von ungepufferten Ca^{2+} -Domänen könnte gleichwohl mit einer Unterbrechung lokal angesiedelter zellulärer Funktionen verbunden sein, wodurch wiederum ein neurodegenerativer Effekt ausgelöst werden könnte. Gerade in den selektiv vulnerablen Motoneuronenpopulationen mit niedriger endogener Pufferkapazität (hypoglossale, spinale, corticale Motoneurone) würden sich Erhöhungen der Pufferkapazität in einer deutlichen Reduktion der ungepufferten Ca^{2+} -Domänen auswirken (Abb. 3.19B).

Zusammenfassend läßt sich daher sagen, daß detaillierte Analysen der spatialen/temporalen Profile von physiologisch relevanten Ca²⁺-Signalen in selektiv vulnerablen sowie resistenten Motoneuronen weiterhin erforderlich bleiben, bevor eine abschließende Bewertung des klinischen Wertes erhöhter endogener Pufferkonzentrationen erfolgen kann. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern jedoch wichtige Ansatzpunkte für weiterreichende Untersuchungen.

Zusammenfassung

Die neurodegenerative Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose geht nach dem derzeitigen Erkenntnisstand auf eine Ca²⁺-vermittelte Schädigung zurück, wobei verschiedene Mechanismen an der Krankheitsausbildung beteiligt zu sein scheinen. Eine initiale Störung der zellulären Ca²⁺-Homöostase entsteht dabei möglicherweise durch gestörte Ca²⁺-Einstrommechanismen, welche dann zur Weiterverbreitung zellulärer Fehlfunktionen führen können, etwa zur mitochondrialen Schädigung oder zur Bildung von Neurofilamentproteinaggregaten. Im Krankheitsverlauf werden ausschließlich Motoneurone geschädigt, wobei eine selektive Schädigung bestimmter während andere Motoneuronenpopulationen auftritt, mit den dazugehörigen Muskelfunktionen vollkommen erhalten bleiben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ca²⁺-Einstrommechanismen in einer selektiv vulnerablen Motoneuronenpopulation untersucht, um Rückschlüsse über deren Wirkungsgrad für die globale Ca²⁺-Homöostase zu erhalten. Zudem wurde überprüft, welche Unterschiede in der zellulären Ca²⁺-Signalverarbeitung Verwundbarkeit mit einer besonderen bestimmter Motoneuronenpopulationen im Zusammenhang stehen könnten.

Um diesen Fragen nachzugehen, kamen elektrophysiologische ("Patch-clamp") und simultane mikrofluorometrische Messungen an Hirnschnittpräparaten junger Mäuse sowie Atemfrequenzmessungen von jungen Mäusen zum Einsatz.

Einen wichtigen Ca²⁺-Einstrommechanismus in Motoneuronen stellen Glutamat-aktivierte Ionenkanäle dar. In den selektiv vulnerablen hypoglossalen Motoneuronen wurden zwei Typen, AMPA/KA- und NMDA-Rezeptorkanäle, untersucht. Die AMPA/KA-Rezeptorkanäle wiesen keine ungewöhnlichen kinetischen Eigenschaften auf, die Ca²⁺-Permeabilität der AMPA/KA-Rezeptorkanäle von 1.2% ließ auf ein überwiegendes Vorkommen von niedrig Ca²⁺-permeablen Ionenkanälen schließen. Die NMDA-Rezeptor vermittelten EPSCs wiesen ungewöhnlich schnelle Abfallzeitkonstanten auf ($\tau \approx 40$ ms), aus Einzelkanalmessungen konnte ein Hauptleitwert von 57pS bestimmt werden, was auf eine Untereinheitenkombination von NR1 und NR2A schließen läßt. Die ermittelte Ca²⁺-Permeabilität wies mit 9.4% auf keinen ungewöhnlichen Wert hin. Insgesamt fällt der Glutamat-aktivierte Ca²⁺-Einstrom in den hypoglossalen Motoneuronen nicht übermäßig groß aus. In einem synaptischen Modell konnte dargestellt werden, daß etwa 1400 AMPA/KA-Rezeptor vermittelte bzw. 120 NMDA-Rezeptor vermittelte spontane EPSCs zugleich ausgelöst werden müßten, um den gleichen Ca²⁺-Einstrom hervorzurufen, den ein Aktionspotential hervorrufen kann. Aufgrund der an den Atemrhythmus gekoppelten rhythmischen elektrischen Aktivität der hypoglossalen Motoneurone treten ganze Salven von Aktionspotentialen mit einer Frequenz von bis zu 5Hz auf. Sowohl der AMPA/KA- als auch der NMDA-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Einstrom erschien daher im Vergleich zum spannungsabhängig ausgelösten Ca²⁺-Einstrom während der unter physiologischen Bedingungen zu erwartenden synaptischen und elektrischen Aktivität zu erklären.

Um zu überprüfen, ob Unterschiede in der zellulären Ca²⁺-Signalverarbeitung mit einer selektiven Verwundbarkeit oder Resistenz bestimmter Motoneuronenpopulationen einhergehen könnten, wurden im Anschluß Messungen von Parametern der zellulären Ca²⁺ -Homöostase nach der "added buffer" Methode (Neher & Augustine, 1992) vorgenommen. Vor allem wurden dabei Unterschiede in den zellulären Ca²⁺-Pufferungseigenschaften gefunden, die in oculomotor Neuronen und corticalen Pyramidalneuronen (sog. Betz Zellen) im Rahmen dieser Arbeit erstmals bestimmt wurden. In den selektiv resistenten oculomotor Neuronen wurde eine etwa 6-fach erhöhte endogene Pufferkapazität ($\kappa_s = 264$) gegenüber selektiv vulnerablen Betz Zellen ($\kappa_s = 42$) und hypoglossalen Motoneuronen ($\kappa_s = 41$; Lips & Keller, 1998) detektiert.

Dies bedeutet, daß ein Ca²⁺-Einstrom in den niedriggepufferten Betz Zellen und hypoglossalen Motoneuronen eine etwa 6-fach erhöhte Zunahme der freien zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration gegenüber den hochgepufferten oculomotor Neuronen zur Folge hat. Hier wird auch deutlich, daß ein vermehrter Ca²⁺-Einstrom -möglicherweise in Verbindung mit einer Störung Glutamat-aktivierter Ionenkanäle- in den selektiv vulnerablen Motoneuronenpopulationen eher zu einer "exzitatoxischen" Störung Ca²⁺-Homöostase zellulären beitragen der kann. Die unterschiedlichen Ca²⁺-Pufferungseigenschaften ermöglichen somit eine Erklärung für die selektive Vulnerabilität bestimmter Motoneuronenpopulationen. Eine niedrige endogene Pufferkapazität bietet demgegenüber jedoch einen Vorteil bei der schnellen Ca2+-Signalverarbeitung, etwa in rhythmisch aktiven Neuronen, da sich zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationserhöhungen schneller zurückbilden und eine Ca²⁺-Akkumulation bei geringem Energieaufwand somit vermieden werden kann.

In einer weiteren Untersuchungslinie wurde gezeigt, daß die hypoglossalen Motoneurone neugeborener transgener Mäuse (P2 – P3), die ein Maus-Tiermodell der ALS-Erkrankung darstellen, keine wesentlichen Änderungen in verschiedenen Parametern der zellulären Ca^{2+} -Homöostase gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Vermutlich treten Störungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt auf, möglicherweise erst kurz vor dem Auftreten von Krankheitssymptomen nach etwa 6 Lebensmonaten.

Literaturverzeichnis

ABDEL-HAMID, K. M. & BAIMBRIDGE, K. G. (1997). The effects of artificial calcium buffers on calcium responses and glutamate-mediated excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* **81**, 673-687.

ABERCROMBIE, R. F., AL-BALDAWI, N. F. & JACKSON, J. (1990). Ca²⁺ binding by *Myxicola* neurofilament proteins. *Cell Calcium* **11**, 361-70.

ALEXIANU, M. E., HO, B. K., MOHAMED, A. H., LA, B. V., SMITH, R. G. & APPEL, S. H. (1994). The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Neurology* **36**, 846-858.

ALEXIANU, M. E., ROBBINS, E., CARSWELL, S. & APPEL, S. H. (1998). 1Alpha, 25 dihydroxyvitamin D3-dependent up-regulation of calcium-binding proteins in motoneuron cells. *Journal of Neuroscience Research* **51**, 58-66.

APPEL, S. H., SMITH, R. G., ALEXIANU, M., SIKLOS, L., ENGELHARDT, J., COLOM, L. V. & STEFANI, E. (1995). Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neuroscience* **3**, 368-374.

ASHER, P. & NOWAK. L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl –Daspartate responses of mouse central neurones in culture. *Journal of Physiology* **399**, 247-266.

ASHER, P., BREGESTOVSKI, P. & NOWAK, L. (1988). N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions. *Journal of Physiology* **399**, 207-26.

BAIMBRIDGE, K. G., CELIO, M. R. & ROGERS, J. H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences* **15**, 303-308.

BAR-PELED, O., O'BRIEN, R.J., MORRISON, J.H. & ROTHSTEIN, J.D. (1999). Cultured motor neurons possess calcium-permeable AMPA/kainate receptors. *NeuroReport* 10, 855-859.

BARTHLETT, D., LEITER, J. C. & KNUTH, S. L. (1990). Control and actions of the genioglossus muscle. *Progress in Clinical Biological Research* **345**, 99-108.

BLAHOS II, J. & WENTHOLD, R. J. (1996). Relationship between N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Splice Variants and NR2 Subunits. *Journal of Biological Chemistry* **271(26)**, 15669-74.

BLAUSTEIN, M. P. (1988). Calcium transport and buffering in neurons. *Trends in Neurosciences* **11**, 438-443.

BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.

BROCKHAUS, J., BALLANYI, K., SMITH, J. C. & RICHTER, D. W. (1993). Microenvironment of respiratory neurons in the *in vitro* brainstem spinal cord of neonatal rats. *Journal of Physiology* **462**, 421-445.

BROWN, R. H. (1995). Amyotophic lateral sclerosis: Recent insight from genetics and transgenic mice. *Cell* **80**, 687-692.

BRUIJN, L.I., HOUSEWAERT, M.K., KATO, S., ANDERSON, K.L., ANDERSON, S.D., OHAMA, E., REAUME, A.G., SCOTT, R.W. & CLEVELAND, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**, 1851-1854

BURNASHEV, N., ZHOU, Z., NEHER, E. & SAKMANN, B. (1995). Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *Journal of Physiology* **485**, 403-418.

CARRI, M. T., FERRI, A., BATTISTONI, A., FAMHY, L., GABBIANELLI, R., POCCIA, F. & ROTILIO, G. (1997). Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induced mitochrondrial alteration and increase of cytosolic Ca^{2+} concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Letters* **414**, 365-68.

CARRIEDO, S.G., SENSI, S.L., YIN, H.Z. & WEISS, J.H. (2000). AMPA exposures induce mitochondrial Ca^{2+} overload and ROS generation in spinal motor neurones in vitro. *Journal of Neuroscience*, **20**(1), 240-250.

CHAD, J. (1989). Inactivation of calcium channels. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **93**, 95-105.

CHOI, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Journal of Neurosc*ience **7**, 369-379.

CHOI, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623 - 634.

CLEVELAND, D.W. (1999). From charcot to SOD1: Mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 24, 515-520.

COLLINGRIDGE, G. L. & LESTER, R. A. (1989). Exzitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol-Review* **41**, 143-210.

DASSESSE, D., CUVELIER, L., KREBS, C., STREPPEL, M., GUNTINAS-LICHIUS, O., NEISS, WF. & POCHET, R. (1998). Differential expression of calbindin and calmodulin in motoneurons after hypoglossal axotomy. *Brain Research* **768**(1-2), 181-88.

DAL CANTO, M. E. & GURNEY, M. E. (1995). Neuropathological changes in two line of mice carrying a transgene for mutant Cu, Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Research* **676**, 25-40.

DEPAUL, R., ABBS, J. H., CALIGIURI, M., GRACCO, V. L. & BROOKS, B. R. (1988). Hypoglossal, trigeminal, and facial motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **38**, 281-283.

EDWARDS, F. A., KONNERTH, A., SAKMANN, B. & TAKAHASHI, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv* **414**, 600-612.

ELLIOT, JL. & SNIDER, WD. (1995). Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *Neuroreport* 6(3), 449-452.

EYRE, J. A., KERR, A. M., MILLER, S., O'SULLIVAN, M. C. & RAMESH, V. (1990). Neurophysiological observations on corticospinal projections to the upper limb in subjects with Rett syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychatry* **53**(10), 874-79.

FABER, D. S., YOUNG, W. S., LEGENDRE, P. & KORN, H. (1992). Intrinsic quantal variability due to stochastic properties of receptor-transmitters interactions. *Science* **258**, 1494-1497.

FIERRO, L. & LLANO, I. (1996). High endogenous calcium buffering in Purkinje cells from rat cerebellar slices. *Journal of Physiology* **496**, 617-625.

FIERRO, L., DIPOLO, R. & LLANO, I. (1998). Intracellular calcium clearence in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *Journal of Physiology* **510**, 499-512.

FORTI, L., BOSSI, M., BERGAMASCHI, A., VILLA, A. & MALGAROLI, A. (1997). Loosepatch recordings of single quanta at individual hippocampal synapses. *Nature* **388**, 874-78.

FREERMANN, D., KELLER, B. U. & RICHTER, D. W. (1998). Calcium oscillations in rhythmically active respiratory neurones in the brainstem of the mouse. *Journal of Physiology* **515**, 119-131.

GARASHUK, O., SCHNEGGENBURGER, R., SCHIRRA, C., TEMPIA, F. & KONNERTH, A. (1996). Fractional Ca²⁺ currents trough somatic and dendritic glutamate receptor channels of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Journal of Physiology London* **491**, 757-72.

GHOSH, A. & GREENBERG, M. E. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* **268**, 239-247.

GIBB, A. J. & COLQUHOUN, D. (1991). Glutamate activation of a single NMDA receptorchannel produces a cluster of channel openings. *Proc. R. Soc. Lond.* **243**, 39-45.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450.

GUNTER, K. K. & GUNTER, T. E. (1994). Transport of calcium by mitochrondria. Journal of Bioenergetics and Biomembranes **26**, 471-485.

GURNEY, M. E., HAIFENG, PU., CHIU, A. Y., DAL CANTO, M. C., POLCHOW, C. Y., ALEXANDER, D. D., CALIENDE, J., HENATITI, A., KWON, Y. W., DENG, H., CHEN, W., ZHAI, P., SUFIT, R. L., SIDDIQUE, T. (1994). Motor Neuron Degeneration in Mice that Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Science* **264**, 1772-1775.

GURNEY, M. E., CUTTINGS, F. B., ZHAI, P., DOBLE, A., TAYLOR, C. P., ANDRUS, P. K. & HAL, E. D. (1996). Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic laterale sclerosis. *Annual Neurology* **39**, 147-157.

HAMILL, O., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüglers Archiv* **391**, 85-100.

HAMMER, RP., JR., TOMIYASU, U., SCHEIBEL, AB. (1979). Degeneration of the human Betz cell due to amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* **63**(2), 336-46.

HELMCHEN, F., IMOTO, K. & SAKMANN, B. (1996). Ca^{2+} buffering and action potentialevoked Ca^{2+} signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophysical Journal* **70**, 1069-1081.

HELMCHEN, F., BORST, JG. & SAKMANN, B. (1997). Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal. *Biophysical Journal* **72**, 1458-1471.

HESTRIN, S., SAH, P. & NICOLL, R. A. (1990). Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocamal slices. *Neuron* **5**, 247-53.

HILLE, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. *Second edition*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, 83-114.

Ho, B. K., ALEXIANU, M. E., COLOM, L. V., MOHAMED, A. H., SERRANO, F. & APPEL, S.H. (1996). Expression of calbindin-D28K in motoneuron hybrid cells after retroviral infection with calbindin-D28K cDNA prevents amyotrophic lateral sclerosis IgG-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 6796-6801.

HOLLMANN, M., BOULTER, J., MARON, C., BEASLY, L., SULLIVAN, J., PECHT, G. & HEINEMANN, S. (1993). Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* **10**, 943-954.

HOWE, JR., CULL-CANDY, SG. & COLQUHOUN, D. (1991). Currents trough single glutamate receptor channels in outside-out patches from rat cerebellar granule cells. *Journal of Physiology (London)* **432**, 143-202.

INCE, P., STOUT, N., SHAW, P., SLADE, J., HUNZIKER, W., HEIZMANN, CW. & BAIMBRIDGE, KG. (1993). Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motoneuron disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **19**(4), 291-299.

ISAACSON, JS. & WALMSLEY, B. (1996). Amplitude and time course of spontaneus and evoked excitatory postsynaptic currents in bushy cells of the antroventral cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology* **76**, 1566-71.

JACQUIN, T. D., BORDAY, V., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., TOPILKO, P., GHILINI, G., KATO, F., CHARNAY, P. & CHAMPAGNAT, J. (1996). Reorganisation of pontine rhythmogenetic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron* **17**, 747-758.

JONAS, P., MAJOR, G. & SAKMANN, B. (1993). Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *Journal of Physiology London* **472**, 615-63.

KELLER, B. U., KONNERTH, A. & YAARI, Y. (1991). Patch clamp analysis of excitatory synaptic currents in granule cells of rat hippocampus. *Journal of Physiology London* **435**, 275-93.

KELLER, B. U., HOLLMANN, M., HEINEMANN, S. & KONNERTH, A. (1992). Calcium influx trough subunits GluR1/GluR3 of kainate/AMPA receptor channels is regulated by cAMP dependent protein kinase.*The EMBO Journal* **11**, 891-96.

KLAPSTEIN, GJ., VIETLA, S., LIEBERMAN, DN., GRAY, PA., AIRAKSINEN, MS., THOENEN, H., MEYER, M. & MODY, I. (1998). Calbindin-D28 fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: evidence from calbindin-D28k knockout mice. *Neuroscience* **85**(2), 361-373.

KLINGAUF, J. & NEHER, E. (1997). Modelling buffered Ca^{2+} diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophysical Journal* **72**, 674-690.

KLIVENYI P., FERRANTE R.J., MATTHEWS R.T., BOGDANOV M.B., KLEIN A.M., ANDREASSEN O.A., MUELLER G., WERMER M., KADDURAH-DAOUK R., BEAL M.F. (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine* **5**(**3**), 347 – 350.

KONG, J. & XU, Z. (1998). Massive mitochrondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD-1. *Journal of Neuroscience* **18**, 3241-50.

KONNERTH, A., KELLER, B. U., & LEV TOV, A. (1990). Patch clamp analysis of excitatory synapses in mammalian spinal cord slices. *Pflüglers Archiv* **417**, 285-90.

KRETSINGER, R. H. (1981). Mechanisms of selective signalling by calcium. *Neuroscience* **19**, 213-328.

KRIEGER, C., JONES, K., KIM, S. U. & EISEN, A. A. (1994). The role of intracellular free calcium in motor neuron disease. *Journal of the Neurological Sciences* **124**, 27-32.

KRIEGER, C., LANIUS, R. A., PELECH, S. L. & SHAW, C. A. (1996). Amyotrophic lateral sclerosis: the involvement of intracellular Ca^{2+} and protein kinase C. *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 114-120.

KRINKS M. H., KLEE, C. B., PANT, H. C. & GAINER, H. (1988). Identification and quantification of calcium-binding proteins in squid axoplasm. Journal of Neuroscience **8**, 2172-82.

LADEWIG, T. & KELLER, B. U. (2000). Simultaneous patch-clamp recording and calcium imaging in a rhythmically active neuronal network in the brainstem slice preperation from mouse. *Pflügers Archiv* **440**, 322-32.

LIPS, M.B. & KELLER, B.U. (1998). Endogenous calcium buffering in motoneurones of the nucleus hypoglossus from mouse. *Journal of Physiology* **511**, 105-117.

LIPS, M. B. & KELLER, B. U. (1999). Activity-Related Calcium Dynamics in Motoneurons of the Nucleus Hypoglossus From Mouse. *Journal of Neurophysiology* **82**(6), 2936-2946.

LIU, G. & TSIEN, R. W. (1995). Properties of synaptic transmission at single hippocampal synaptic boutons. *Nature* **375**, 404-408.

LLANO, I., MARTY, A., ARMSTRONG, C. M. & KONNERTH, A. (1991). Synaptic- and agonist- induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *Journal of Physiology London* **434**, 183-213.

LOWE, A. A. (1980). The neuronal regulation of tongue movements. *Progress in Neurobiology* **15**, 295-344.

MAYER, M. L. & WESTBROOK, G. L. (1987). The physiology excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in Neurobiology* **28**, 197-276.

MCBURNEY, R. N. & NEERING, I. R. (1987). Neuronal calcium homeostasis. *Trends in Neuroscience* **10**, 164-169.

MCCLESKY, E. W. (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Current Opinion of Neurobiology* **4**, 304-312.

MCMAHON, A., WONG, B. S., IACOPINO, A. M., NG, M. C., CHI, S. & GERMAN, D. C. (1998). Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Molecular Brain Research* **54**, 56-63.

MEDINA, L., FIGUEREDO-CRDENAS, G., ROTHSTEIN, J. D. & REINER, A. (1996) Differential abundance of glutamate transporter subtypes in amyotrophic lateral scleroses (ALS)-vulnurable versus ALS-resistant brain stem motor cell groups. *Experimental Neurology* 142, 287-295.

MELDRUM, B. & GARTHWAITE, J. (1990). Exciatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **11**, 379-387.

MONAGHAN, D. T., BRIDGES, R. J. & COTMAN, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *ANNUAL REVIEW PHARMACOL. TOXICOL.* **29**, 365-402.

MONYER, H., SPRENGEL, R., SCHOEPFER, R., HERB, A., HIGUCHI, M., LOMELI, H., BURNASHEV, N., SAKMANN, B. & SEEBURG, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-21.

MONYER, H., BURNASHEV, N., LAURIE, D. J., SAKMANN, B. & SEEBURG, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-540.

MORIYOSHI, K., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N. & NAKANISHI, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31-37.

MORRISON, B. M., GORDON, M. E., RIPPS, J. H. & MORRISON, J. H. (1996). Quantitative immunocytochemical analysis of the spinal cord in G83R superoxide dismutase transgenic mice: neurochemical correlates of selective vulnerability. *J. Comp. Neurol.* **373**, 619-631.

MORRISON, B. M. & MORRISON, J. H. (1998). Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration. *Brain Research Reviews* **29**, 121-135.

MOOSBACHER, J., SCHOEPFER, R., MONYER, H., BURNASHEV, N., SEEBURG, P. H. & RUPPERSBERG, J. P.(1994). A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamte receptors. Science **266**, 1059-62.

NAKANISHI, S. (1992). Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. *Science* **258**, 597-603.

NÄGERL, U. V. & MODY, I. (1998). Calcium-dependent inactivation of high-threshold calcium currents in human dentate gyrus granule cells. *Journal of Physiology (London)* **509**, 39-45.

NEHER, E. (1986). Concentration profiles of intracellular Calcium in the presence of a diffusable chelator. *Experimental Brain Research*, Series **14**, 80-96.

NEHER, E. & AUGUSTINE, G. J. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* **450**, 273-301.

NEHER, E. (1995). The use of fura-2 for estimating Ca^{2+} buffers and Ca^{2+} fluxes. *Neuropharmacology* **34**, 1423-1442.

NEHER, E. (1998). Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca^{++} signals. *Cell Calcium* **24**, 345-57.

NIHEI, K., MCKEE, AC., KOWALL, NW. (1993). Patterns of neuronal degeneration in the motor cortex of amyotrphic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathology (Berl)* **86**(1), 55-64.

NOWAK, L., BREGESTOVSKI, P., ASCHER, P., HERBET, A. & PROCHNIANTS, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* **307**, 462-465.

O' BRIEN, J. A., ISAACSON, J. S. & BERGER, A. J. (1997). NMDA and non-NMDA receptors are co-localised at excitatory synapses of rat hypoglossal motoneurones. *Neuroscience Letters* **227**, 5-8.

PAARMANN, I., FRERMANN, D., KELLER, B. U. & HOLLMANN, M. (2000). Expression of 15 Glutamate Receptor Subunits and Various Splice Variants in Tissue Slices and Single Neurons of Brainstem Nuclei and Potential Functional Implications. *Journal of Neurochemistry* **74(4)**, 1335-.45.

PALECEK, J., LIPS, M. B. & KELLER, B. U. (1999). Calcium dynamics and buffering in motoneurones of the mouse spinal cord. *Journal of Physiology* **520**(2), 485-502.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO D. E., GORTER, J. A., BENNETT, M. V. L. & ZUKIN, R. S. (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* **20**, 464-470.

PLATNEAU, D. K. & MAYER, M. L. (1990). Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Journal of Neuroscience* **10**, 2385-2399.

REINER, A., MEDINA, L., FIGUEREDO, C. G. & ANFINSON, S. (1995). Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Experimental Neurology* **131**, 239-250.

ROBERTS, W. M. (1994). Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells. *Journal of Neuroscience* **14**, 3246-3262.

ROTHSTEIN, J. D., MARTIN, L. J. & KUNCL, R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine* **326**, 1464-1468.

ROTHSTEIN, J. D. & KUNCL, R. W. (1995a). Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *Journal of Neurochemistry* **65**, 643-651.

ROTHSTEIN, J. D., KAMMEN, M. VAN., LEVEY, A. I., MARTIN, L. J. & KUNCL, R. W., (1995b). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Neurology* **38**, 73-84.

ROY, J. MINOTTI, S., DONG, L., FIGLEWICZ, D.D. & DURHAM, H.D. (1998). Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn - superoxide dismutase in motor neurones by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *Journal of Neuroscience* **18**(23), 9673-84.

SCHNEGGENBURGER, R., ZHOU, Z., KONNERTH, A., NEHER, E. (1993). Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* **11(1)**, 133-143.

SHAW, PJ. & INCE, PG. (1997). Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology* **244**, 3-14.

SHAW, PJ., WILLIAMS, TL., SLADE, JY., EGGETT, EY. & INCE, PG. (1999). Low expression of GluR2 Ampa receptor subunit protein by human motor neurons. *Neuroreport* **10**(2), 261-65.

SIDDIQUE, T. & DENG, H. X. (1996). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1465-70.

SIKLOS, L., ENGELHARDT, GI., ALEXIANU, ME., SIDDIQUE, T., APPEL, SH. (1998). Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **57**(6), 571-87.

SMITH, J. C., ELLENBERGER, H. H., BALLANYI, K., RICHTER, D. W. & FELDMANN, J. L. (1991). Pre Bötzinger complex: a brain region that may generate respiratory rythm in mammals. *Science* **254**, 726-729.

SMITH, R. G., HAMILTON, S., HOFMANN, F., SCHNEIDER, T., NASTAINCZYK, W., BIRNBAUMER, L., STEFANI, E. & APPEL, S. H. (1992). Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic laterale sclerosis. *New England Journal of medicine* **327**, 1721-1728.

SNUTCH, T. P. & REINER, P. B. (1992). Ca^{2+} channels: diversity of form and function. *Current Opinion of Neurobiology* **2**, 247-253.

SPRUSTON, N., JAFFE, D. B. & JOHNSTON, D. (1994). Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends in Neuroscience* **17**, 161-66.

SUGIHARA, H., MORIYOSHI, K., ISHII, T., MASU, M. & NAKANISHI, S. (1992). Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 826-832.

TEMPIA, F., KANO, M., SCHNEGGENBURGER, R., SCHIRRA, C., GARASCHUK, O., PLANT, T. & KONNERTH, A. (1996). Fractional Calcium Current trough Neuronal AMPA-Receptor Channels with a Low Calcium Permeability. *The Journal of Neuroscience* **16(2)**, 456-466.

TITZ, S. & KELLER, B. U. (1997). Rapidly deactivating AMPA receptors determine excitatory synaptic transmission to interneurons in the nucleus tractus solitarius from rat. *The American Journal of Neurophysiology* **78**, 82-91.

TROOST, D., SILLEVIS SMITT, P. A. E., DE JONG, J. & SWAAB, D. F. (1992). Neurofilament and glial alterations in the cerebral cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathology* **84**, 664-673.

TROTTI, D., ROLFS, A., DANBOLT, NC., BROWN, RH JR. & HEDIGER, MA. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nature Neuroscience* **2**(**5**), 427-433.

TSIEN, R. W. & PHOENIE, M. (1986). Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. *Trends in Biochemical Sciences* **11**, 450-455.

TU, P. H., RAJU, O., ROBINSON, K. A. GURNEY, M. E., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, M. Y. (1996). Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 3155-3160.

TYMIANSKI, M., CHARLTON, M. P., CARLEN, P. L., TATOR & C. H. (1994). Properties of neuroprotective cell-permeant Ca2+ chelators: effects on [Ca2+]i and glutamate neurotoxicity in vitro. *Journal of Neurophysiology* **72**, 1973-1992.

UMEMIYA, M. & BERGER, A. J. (1994). Properties and function of low- and high- voltageactivated Ca²⁺ channels in hypoglossal motoneurons. Journal of *Neuroscience* **14**, 5652-5660.

UMEMIYA, M., SENDA, M. & MURPHY, H. (1999). Behaviour of NMDA and AMPA receptor-mediated miniature EPSCs at rat cortical neuron synapses identified by calcium imaging. *Journal of Physiology* **521.1**, 113-122.

VICINI, S., WANG, J. F., LI, J. H., ZHU, W. J., WANG, Y, H., LOU, H., WOLFE, B. B. & GRAYSON, D. R. (1998). Functional and Pharmacological Differences Between Recombinant N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Journal of Neurophysiology* **79**(2), 555-66.

WALKER, D. & DE WAARD, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels: role in channel function. *Trends in Neurological Sciences* **21**, 148-154.

WALLING, A. D. (1999). Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease. Am Fam Physician 15;59(6), 1489-96.

WASICKY, R., ZIYA-GHAZVINI, F., BLUMER, R., LUKAS, J. R. & MAYER, R. (2000). Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. *Investigate Ophthalmology and visual sciences* **41**(**5**), 980-90.

WATANABE, M., INOUE, Y., SAKIMURA, K. & MISHINA, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport* **3**, 1138-1140.

WATANABE, M., MASAYOSHI, M. & INOUE, Y. (1994). Distinct Distribution of Five NMDA Receptor Channel Subunit mRNAs in the Brainstem. *The Journal of comparative Neurology* **343**, 520-531.

WEIGAND, E. & KELLER, B. U. (1998). Functional diversity of synaptic AMPA/KA receptors from rat as revealed by subtype specific antagonists. *European Journal of Neuroscience* **10**, 64-70.

WILLIAMS, T. L., DAY, N. C., INCE, P. G., KAMBOJ, R. K. & SHAW, P. J. (1997). Calcium permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl–4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annul Neurology* **42**, 200-207.

WILLIAMSON, T. L., BRUIJN, L. I., ZHU, Q., ANDERSON, K. L., ANDERSON, S. D., JULIEN, J. & CLEVELAND, D. W., (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 9631-9636.

YAMAMOTO, H. & KANAIDE, H. (1990). Release of intracellularly stored Ca2+ by inositol 1,4,5-triphosphat - an overview. *Gen. Pharmacol.* **21**(**4**), 387-393.

ZHAO, M., HOLLINGWORTH, S. & BAYLOR, S. M. (1996). Properties of tri- and tetracarboxylate Ca^{2+} indicators in frog sceletal muscle fibers. *Biophysical Journal* **70**, 896-916.

ZHOU, Z. & NEHER, E. (1993). Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal cells. *Journal of Physiology* **469**, 245-273.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Bernhard Keller vom II. Physiologischen Institut der Georg-August-Universität Göttingen dafür danken, daß er mir ermöglichte an dem interessanten Thema zu arbeiten. Seine freundliche Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft haben viel zum gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Innerhalb der Arbeitsgruppe danke ich Dr. Mario Lips und Dr. Detlev Frermann für ihre stete Hilfsbereitschaft. Für die gute Stimmung im Labor bedanke ich mich bei Thomas Ladewig, Dagmar Wachtmann und Julia Fuchs.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Mirjam Haller, die mich bei Problemen im mathematisch/physikalischen Bereich unterstützt hat.

Zudem standen mir Herr H. Schultens, Herr Dr. S. Hülsmann sowie Frau B. Ritter unter anderem bei computerbedingten Problemen zur Seite, auch hier bedanke ich mich.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. R. Hustert vom Institut für Zoologie und Anthropologie für sein meiner Arbeit entgegengebrachtes Interesse und seine Bereitschaft diese vor der Biologischen Fakultät zu vertreten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Prof. F. W. Schürmann bedanken.

Ich danke meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung besonders herzlich.

LEBENSLAUF

Name:	Vanselow	
Vornamen:	Bodo Karsten	
Geburtsdatum:	20.10.1969	
Geburtsort:	Minden (Westfalen)	
Eltern:	Hubert Vanselow Ursula Vanselow geb. Schreck	
Schulbildung:	1976 - 1980	Bierpohlgrundschule Minden
	1980 - 1989	Besselgymnasium Minden
	19. 05. 1989	Allgemeine Hochschulreife
Grundwehrdienst:	1989 - 1990	in Achim bei Bremen
Studium:	WS1990/1991	Biologie & Deutsch (LAG), Universität Osnabrück
	SS1991 – WS96/97	Studium der Biologie in Osnabrück
	27. 11. 1992	Vordiplom in Biologie
	17. 12. 1996	Diplom in Biologie
seit Mai 1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie	
	und Pathophysiologie der Georg-August-Universität zu	
	Göttingen	