

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie I  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-C. Pape

**Untersuchungen zum neurotoxischen Potenzial  
umweltrelevanter organischer Arsenverbindungen:  
Wirkung auf neuronale Glutamat-Rezeptoren**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Gruner, Janina Melanie  
aus Bielefeld

im Jahr 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Mußhoff
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. U. Witting

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie I  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-C.-Pape  
Referent: Prof. Dr. U. Mußhoff  
Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. U. Witting

### **Zusammenfassung**

Janina Melanie Gruner

Untersuchungen zum neurotoxischen Potenzial umweltrelevanter organischer  
Arsenverbindungen: Wirkung auf neuronale Glutamat-Rezeptoren

Die vorliegende Arbeit ist Teil des interdisziplinären DFG-Forschungsprojekts „Metall(oid)organische Verbindungen in der Umwelt“. Untersucht wurde das neurotoxische Potenzial organischer Arsenverbindungen. Im Vergleich zu der anorganischen Arsenigen Säure wurden zwei organische Arsenverbindungen unterschiedlichen Methylierungsgrades (Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure), die als Metabolite im Urin arsenkontaminierter Personen nachweisbar sind, analysiert. Die neurotoxische Wirkung dieser Verbindungen wurde anhand der Beeinflussung von Glutamat-Rezeptorkanälen (NMDA- und AMPA-Rezeptorkanäle, sowie metabotrope Glutamatrezeptoren), die entscheidend für die neuronale Informationsverarbeitung sind, überprüft. Die Versuche erfolgten in vitro durch elektrophysiologische Messungen an *Xenopus* Oozyten, in denen neuronale Glutamat-Rezeptorkanäle zur Ausbildung gebracht wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten organischen Arsenverbindungen, substanzspezifische und rezeptorspezifische Effekte an den Glutamat-Rezeptorkanälen auslösten. Dabei konnten sowohl Induktion als auch Blockierung der Ionenströme nach Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden. Besonders die Verstärkung der NMDA-induzierten Ionenströme durch Applikation von Monomethylarsonsäure kann für die Entstehung vieler pathologischer Prozesse im Gehirn mit verantwortlich sein. Die Applikation von Arseniger Säure hingegen führte zu keinen signifikanten Effekten.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2005

# Inhalt

	Seite
<b>1 Einleitung</b> .....	2-15
1.1 Definition der Neurotoxizität	2-3
1.2 Ursprung und Toxizität metallorganischer Verbindungen	4-6
1.3 Arsenverbindungen	6-9
1.4 Dysfunktion von neuronalen Rezeptorkanälen als Ursache von Neurotoxizität	9-14
1.5 Fragestellung	14-15
<b>2. Methodik</b> .....	16-36
2.1 Das Untersuchungsmodell	16-25
2.2 Elektrophysiologische Untersuchungstechnik	26-29
2.3 Versuchsprotokolle	29-36
<b>3. Ergebnisse</b> .....	37-98
3.1 Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen der Glutamat-Rezeptorkanäle	37-43
3.2 Kontrollversuche	44-54
3.3 Wirkung von Arsenverbindungen auf die bioelektrischen Eigenschaften von Xenopus Oozyten	55-58
3.4 Wirkung von Arseniger Säure (iA <sup>III</sup> )	59-71
3.5 Wirkung von Monomethylarsonsäure (MMA <sup>V</sup> )	72-83
3.6 Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA <sup>V</sup> )	84-98
<b>4. Diskussion</b> .....	99-115
4.1 Diskussion des methodischen Vorgehens	99-104
4.2 Interpretation der erhobenen Ergebnisse	104-110
4.3 Neurotoxikologie der untersuchten Arsenverbindungen und Glutamat-Rezeptorkanäle als Angriffsort neurotoxischer Substanzen	111-114
4.4 Ausblick	114-115
<b>Abkürzungen</b> .....	116
<b>Literatur</b> .....	117-130
<b>Dank</b> .....	131
<b>Lebenslauf</b> .....	132

# **1 Einleitung**

## **1.1 Definition der Neurotoxizität**

Unter Neurotoxizität versteht man die Schädigung von Nervengewebe durch chemische Stoffe. Es kommt zur Störung komplex vernetzter Nervenzell- und Gliazellverbände und damit zu Störungen in peripheren oder zentralen Teilbereichen des Nervensystems. Schäden der Gliazellen des Nervengewebes führen indirekt zu Neurotoxizität, zum Beispiel durch Veränderungen der Extrazellulärflüssigkeit, eine direkte Neurotoxizität entsteht durch Schädigung der Nervenzellen. Substanzen, die Nervengewebe schädigen, werden als Neurotoxine bezeichnet. Neurotoxine können die Zelle funktionell stören, z.B. durch Beeinflussung von Ionenkanälen und/oder strukturell verändern, z.B. durch Änderung der Zellmorphologie. Beide Arten von Schädigung können die Zellaktivität und Zellvitalität derart beeinflussen, dass schließlich der Zelltod erfolgt. Neben den zahlreichen in der Umwelt vorkommenden, exogenen Neurotoxinen wie z.B. Halogenkohlenwasserstoffe, Dioxine, Chlorphenole, Schwermetalle gibt es auch viele vom Körper produzierte, potenziell neurotoxische Substanzen, die nur dann zu keiner Schädigung des Nervensystems führen, wenn Abbau-, Umbau- und Eliminationsprozesse im Organismus geregelt ablaufen. Im Falle der Hepatischen Enzephalopathie kann die Leber auf Grund von Parenchymverlust, Substanzen wie Ammoniak, Phenole,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) u.a. nicht mehr ausreichend aus dem Blut retinieren. Durch die Akkumulation dieser Stoffe im Blut kommt es auch zu einer Anreicherung dieser Stoffteilchen im Gehirngewebe. Das Nervengewebe kann dadurch so gestört werden, dass das klinische Bild des hepatischen Kommas entsteht.

### *1.1.2 Neurotoxizität von Schwermetallen*

Vergiftungen mit anorganischen Metallen sind häufig Ursache neurologischer Störungen. So führt **Blei** zu einer Verzögerung der Nervenleitgeschwindigkeit peripherer Nerven bis zur Unterbrechung der Nervenleitung mit Ausfallserscheinungen im entsprechenden Versorgungsgebiet des Nervens (vergl. Adams et al., 2000; Binding et al., 1992). Weiterhin treten Enzephalopathie und Demenz bei Blei-exponierten Erwachsenen auf, sowie Entwicklungsverzögerungen bei Kindern mit chronischer Bleivergiftung (Needleman et al., 1979; Needleman und Bellinger 1991; Pocock et al., 1994). Andere Neurotoxine unter den Metallen sind z.B. **Quecksilber**, das Konzentrationsschwäche, Schlaflosigkeit und diffuse motorische Störungen verursacht. Für **anorganisches Arsen** sind Ausfälle im sensorischen Bereich, z.B. schmerzhafte Parästhesien und Taubheitsgefühl in den Extremitäten beschrieben worden (z.B. Mazumder et al., 1992; Luong und Nguyen, 1999). Die Pathomechanismen, die zu diesen Symptomen führen, sind dabei häufig unklar. Hinweise auf die Ursache eines neurologischen Symptomkomplexes nach Intoxikation von Schwermetallen sind die Ausnahme. Für einige neurotoxisch wirksame Metallsubstanzen konnte ein Angriff an Ionenkanälen von Nervenzellen gezeigt werden. Zum Beispiel reduziert Blei den Kalium-Strom über spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle (Madeja et al., 1995b) und beeinflusst vor allem auch die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle (z.B. Büsselberg et al., 1991). Des weiteren blockiert Blei NMDA-Rezeptorkanäle (Alkondon et al., 1990; Uteshev et al., 1993) und AMPA-Rezeptorkanäle (Mußhoff et al., 1995).

## 1.2 Ursprung und Toxizität metallorganischer Verbindungen

### *1.2.1 Anthropogener und biogener Ursprung metallorganischer Verbindungen*

Metallorganische Verbindungen anthropogenen Ursprungs entstehen u.a. bei verschiedenen industriellen Produktionen. Dabei enthalten viele Produkte metallorganische Verbindungen, vom früher verwendeten „verbleiten“ Benzin bis zu aktuellen Zusätzen in Pestiziden, Farben, Holzimprägnierungen und in PVC (vergl. Thayer 1995; Appel et al., 2000). Der Abbau vieler dieser Verbindungen dauert in der Regel Jahrzehnte. Daher findet man oftmals in Erdablagerungen metallorganische Altlasten, die manchmal noch auf den Einsatz von Giftgasen (z.B. Diphenylaminchlorarsen) und chemischen Kampfstoffen aus den zwei Weltkriegen zurückzuführen sind (vergl. Thayer, 1995). Schon geringe Veränderungen von Zusammensetzung und Schichtung des Bodens, z.B. nach starken Regenfällen, können die Verbindungen aus den Sedimenten freisetzen. Ein Beispiel ist die Flutkatastrophe im Mitteldeutschen Raum im August 2002. Dabei wurde erodierte Ackererde und Flussschlamm in Wohngebiete geschwemmt und kontaminierte die Siedlungen mit unzähligen Schadstoffen (vergl. Umwelt Forschungszentrum, 2002; Greenpeace 2002).

Metallorganische Verbindungen biogenen Ursprungs entstehen bei Stoffwechselprodukten in Mikroorganismen. Dieser Prozess wird im allgemeinen als Biomethylierung bezeichnet. Algen, Pilzen und Bakterien kommt dabei eine besonders große Bedeutung zu. Gute Bedingungen für Biomethylierung finden sich in Klärwerken und Mülldeponien (Hirner et al., 1994; Feldmann und Hirner, 1995). Die Methylierung der Metalle läuft enzymatisch in Anwesenheit eines Methylgruppendonators ab (vergl. Choi und Bartha, 1993; Thayer, 1995; Pongratz und Heumann, 1998; Turpeinen et al., 1999; Craig et al., 1999). Die entstandenen metallorganischen Verbindungen werden dabei von den Mikroorganismen entweder wieder an die Umwelt abgegeben oder im Organismus gespeichert.



### *1.2.2 Toxizität metallorganischer Verbindungen*

Die organischen Metallverbindungen werden aufgrund ihrer Lipophilie besser von Haut und Schleimhaut höher entwickelter Lebewesen resorbiert als die entsprechenden anorganischen Verbindungen. Im Organismus werden die so aufgenommenen metallorganischen Verbindungen zu monovalenten Kationen umgewandelt. Diese Umwandlung beeinflusst die Toxikokinetik, da monovalente Kationen sowohl in polarer als auch in unpolarer Materie löslich sind. Biologische Membranen können auf diese Weise leicht überwunden werden. Intrazellulär können die Schwermetallkationen Schwefel-, Stickstoff- und Sauerstoffliganden an aktiven Zentren von Enzymen wie Cytochrom p450 und Proteinen wie Hämoglobin blockieren (Craig, 1986; Cheung und Verity, 1985; Denny et al., 1993; Komulainen et al., 1995). Weiterhin konnten Störungen der Proteinbiosynthese, Schäden an der DNA und Störungen des Immunsystems nachgewiesen werden (Cheung und Verity, 1985; Kutznetsov und Richter, 1987).

### *1.2.3 Neurotoxizität von metallorganischen Verbindungen*

Das in vielen Fällen hohe neurotoxische Potenzial metallorganischer Verbindungen erklärt sich wahrscheinlich aus dem leichteren Überwinden der Blut-Hirnschranke, wegen der erwähnten Lipophilie dieser Substanzen (Craig, 1986). Die klinischen Zeichen einer zentralnervösen Störung reichen von Beeinträchtigung der Motorik, Sensibilität und Sensorik über vegetative Störungen (Schwindel, Übelkeit, Erbrechen), Bewusstseinsverlust, epileptische Anfälle bis hin zum Entstehen von Psychosen (Witting et al., 1997). Eine gut untersuchte metallorganische Verbindung ist das Methylquecksilberchlorid. Ende der 1950er kam es in der japanischen Küstenstadt Minamata Bay zu einer epidemischen Vergiftung mit Methylquecksilberchlorid durch entsprechend kontaminierten Fisch. Die Betroffenen litten an Seh- und Hörstörungen, Ataxien, Tremor, Parästhesien, emotionalen Veränderungen und Psychosen (Takeuchi, 1968 und 1982). Einige Ausfälle waren dabei irreversibel. Nachfolgende Untersuchungen

zur Klärung des Pathomechanismus zeigten Läsionen im Bereich des visuellen Kortex, im Kleinhirn und im Spinalganglion der Radices dorsales (Takeuchi, 1982). Angriffsorte des Methylquecksilberchlorids stellen u.a. ligandengesteuerte Ionenkanäle, sogenannte Rezeptorkanäle, von Nervenzellen dar. Im Hippocampus konnte eine gehemmte Erregungsübertragung an GABA-Rezeptorkanälen nachgewiesen werden (Yuan und Atchison, 1997). Neben dem bekannten Methylquecksilberchlorid sind weitere potenziell neurotoxische metallorganische Verbindungen bekannt. Zu diesen zählen u.a. Zinn, Blei und Arsen. Nach Trimethylzinn-Exposition wurden u.a. Gedächtnisstörungen, Störungen der kognitiven Fähigkeiten und epileptische Anfälle beobachtet (Feldmann et al., 1993). Für diese Verbindungen wie auch für andere potenziell neurotoxisch wirksame metallorganische Substanzen konnte wegen der Komplexität der Hirnstrukturen und der vielen möglichen Angriffspunkte im ZNS der Pathomechanismus bisher nicht restlos aufgeklärt werden, für einige Substanzen ist er sogar noch gänzlich unbekannt. Zu diesen Substanzen gehören die metallorganischen Arsenverbindungen.

### **1.3 Arsenverbindungen**

#### *1.3.1 Anorganisches Arsen: Entstehung und Vorkommen*

Anorganische Arsenverbindungen entstehen anthropogen u.a. als Nebenprodukt beim Schmelzprozess und der Legierung von Kupfer und Blei. Sie finden in der industriellen Produktion eine breite Anwendung, z.B. als Zusatz in Pestiziden, bei der Herstellung von Halbleitern, Glas und Farbpigmenten (Hathaway et al., 1991). Außerdem kommen Arsenverbindungen geogen in zahlreichen Mineralien wie Erz, Arsenopyrit u.a. vor (Hindmarsh, 1986; WHO, 1981; Nadakavukaren et al., 1984). Wenn das Gestein verwittert, kann das Arsen freigesetzt werden (Boyle u. Jonasson, 1973).

### *1.3.2 Toxizität anorganischer Arsenverbindungen*

Bei akuten Vergiftungen mit anorganischem Arsen werden neben gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhoe und Emesis auch Muskelschmerzen und Muskelkrämpfe, Schwäche, Taubheit der Extremitäten und Flushs beobachtet. Nach etwa einem Monat können brennende Parästhesien, palmoplantare Hyperkeratosen und Verlangsamungen im motorischen und sensorischen Bereich auftreten (Murphy et al., 1981; Wesbey und Kunis, 1981; Fennell und Stacy, 1981). Zeichen einer chronischen Arsenexposition sind neben Hautläsionen und Krebs (vor allem Haut-, Lungen-, Leber-, Nieren- und Blasenkrebs; Tseng, 1977; Bates et al., 1992; Chen, 1992) periphere Neuropathien und periphere vaskuläre Erkrankungen („blackfoot disease“; Chen et al., 1992; Smith et al., 1998; U.S. Environmental Protection Agency, 1988).

### *1.3.3 Neurotoxizität anorganischer Arsenverbindungen*

Neurotoxische Zeichen nach Vergiftung mit anorganischem Arsen fand man z.B. in Kalkutta, wo nach chronischer Exposition (durch kontaminiertes Trinkwasser) periphere Neuropathien auftraten (Mazumder et al., 1992). Taubheitsgefühl, Parästhesien in den Fingerspitzen und Füßen und verminderte Muskelkraft schilderten Patienten nach häufigem Verzehr von Suppe aus arsenverschmutzten Vogelnestern (Luong und Nguyen, 1999). In einer Studie aus China wird das Auftreten von Gehörlosigkeit, Verlust des Geschmackssinnes, Halluzinationen und Taubheit der Extremitäten nach Arsenintoxikation beschrieben. Bei nachfolgenden in vitro Experimenten wurde Apoptose in Nervenzellen nach Applikation von anorganischem Arsen beobachtet (Namgung und Xia, 2000; Chattopadhyay et al., 2002). Der genaue Pathomechanismus, der diesen Veränderungen nach Arsenexposition zu Grunde liegt, ist allerdings nicht geklärt.

#### *1.3.4 Organische Arsenverbindungen: Entstehung und Vorkommen*

Organische Arsenverbindungen sind in großem Maße anthropogenen Ursprungs. Sie finden Verwendung als Zusatz in Holzschutzmitteln und Bioziden, als Kraftstoffadditive und als Stabilisatoren in Kunststoffen (z.B. Thayer, 1995; Broome et al., 1988; Appel et al., 2000).

Bei der biogenen Entstehung von organischen Arsenverbindungen aus anorganischem Arsen spielt die Biomethylierung eine wichtige Rolle. McBride und Wolfe dokumentierten 1971 zum ersten Mal die bakterielle Methylierung von Arsen. Aus dem Methanobacterium Stamm MoH extrahierten sie Dimethylarsenhydrid. Seither sind viele Mikroorganismen entdeckt worden, die anorganisches Arsen methylieren. Bekannte Pilzkulturen, die Arsen unter aeroben Bedingungen methylieren sind u.a. *Scopulariopsis brevicaulis* (Challenger, 1945) und *Candida humicola*. Gut erforscht sind die Methylierungsprozesse in Algen (Klumpp u. Peterson, 1981; Francesconi u. Edmonds, 1997). Auch Fische und Säugetiere methylieren anorganische Arsenverbindungen (vergl. Kuroiwa et al., 1994; Vahter, 1981). Endprodukte der Methylierung von anorganischem Arsen sind in den meisten Fällen Monomethylarsensäure, Dimethylarsinsäure und/oder Trimethylarsen (Mozier, 1990; Vahter, 1993). Beim Menschen sind Thiole wie Glutathion am Methylierungsprozeß beteiligt (z.B. Thayer, 1995). Dabei wird das anorganische Arsen aus dem Gastro-Intestinaltrakt oder aus der Atemluft über die Alveolen resorbiert und in der Leber methyliert. Das häufigste Endprodukt nach Aufnahme von anorganischem Arsen ist im Menschen Dimethylarsinsäure, welche im Urin ausgeschieden wird (Hoppenhayn-Rich et al., 1993 und 1996). Neben der teilweise hohen Belastung der Nahrungsmittel, z.B. Dimethylarsinsäure in Fisch und Algen (Shiomi et al., 1992), stellt die Kontamination von Grund- und Trinkwasser ein großes Problem dar. 1993 wurden in Bangladesh zum ersten Mal hohe Arsenkonzentrationen in Trinkwasserbrunnen festgestellt. Bis heute ist es nicht gelungen, die erhebliche Exposition von etwa 20 Millionen Menschen in Bangladesh zu beseitigt (Smith et al., 2000).

### *1.3.5 Toxizität organischer Arsenverbindungen*

Die Methylierung von anorganischem Arsen wird in fast allen lebenden Organismen beobachtet und ist bisher als Entgiftungsprozess allgemein akzeptiert (Goyer, 1996; Fischer et al., 1985; Vahter und Marafante, 1983). Neuere Experimente werfen jedoch die Frage auf, ob nicht auch die organischen Arsenverbindungen schädigenden Einfluß auf biologische Systeme nehmen (vergl. Styblo et al., 2000; Petrick et al., 2000; Vega et al., 2001). So wurde in vitro an humanen Hepatozyten die Zytotoxizität von anorganischen und organischen Arsenverbindungen vergleichend getestet. Die höchste Toxizität wies dabei das organische trivalente Monomethylarsen auf (Petrick et al., 2000). Welche der klinischen Erscheinungen nach Arsenintoxikation auf anorganische oder organische Arsenverbindungen zurück zuführen sind, kann kaum entschieden werden, da der Methylierungsprozess unmittelbar nach Arsenaufnahme beginnt

## **1.4 Dysfunktion von neuronalen Rezeptorkanälen als Ursache von Neurotoxizität**

### *1.4.1 Neuronale Ionenkanäle: Funktion*

Das Nervensystem hat die Aufgabe, Informationen aufzunehmen, zu verarbeiten und weiterzuleiten. Die Informationsverarbeitung erfolgt im Nervensystem zum größten Teil durch die Nervenzellen. In der Membran der Nervenzellen laufen dabei die Prozesse zur Entstehung, Änderung und Weitergabe bioelektrischer Aktivität ab. Durch Modulation der bioelektrischen Aktivität werden Informationen im Nervenzellverband kodiert weitergeleitet. Alle Prozesse der Veränderung von bioelektrischer Aktivität sind dabei direkt von Ionenkanälen abhängig. Ionenkanäle sind in der Zellmembran eingelagerte Proteine, durch die Ionen in die Zelle hinein und aus der Zelle heraus permeieren können. Durch ein unterschiedliches Konzentrationsverhältnis der Ionen im Intra- und Extrazellulärraum besteht schon im Ruhezustand eine elektrische Spannung an der

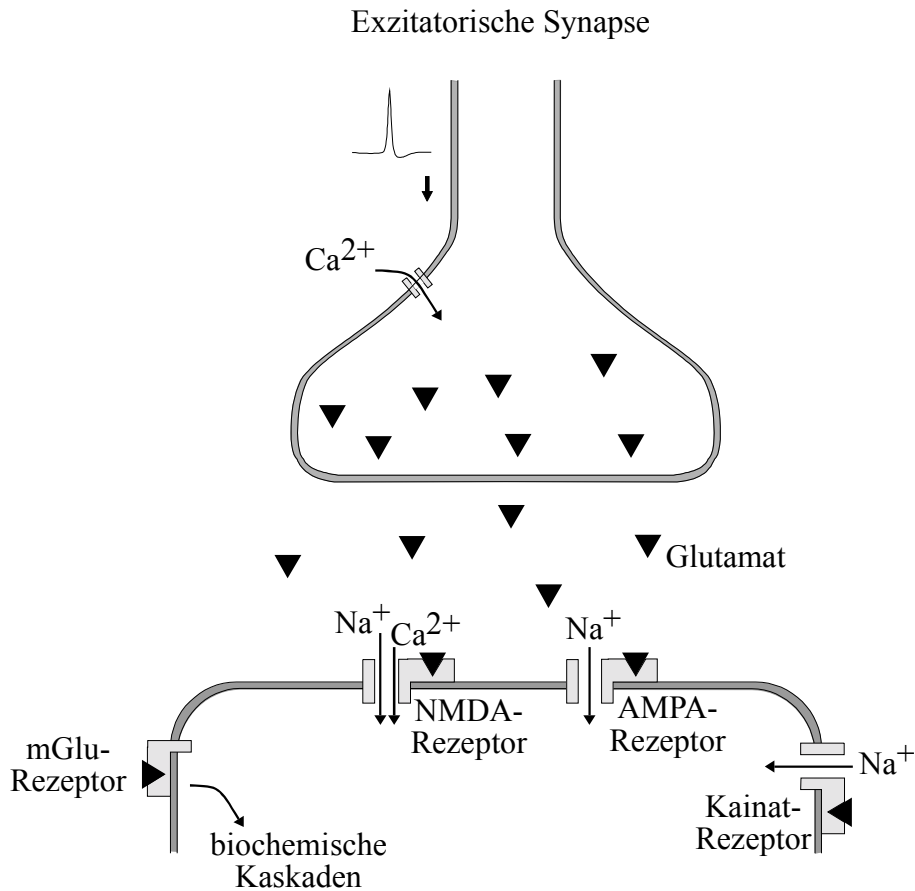
Nervenzellmembran, das sogenannte Membranpotenzial. Die Veränderung dieses Membranpotenzials dient als Signal einer kodierten Information. Die Ionenkanäle haben dabei die Funktion von Ventilen, die geöffnet oder geschlossen werden können, und so über die Regulation transmembraner Ionenströme das Membranpotenzial verändern. Die durch die Ionenkanalaktivität entstehenden Schwankungen des Membranpotenzials werden als neuronale Erregung oder Aktionspotenzial bezeichnet. Aktionspotenziale dienen der Weiterleitung einer Erregung entlang einer Nervenzelle. Sie werden erzeugt von spannungsgesteuerten Ionenkanälen. Diese öffnen sich, wenn sich das Membranpotenzial verringert. Sie sind selektiv permeabel für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Überleitung einer neuronalen Erregung von einer Nervenzelle auf eine zweite Nervenzelle geschieht durch eine chemische Erregungsübertragung. Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Ablauf: ein Aktionspotenzial ist am Nerven bis zum synaptischen Endknopf weitergeleitet worden. Durch die Verschiebung des Membranpotenzials öffnen sich u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Kalzium strömt in die Zelle ein und bewirkt eine Kaskade, an deren Ende der erregende (exzitatorische) Botenstoff Glutamat ausgeschüttet wird. Trifft Glutamat auf die Membran der nachfolgenden Nervenzelle, wird eine zweite Gruppe von Ionenkanälen aktiviert, die Rezeptorkanäle. Die Öffnung dieser Kanäle führt zum sogenannten postsynaptischen Potenzial und zur Auslösung eines Aktionspotenzials, wodurch das elektrische Signal der Information wieder hergestellt ist. Die Weitergabe von Informationen im Nervenzellverband ist dabei abhängig von der Funktion jeder einzelnen Nervenzelle, wobei die Ionenkanäle, wie oben ausgeführt, ein grundlegendes Element in der Informationsverarbeitung des Nervensystems darstellen (z.B. Speckmann, 1983)

#### *1.4.2 Neuronale Rezeptorkanäle: Einteilung*

Die ligandengesteuerten Rezeptorkanäle befinden sich in der postsynaptischen Membran; sie öffnen sich, wenn sich ein Ligand, z.B. Glutamat, an den Ionenkanal-Rezeptor bindet und diesen aktiviert. Die ligandengesteuerten Rezeptorkanäle werden weiter unterteilt in exzitatorische Glutamat- Rezeptorkanäle und inhibitorische Rezeptorkanäle ( $\gamma$ -Aminobuttersäure- Rezeptorkanäle; GABA). Exzitatorische Rezeptorkanäle wandeln ein chemisches Signal wieder in ein Aktionspotenzial um; die Zelle wird dabei depolarisiert. Die Aminosäure Glutamat ist hierbei der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Dementsprechend gibt es in der postsynaptischen Membran eine große Gruppe von Glutamat-Rezeptorkanälen: NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-, Kainat- und AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat)-Rezeptorkanäle sowie die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Übersicht in Abbildung 1.1).

#### *1.4.3 Physiologie und Bedeutung des AMPA-Rezeptorkanals*

Die durch die Agonisten Kainat und AMPA aktivierbaren AMPA-Rezeptorkanäle sind, anders als die NMDA-Rezeptorkanäle, direkt durch den erregenden Transmitter Glutamat aktivierbar. Dadurch bilden sie die erste Phase des postsynaptischen Potenzials. Nach ihrer Aktivierung sind die AMPA-Rezeptorkanäle permeabel für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ - Ionen. Der starke Einstrom von Natriumionen führt dabei zu einer Verringerung des Membranpotenzials (Depolarisation der Zelle). Diese Depolarisation macht es erst möglich, dass Glutamat auch an den NMDA-Rezeptorkanälen wirken kann. Den AMPA-Rezeptorkanälen kommt daher eine wesentliche Bedeutung für schnelle synaptische Übertragungen zu. Sie kommen an vielen erregenden Nervenzellen besonders im Neokortex und Hippocampus vor (z.B. Boulter et al., 1990; Keinänen et al., 1990).



**Abb. 1.1:** Übersicht über die Glutamat-Rezeptorkanäle vom NMDA, AMPA, Kainat und metabotropen Typ: Verteilung der Glutamat-Rezeptorkanäle an einer exzitatorischen Synapse. Dargestellt sind die Nettoströme über die geöffneten Rezeptorkanäle. NMDA: N-Methyl-D-Aspartat. AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat. mGluR: metabotroper Glutamatrezeptor.  $\text{Ca}^{2+}$ : Kalzium.  $\text{Na}^+$ : Natrium. Die NMDA- und AMPA-Rezeptorkanäle sind gehäuft an der subsynaptischen Membran lokalisiert, während der Kainat-Rezeptorkanal und der metabotrope Glutamatrezeptor eher am Rande der postsynaptischen Membran lokalisiert sind. Die schwarzen Dreiecke symbolisieren den exzitatorischen Transmitter Glutamat.



#### *1.4.4 Physiologie und Bedeutung des NMDA-Rezeptorkanals*

Der durch N-Methyl-D-Aspartat aktivierbare NMDA-Rezeptorkanal ist nach seiner Aktivierung permeabel für  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen. Das einströmende Kalzium hat dabei Signalcharakter und ist von großer Bedeutung für die Entstehung kognitiver Prozesse. Es werden Kaskaden in Gang gesetzt, die wichtige Funktionen in der Entstehung von Langzeitpotenzierung (**Long Term Potention**, LTP) und Langzeitdepressionen (**Long Term Depression**, LTD) erfüllen (Larkman und Jack, 1995). Eine Besonderheit dieses Ionenkanals ist der spannungsabhängige Magnesium-Block (Nowak et al., 1984), der unter physiologischen Bedingungen zu einer Unerregbarkeit des Rezeptors durch Glutamat führt. Erst bei Depolarisation der Zelle zu einem Membranpotenzial von etwa -30 mV, wird das Magnesiumion aus der Ionophore entfernt. Durch diesen Mechanismus entsteht ein positives Feedback: mit zunehmender Anzahl an offenen NMDA-Rezeptorkanälen nimmt auch die Depolarisation der Zelle zu, was zu weiteren Öffnungen von NMDA-Rezeptorkanälen führt. Der NMDA-Rezeptorkanal spielt eine wichtige Rolle für Lern- und Gedächtnisprozesse (Maren und Baudry, 1995; Asztely und Gustafsson, 1996), sowie für weitere kognitive Fähigkeiten. Allerdings besitzt der NMDA-Rezeptorkanal auch eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese vieler neurologischer und neurotoxischer Erkrankungen, wie z.B. zerebraler Insult, Demenz und Epilepsie. Durch Daueraktivierung der NMDA-Rezeptorkanäle konnte epileptische Aktivität induziert werden (Collins und Olney, 1982). Ethanol ist als potenter Antagonist dieses Rezeptorkanals bekannt. Die Symptome einer Alkoholintoxikation fassen daher gut die Ausfälle bei Blockade von NMDA-Rezeptorkanälen zusammen: Benommenheit, Stupor, Ataxie, Halluzinationen, reduzierte Schmerzempfindung, Störungen im visuellen, auditiven und propriozeptiven Bereich (Tsai et al., 1998; Fraser, 1996; Hargreaves und Cain, 1992; Löscher und Hönack 1991; Rogawski, 1992). Die NMDA-Rezeptorkanäle sind besonders in den Nervenzellen des Kortex und im Hippokampus lokalisiert (Monyer et al., 1994).

#### *1.4.5 Physiologie und Bedeutung des metabotropen Glutamatrezeptors*

Der metabotrope Glutamatrezeptor wird u.a. durch Quisqualat aktiviert. Hier handelt es sich nicht um einen Ionenkanal, sondern um eine Rezeptorstruktur. Die Bindung des Agonisten führt dann zur Aktivierung von G-Proteinen, welche verschiedene biochemische Kaskaden in der Zelle in Gang setzen. Durch diese metabolischen Zellprozesse kann die Erregbarkeit der Zellen langfristig moduliert werden. Der metabotrope Glutamatrezeptor ist an der Entwicklung von LTP und LTD beteiligt. Man findet diese Rezeptoren vor allem im Hippokampus und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Houmed et al., 1991).

### **1.5 Fragestellung**

Für viele Metalle ist eine neurotoxische Wirkung nachgewiesen. Die Pathogenese der neurologischen Symptomatik ist aber nur bei wenigen Substanzen geklärt. Auch nach Intoxikationen mit anorganischen und organischen Arsenverbindungen wurden neurologische Störungen beobachtet. Der genaue zelluläre Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wird das physiologische Verhalten der AMPA- und NMDA-Rezeptorkanäle und der metabotropen Glutamatrezeptoren unter dem Einfluß von organischen Arsenverbindungen (Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure, beide pentavalent) und trivalentem anorganischem Arsen getestet. Es soll damit geklärt werden, inwieweit ein neurotoxisches Potenzial über Glutamatrezeptoren von Arsenverbindungen vermittelt und über welche Mechanismen eine mögliche Toxizität entfaltet wird.

Nur durch Kenntnis des zu Grunde liegenden Wirkmechanismus ist die Pathogenese der krankhaften Veränderungen nach Intoxikation zu verstehen und eine adäquate Intervention möglich. Außerdem sollen die Untersuchungen dazu beitragen zu klären, ob die organischen Arsenverbindungen wirklich „engiftete“

Substanzen des anorganischen Arsens darstellen, oder ob sie auf Grund ihres organischen Substituenten nicht die eigentlich toxischere Wirkform sind.

## 2. Methodik

### 2.1 Das Untersuchungsmodell

Bereits in den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass das Expressionssystem der Oozyten von *Xenopus laevis* injizierte Fremd-mRNA zu translatieren vermag (Gurdon et al., 1971). Dabei waren die Oozyten in der Lage,  $\beta$ -Globulin-mRNA aus Säugetierzellen in die entsprechende Aminosäuresequenz zu überführen. Aufgrund der Größe der Oozyten, ihrer relativen Unempfindlichkeit gegenüber äußeren Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und mechanischer Belastung, ihrer leichten Handhabung und einfachen Kultivierung, etablierte sich dieses Expressionsmodell anschließend auch in der neurophysiologischen Forschung (Dascal, 1987; Snutch, 1988). Seit den ersten erfolgreichen Versuchen von Sumikawa et al., 1981 die in *Xenopus* Oozyten Nervengewebespezifische Proteine heterolog exprimierten, gelang es in der Folgezeit, viele membranassoziierte Proteine auf diese Weise in die Oozytenmembran zu integrieren. Dazu gehören unter anderem:

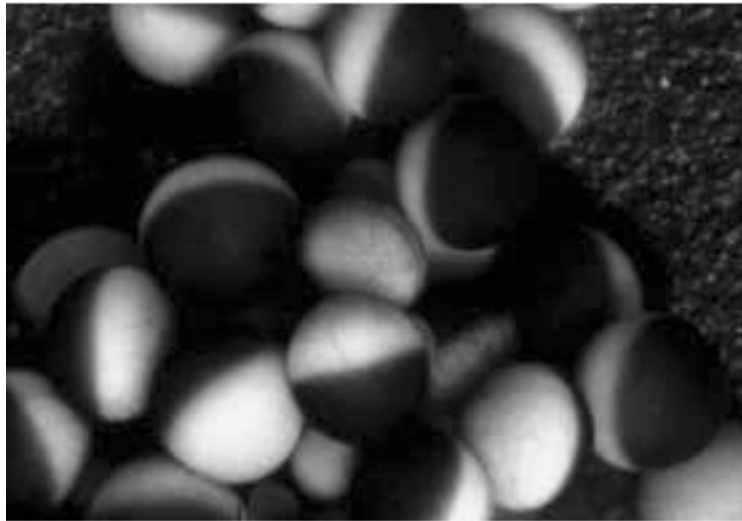
- Ionenkanäle, wie z.B. verschiedene spannungsgesteuerte Ionenkanäle (Kalium-, Natrium- und Chlorid-Kanäle) und unterschiedliche ligandengesteuerte Ionenkanäle (zu denen auch die Glutamat- und GABA-Rezeptorkanäle gehören),
- Ionenpumpen und verschiedene Transportsysteme (z.B.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase).

Diese, von der Oozyte synthetisierten Membranproteine, sind sowohl in ihrer Funktionsweise, als auch in ihrer molekularen Struktur den entsprechenden Proteinen in nativen Zellen weitgehend ähnlich (Jonas et al., 1992; Pardo et al., 1992).

### 2.1.1 Biologische Aspekte der Oozyte von *Xenopus laevis*

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) liegen im Ovar in sechs unterschiedlichen Reifestadien vor (I-VI, nach Dumont, 1972).

Die unreifen Zellen in den ersten Stadien sind klein und einheitlich hell gefärbt. Mit zunehmender Reifung wird Melanin in einer Zellhälfte angereichert. Diese, als animaler Pol bezeichnete Hälfte, färbt sich dunkelbraun und unterscheidet sich im Aufbau des Zytoskeletts (Nieuwkoop, 1977), der Verteilung endogener Chloridkanäle (Miledi, 1984 und Robinson, 1979), sowie in der Anreicherung von RNA (Capco und Jeffrey, 1982) von der melaninarmen hellen Hälfte, dem vegetativen Pol. In Abbildung 2.1 sind reife Oozyten in den Stadien V und VI mit ihrer typischen Oberflächenstrukturierung dargestellt.

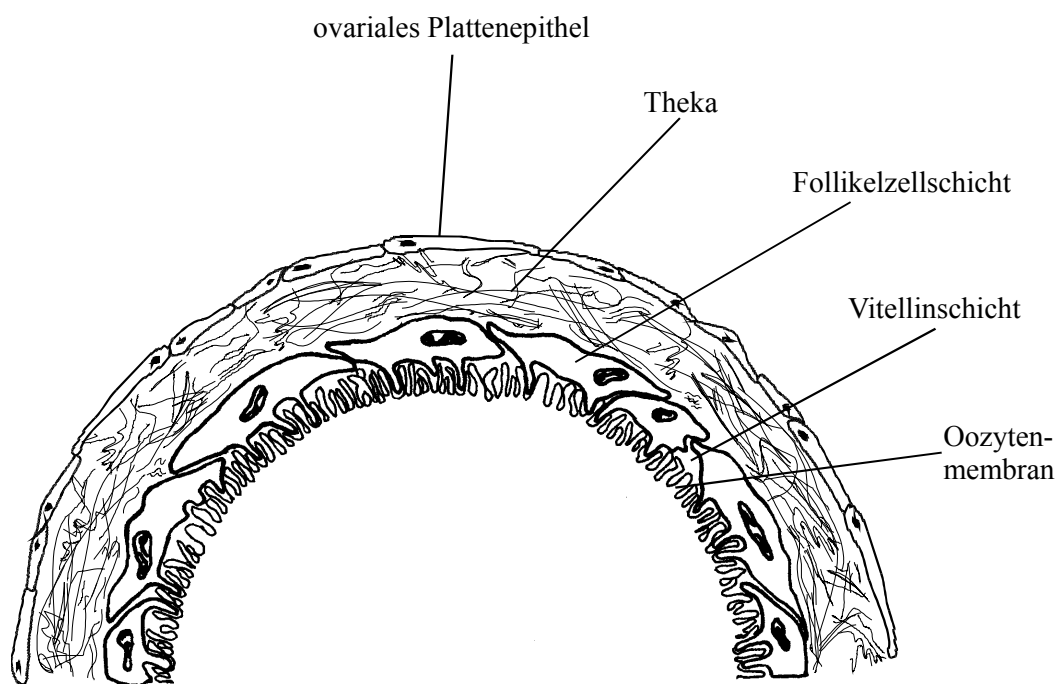


**Abb. 2.1:** Isolierte Oozyten des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Die Fotografie zeigt Eizellen im Stadium V und VI.

Die Oozyten des Stadiums VI sind von verschiedenen Hüllschichten umgeben (Dumont und Brummet, 1978). In Abbildung 2.2 ist der Aufbau der Hüllschichten schematisch dargestellt. Das Zytoplasma der Zelle wird von einer Membran mit Mikrovilli umgeben, die über Tunnelverbindungen (gap-junctions) mit Follikelzellen in Kontakt stehen. Über diese gap-junctions wird

sowohl Stofftransport als auch eine elektrische Kopplung ermöglicht (Browne et al., 1979).

Zwischen der Oozytenmembran und der Follikelzellschicht liegt die azelluläre Vitellinschicht, die vorwiegend aus Glykoproteinen und kollagenen Strukturen besteht. Der Follikelzellschicht liegt die Theka mit Bindegewebe, Muskel- und Nervenzellen sowie Kapillaren auf. Außen umgibt das ovariale Plattenepithel die Oozyte (Wischnitzer, 1966).



**Abb. 2.2:** Schematischer Aufbau der Hüllschichten von *Xenopus laevis*.

### *2.1.2 Präparation und Kultivierung der Oozyten*

Den in einem Narkosetauchbad (Narkosemittel: MS 222, s. Tab. 2.1) sedierten Fröschen wurde zunächst ca. ein Viertel des Ovars mit Zellen aller Reifestadien entfernt, anschließend wurde die Operationswunde genäht und der Frosch wurde in ein eigenes Becken gesetzt, bis er sich von dem Eingriff erholt hatte. Jeder Frosch konnte nach etwa sieben bis acht Wochen erneut operiert werden, da das Ovar eine gute Regenerationsfähigkeit besitzt. Das entnommene Ovarstück besteht aus traubenförmig zusammenhängenden Oozyten, aus dem nur Zellen der Reifestadien V und VI manuell mit einer Pinzette entnommen und vereinzelt wurden. Zellen, die keine intensive Pigmentierung des animalen Pols und keine klare Abgrenzung zum vegetativen Pol erkennen ließen, eigneten sich nicht für die Expressionsversuche und wurden entsorgt. Bei der Vereinzelnung wurden die Oozyten weitgehend vom Bindegewebe, dem Ovarialepithel und der Theka befreit. Dagegen verblieben Follikelzellschicht und die Vitellinschicht an der Oozyte. Für einige Kontrollversuche wurde später auch die Follikelzellschicht entfernt.

Je zwei Zellen sind anschließend in sterile Glaspetrischalen gesetzt worden, die ein Kulturmedium (s. Tab. 2.1), versetzt mit Streptomycin und Penicillin, enthielten (modifiziert nach Barth und Barth, 1959).

Bei einer Temperatur von 20 °C wurden die Zellen neun Tage im Dunkeln gelagert, wobei das Nährmedium am 4. und 6. Tag gewechselt wurde.

Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration
Kulturmedium	NaCl	88 mmol/l
	KCl	1 mmol/l
	CaCl <sub>2</sub>	1,4 mmol/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,8 mmol/l
	HEPES; pH 7,4	5 mmol/l
	Penicillin	100 IU/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
MS 222	3-Aminobenzoessäure- ethylester-Methan- sulfonatsalz	5 mmol/l

**Tab. 2.1:** Lösungen für Präparation und Kultivierung der Oozyten

### 2.1.3 Extraktion der RNA

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ligandengesteuerten Rezeptorkanäle stammen von mRNA ab, die aus dem Gehirn von Ratten isoliert wurde. Die adulten Ratten wurden mit einer intraperitonealen Luminal-Injektion betäubt und dekapitiert, anschließend wurde die Schädelkalotte eröffnet und das gesamte Gehirn entnommen. In einem ersten Schritt wurde Gesamt-RNA aus dem Gewebe extrahiert (Cathala et al., 1983), im nächsten Arbeitsschritt wurde durch Affinitätschromatografie die Poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert. Der Extraktionsvorgang erfolgte unter weitgehend sterilen Bedingungen, das heißt unter Verwendung von Sterilhandschuhen, sterilen Gefäßen und autoklavierten Lösungen. Die Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.



### Extraktion nach Cathala:

- Etwa 1 g Hirngewebe wurde mit 11 ml Homogenisationspuffer in einem Ultra-Thurax für 30 s homogenisiert und dann zur selektiven Fällung der RNA mit 77 ml 4 mol/l Lithiumchloridlösung (Tab. 2.2) über Nacht inkubiert.
- Das Homogenat aus RNA, geringen Mengen DNA und denaturierten Proteinen, wurde 90 Minuten bei 8000g zur Abtrennung einer festen Phase zentrifugiert, der flüssige Überstand wurde anschließend dekantiert.
- Zu dem Pellet wurde 20 ml Lösungspuffer (s. Tab. 2.2) gegeben und 45 Minuten gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von 20 ml Phenol und nach weiteren 10 Minuten Rühren zur Aufreinigung 20 ml Chloroform-Isoamylalkohol (s.Tab. 2.2). Diese Lösung wurde für weitere 10 Minuten gerührt.
- Nach einer erneuten Zentrifugierung für 10 Minuten bei 8000g erhielt man eine wässrige, RNA-haltige Phase. Diese wässrige Phase wurde abpipettiert und zur weiteren Reinigung mit 20 ml Chloroform-Isoamylalkohol 10 Minuten verrührt, anschließend für 5 Minuten bei 8000g zentrifugiert. Die dabei entstandene wässrige Phase wurde noch einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, 10 Minuten verrührt und 5 Minuten bei 8000g zentrifugiert.
- Die nun weitgehend gereinigte und gelöste Gesamt-RNA wurde mit 2 ml einer 3 mol/l (das entspricht 0,1 Vol-%) Natriumacetat-Lösung und 44 ml reinem Ethanol (das entspricht 66 Vol-%) für mindestens 12 h bei -20 °C gefällt.
- Die ausgefällte RNA wurde ein letztes Mal bei 8000g für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und anschließend wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet.

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle (Maniatis et al., 1982) wurde das Pellet in Aqua bidest. gelöst und die optische Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Dabei entspricht 1 OD einer Konzentration von 40 µg RNA/ml.

Der Reinheitsgrad der RNA-Lösung wurde mittels des Quotientens aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm bestimmt. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ist die RNA-Lösung weitgehend von Aminosäuren und Proteinen gereinigt. Die RNA-Portionen wurden bei -70 °C gelagert.

#### *2.1.4 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup> RNA*

Aus der Gesamt-RNA wurde die für Proteine kodierende mRNA durch Oligo(dT)-Affinitätschromatographie gewonnen. Dieser Schritt ist notwendig, da nur 1-5 % der Gesamt-RNA aus mRNA besteht (Maniatis et al., 1982) und für das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte angereicherte mRNA-Lösung vorteilhaft ist, weil sie zu einer höheren Ionenkanaldichte in der Oozytenmembran führt.

- Die Trägersubstanz in der Säule für die Affinitätschromatographie ist mit Polynukleotiden (Oligo(dT)) besetzt. Diese dT-Nukleotidketten bilden mit dem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende der mRNA Wasserstoffbrücken aus, wodurch eine Isolierung von mRNA gegenüber anderer RNA (tRNA, rRNA) erreicht wird.
- Zur Durchführung der Affinitätschromatographie wurde zunächst die Säule mit 1 ml Salz-Puffer (High Salt-Buffer, HS-Puffer s.Tab. 2.2) gewaschen. Der HS-Puffer erleichtert die Brückenbildung zwischen den Basenpaaren. Die Gesamt-RNA (ca. 500 µg) wurde zentrifugiert (30 Minuten bei 8000g), dann in 1ml Elutionspuffer (Tab. 2.2) gelöst und 5 Minuten auf 65 °C erhitzt. Zu der RNA-Probe wurden 200 µl HS-Puffer gegeben und anschließend wurde die Probe auf die Säule übertragen und 10 Minuten inkubiert.

- Die Säule wurde 2 Minuten bei 350g zentrifugiert und gewaschen, dann mit jeweils 250 µl HS-Puffer und einem Puffer mit einer geringen Salzkonzentration (Low Salt Buffer, LS-Puffer, s. Tab. 2.2) erneut gewaschen und jeweils 2 Minuten zentrifugiert, wobei beide Eluate verworfen wurden. Durch die Herabsetzung der Salzkonzentration lösen sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren wieder. Eine letzte Waschung erfolgte mit 250 µl Elutionspuffer (s. Tab. 2.2) bei 65 °C, wobei dieses Mal das Eluat aufgefangen wurde.
- Zu der Probe wurden 100 µl LS-Puffer und 10 µl Glykogen sowie 2,5 ml reiner Ethanol gegeben und über Nacht bei -20 °C gelagert. Es folgt eine letzte 30-minütige Zentrifugation .

### *2.1.5 Injektion der mRNA*

Für die Injektion von RNA in die Oozyten wurde eine RNA-Lösung mit einer Konzentration von 1-2 µg/µl hergestellt. Diese Konzentration ermöglicht eine ausreichende Expression von Membranproteinen, ohne die Zelle mit Nukleinsäuren zu überladen, was zum Zelluntergang führen würde.

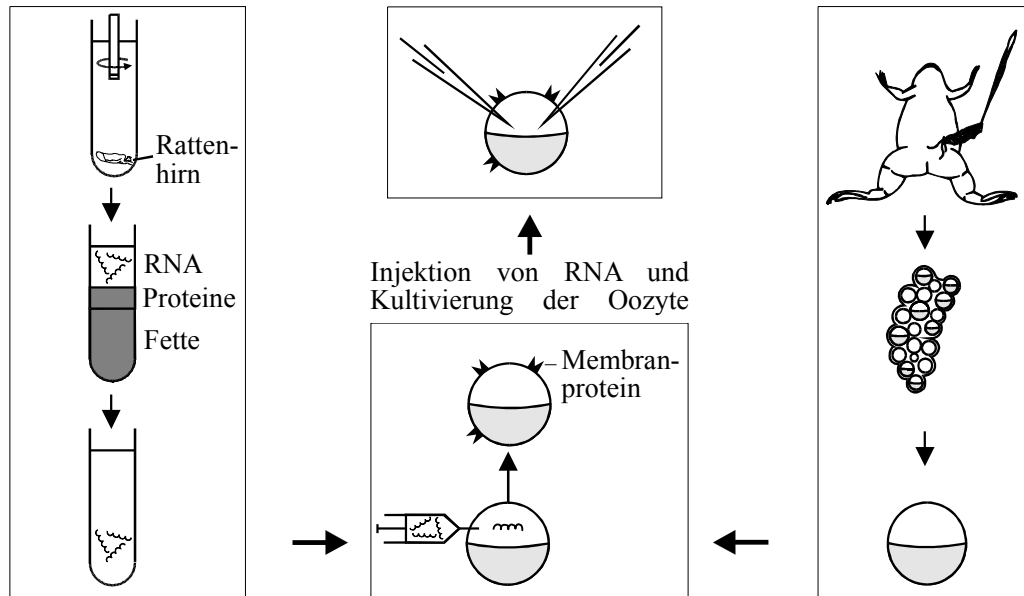
Die gewonnene mRNA, die u.a. für Membranproteine des ZNS kodiert, wurde unter mikroskopischer Sicht in die frisch präparierten Oozyten eingebracht. Hierfür wurde die Zelle mit einer Glaskapillare von 8-12 µm Durchmesser angestochen. Mit Hilfe von Druckluft wurden aus der Kapillare ca. 50 nl der RNA-Lösung injiziert. Durch Beobachtung des Meniskus in der Mikroelektrode während der Injektion konnte sichergestellt werden, dass die Zelle die entsprechende Menge RNA erhielt.

In Abbildung 2.3 sind die einzelnen Schritte zur heterologen Expression von hirnspezifischen Ionenkanälen zusammengefasst dargestellt.

Isolierung von RNA

Elektrophysiologische Untersuchung

Präparation der Oozyte



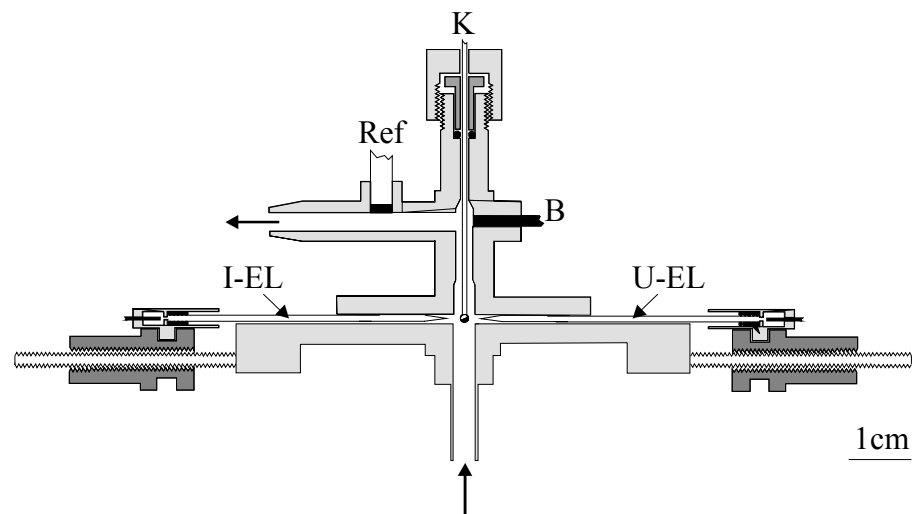
**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Expression hirnspezifischer Ionenkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* (nach Madeja et al., 1992).

Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration
Homogenat	β-Mercaptoethanol	8 Vol.- %
	Guanidinthiocyanat	5 mol/l
	Tris; pH 7,4	50 mmol/l
	EDTA	10 mmol/l
Lithiumchloridlösung		4 mol/l
Lösungspuffer	SDS	0,1 Vol.- %
	Tris; pH 7,4	2 mol/l
	EDTA	0,5 mol/l
Phenol		puffergesättigt
Ethanol		~99 Vol.- %
Natriumacetatlösung		3 mol/l
Chloroform-Isoamyl- alkohol	25:1 (v/v)	
Elutionspuffer	Tris; pH 7,4	10 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l
HS-Puffer	Tris; pH 7,4	10 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l
	NaCl	0,5 mol/l
LS-Puffer	Tris; pH 7,4	10 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l
	NaCl	0,1 mol/l

**Tab. 2.2:** Lösungen zur Extraktion von RNA

## 2.2 Elektrophysiologische Untersuchungstechnik

Die für die Versuche verwendete Apparatur ist schematisch in Abbildung 2.4 dargestellt.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der Spannungsklemme zur Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten (modifiziert nach Madeja et al., 1991). K: Ansaugkapillare; Ref: Referenzelektrode; B: Badelektrode; I-EL: Stromelektrode; U-EL: Spannungselektrode

Es handelt sich um ein kreuzförmiges Röhrensystem aus Plexiglas. Von oben kommt die Ansaugkapillare (K), deren Öffnungsränder zum Schutz der Oozyte abgeflammt wurden. Sie ist mit einem Schlauch verbunden, an dessen Ende ein Unterdruck erzeugt werden kann. Die mRNA-injizierte Oozyte wird angesaugt, dadurch schonend fixiert und in der Mitte des Kreuzes positioniert.

Links und rechts liegen die Mikroglaselektroden (EL), deren Spitzen unter mikroskopischer Sicht in die Oozyte eingebracht werden. Die Elektroden wurden in einem Elektrodenziehgerät aus Filamentglas (Innendurchmesser 0,87 mm) hergestellt. Sie wurden mit einer Hohlnadel luftblasenfrei mit

Kaliumchloridlösung (KCl, 2 mol/l) gefüllt, ihr Widerstand lag zwischen 1 und 2 M $\Omega$ .

Die rechte Elektrode stellt die Spannungselektrode (U-EL) dar. Sie mißt gegen eine extrazelluläre Referenzelektrode (RF, ebenfalls gefüllt mit KCl Lösung 2 mol/l) das Membranpotenzial. Die links eingeführte Elektrode stellt die Stromelektrode (I-EL) dar. Über diese Elektrode konnte Strom in die Oozyte injiziert und auf diese Weise das Membranpotenzial verändert werden.

### *2.2.1 Messung der Ionenströme*

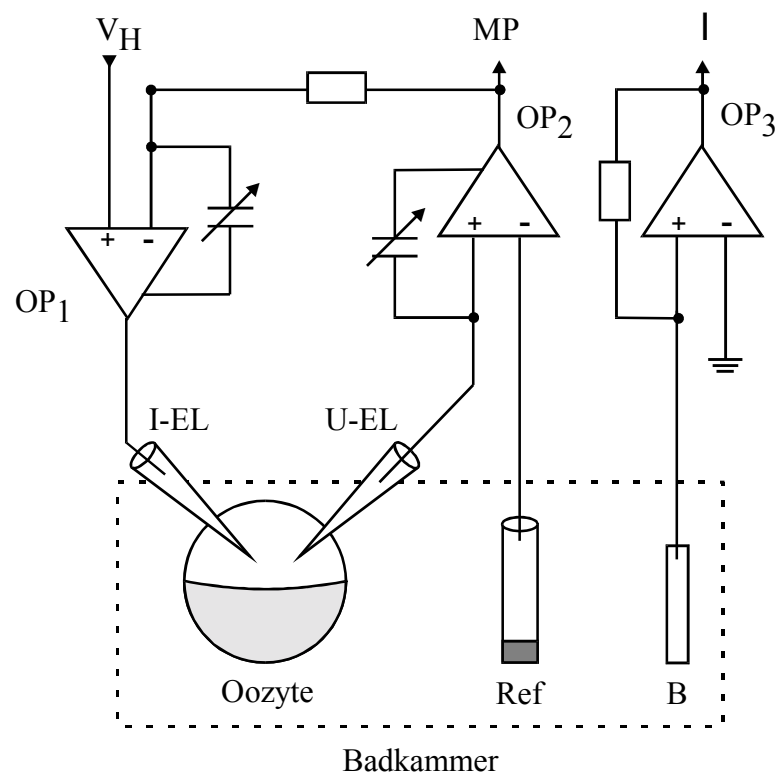
Die Versuche wurden in einer Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Technik nach Hodgkin et al., 1949 und 1952) durchgeführt. Die elektronische Messanordnung ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Diese Technik bietet den Vorteil, dass keine Aktivierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle erfolgt, und dadurch die Ionenströme über ligandengesteuerte Rezeptorkanäle nicht verfälscht werden.

Nach dem Anstechen der Oozyte mit den Elektroden stabilisierte sich das Membranpotential nach einer Ruhezeit von 10-20 Minuten. Danach wurde der Membranwiderstand der Oozyte durch Anhebung des Membranpotenzials um 10 mV und Messung der dafür notwendigen Strommenge nach dem Ohmschen Gesetz berechnet. Oozyten mit einem Widerstand, der kleiner als 0,3 M $\Omega$  war, wurden nicht für Versuche herangezogen. Danach wurde das Membranpotenzial mit Hilfe der Stromelektrode auf einen definierten Wert eingestellt, wobei dieses Haltepotenzial in der Regel -70 mV betrug.

Der von der Stromelektrode injizierte Strom wurde im Operationsverstärker 2 generiert und floß über die Baderde (einfacher Silberdraht im Röhrensystem) ab. Der abgeflossene Strom wurde in ein Spannungssignal umgewandelt und verstärkt (Operationsverstärker 3).

Durch einen Rückkopplungsmechanismus konnte so das definierte Membranpotential (= Haltepotenzial,  $V_H$ ) ständig durch die Stromelektrode abge-

glichen werden. Wenn durch Öffnung der ligandengesteuerten Rezeptorkanäle Ionenbewegungen über die Membran erfolgten, wurde über die Stromelektrode so viel Strom injiziert, dass das eingestellte Membranpotential konstant blieb. Die Größe der transmembranösen Ionenströme wurde also indirekt aus der Ionenverschiebung in der Stromelektrode geschlossen. Dieser sog. Klemmstrom wurde von einem Tintenschreiber und einem Speicheroszilloskop aufgezeichnet.



**Abb. 2.5:** Schaltplan zur Messung transmembranöser Ionenströme

V<sub>H</sub>: Haltepotenzial; MP: Membranpotenzial; OP<sub>1</sub>: Operationsverstärker zur Messung des Membranpotenzials; OP<sub>2</sub>: Operationsverstärker zur Vorgabe des Haltepotenzials; OP<sub>3</sub>: Operationsverstärker zur Messung des injizierten Klemmstroms; I: Klemmstrom; I-EL: Stromelektrode; U-EL: Spannungselektrode; Ref: Referenzelektrode; B: Badelektrode



### 2.2.2 Substanzapplikation

Das vorliegende Applikations-System basiert auf der Technik der Konzentrationsklemme (Akaike et. al. 1986) und wurde für die Technik der Spannungsklemme von Madeja et. al. 1991 modifiziert (Abbildung 2.4). Das untere Rohr taucht in eine Probenschale mit Flüssigkeit ein. Computergesteuert lässt sich ein Ventil öffnen, wodurch die Flüssigkeit in das Kreuz und damit an die Zelle strömt. Die angesaugte Flüssigkeitsmenge wird durch Programmierung der Ventilöffnungsdauer festgelegt.

Die mit der Flüssigkeitsprobe gefüllte Schale steht auf einem runden Karusselltisch, auf dem insgesamt 20 Schalen im Kreis angeordnet sind. Ebenfalls über ein Computerprogramm gesteuert, rotiert der Tisch nach einer eingestellten Zeit zu einer vorgegebenen Schale und saugt die darin befindliche Flüssigkeit an. Der Flüssigkeitsaustausch ist schnell und vollständig. So können in 10 ms bis zu 90 % der Lösung ausgetauscht werden (Madeja et. al., 1991 und 1995 a).

## 2.3 Versuchsprotokolle

Ein Teil der Versuche wurde an Zellen mit intakten Hüllschichten durchgeführt. Diese Zellen werden im weiteren als follikulierte Zellen bezeichnet. Um eine eventuelle Substanzeffektminde rung durch die Follikelzellschicht auszuschließen, wurden auch Versuchsreihen mit Zellen ohne diese Hüllschicht durchgeführt. Diese Zellen werden im weiteren als defollikulierte Zellen bezeichnet; sie sind nur noch von der Vitellinschicht umgeben.

Zur Aktivierung der verschiedenen Glutamat-Rezeptorkanäle wurden unterschiedliche Agonisten verwendet. So wurde NMDA mit Glycin (s. Tab. 2.4) zur Auslösung der typischen Ionenströme der NMDA- Rezeptorkanäle verwendet. Kainat (s. Tab. 2.4) wurde zur Auslösung der typischen Ionenströme der AMPA-Rezeptorkanäle appliziert. Zur Auslösung der typischen Ionenströme an

den metabotropen Glutamatrezeptoren wurde Quisqualat (QUIS, s. Tab. 2.4) verwendet.

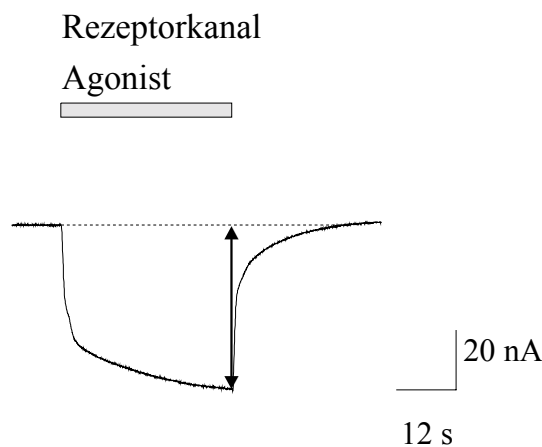
Als Nachweis, dass tatsächlich der spezifische Kanal aktiviert wurde, dienten Hemmungsversuche, die im Vorfeld der Untersuchungen durchgeführt wurden. Dafür wurden simultan selektive Antagonisten für die verschiedenen Rezeptorkanäle mit den jeweiligen Agonisten für die einzelnen Rezeptorkanäle verabreicht.

Alle Agonisten der Glutamat-Rezeptorkanäle und alle Arsensubstanzen wurden in Oozytenringer angesetzt und hatten als Stammlösung eine Konzentration von 1 mmol/l (Tab. 2.4). Für die NMDA-Lösung musste zusätzlich Glycin eingebracht werden, weil Glycin ein Kotransmitter an diesem Rezeptorkanal ist und dort auch eine eigene Bindungsstelle besitzt (Johnson et al., 1987). Außerdem durfte die Lösung kein Magnesium enthalten, welches sich bei diesem Rezeptorkanal in die Ionophore lagert und bei negativem Haltepotenzial den transmembranösen Ionenstrom blockiert (spannungsabhängiger Magnesiumblock; Nowak et al., 1984).

Die Konzentrationen der applizierten Agonisten richtete sich nach der Sensitivität der einzelnen Subtypen. Von NMDA und Kainat wurden 25-100  $\mu\text{mol/l}$  gegeben, während die metabotropen Glutamatrezeptoren schon bei einer Quisqualatkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  große Ionenströme zeigten. Die methylierten Arsenverbindungen (Monomethylarsonsäure, Dimethylarsinsäure, siehe Tab. 2.4) wurden im Institut für Umweltanalytik in Essen angesetzt. Die anorganische Arsensäure wurde im Institut für Arbeitsmedizin und Hygiene der WWU Münster hergestellt. Bisher ist ungeklärt, in welcher Konzentration Arsenverbindungen im Gehirn angereichert werden. Der Konzentrationsbereich für die Arsenverbindungen wurde daher nach Vorversuchen mit Arseniger Säure auf 0,1  $\mu\text{mol/l}$  bis 100  $\mu\text{mol/l}$  festgelegt. Die gezeigten Versuche mit Applikation von 1000  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure dienten der Provokation eines Effektes. Diese Konzentration ist unter physiologischen Bedingungen nicht relevant. Alle verwendeten Substanzen wurden bei 4 °C in Glasflaschen

gelagert. In einer Kontroll-Versuchsreihe wurden zunächst alle Glutamat-Rezeptorkanäle auf die Reproduzierbarkeit der Ionenströme bei serieller Aktivierung überprüft. Für die Testung der Arsenverbindungen ergaben sich daraus anschließend drei Versuchsprotokolle.

Die Auswertung der Stromamplitude von allen Aktivierungen durch Kainat und NMDA erfolgten auf gleiche Art. Kurz vor dem Auswaschungspunkt wurde von der Grundlinie aus das Lot bis zum Schnittpunkt mit der Kurve gefällt. Anhand eines Eichpulses konnte daraus die tatsächliche Stromamplitude gemessen werden (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung der Berechnung der durch einen Rezeptorkanal-Agonisten ausgelösten Stromamplitude

### 2.3.1 Wirkung der Arsenverbindungen auf AMPA-Rezeptorkanäle

Die AMPA-Rezeptorkanäle wurden durch den synthetischen Liganden Kainat aktiviert (s. Tab. 2.3). Zunächst wurden in einer Kontrollreihe zur Überprüfung der Reversibilität der Kainat-induzierten Ionenströme sukzessiv die AMPA-Rezeptorkanäle sieben Mal im Abstand von 10 Minuten aktiviert. Die Applikation mit der Kainat-Lösung erfolgte für jeweils eine Minute. Zwischen der Agonisten-Applikation wurde jeweils mit der Ringer-Lösung ausgewaschen.

Um einen vollständigen Flüssigkeitsaustausch zu garantieren, wurde das Ventil zweimal hintereinander für die Dauer von je 2 sec geöffnet. Die AMPA-Rezeptorkanäle generierten dabei weitgehend reproduzierbare Ionenströme. Zur Berechnung der relativen Amplitudengröße wurde die Amplitude der ersten Aktivierung durch Kainat gleich 100 % gesetzt und die Amplituden der folgenden Aktivierungen auf diese erste Amplitude normiert.

Die Wirkung der Arsenverbindungen in verschiedenen Konzentrationen erfolgte analog der Kontrollreihe. Zu Beginn wurde Kainat für eine Minute appliziert. Nach 10 Minuten wurde Kainat zunächst mit der am niedrigsten gewählten Arsenkonzentration (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) für eine Minute koappliziert, nach weiteren 10 Minuten mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Arsen, wieder 10 Minuten später mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen und abschließend mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen koappliziert (bei einigen Zellen wurde nach den 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen noch 1000  $\mu\text{mol/l}$  Arsen koappliziert). Nach der Gabe von 100  $\mu\text{mol/l}$  (bzw. 1000  $\mu\text{mol/l}$ ) Arsen wurde nach 10 Minuten noch einmal zur Kontrolle Kainat appliziert, um die Reversibilität eventueller Effekte zu überprüfen. Die Konzentration von Kainat betrug zwischen 25 und 50  $\mu\text{mol/l}$  (s. Tab. 2.4).

Aus den Stromamplituden der Kontrollreihen (in Prozent), die jeweils bei der zweiten Aktivierung erreicht wurden, wurde der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt. Entsprechend wurden die Mittelwerte der Stromamplituden aller dritten bis sechsten Aktivierungen berechnet.

Bei der Applikation der Arsenverbindungen zusammen mit Kainat wurde aus den Prozentwerten der Amplituden von allen Arsenapplikationen mit der Konzentration 0,1  $\mu\text{mol/l}$  der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet und mit dem Mittelwert aller Amplituden der zweiten Aktivierungen der Kontrollreihen verglichen. Nach Applikation von 1  $\mu\text{mol/l}$  Arsen wurden aus allen Amplituden Mittelwert und Standardabweichung gebildet und mit dem Mittelwert der Amplituden aus den dritten Aktivierungen der Kontrollreihen verglichen. Entsprechend wurde der Mittelwert der Amplituden von Applikationen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen mit dem Mittelwert der Amplituden der vierten

Aktivierung verglichen und der Mittelwert der Amplituden nach Applikation von 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen mit dem Mittelwert der fünften Aktivierung der Kontrollreihen.

### *2.3.2 Wirkung der Arsenverbindungen auf NMDA-Rezeptorkanäle*

Die NMDA-Rezeptoren wurden durch den synthetischen Liganden NMDA aktiviert (s. Tab. 2.3). Zunächst wurden in einer Kontrollreihe zur Überprüfung der Reversibilität der NMDA-induzierten Ionenströme sukzessiv die NMDA-Rezeptorkanäle sieben Mal im Abstand von 20 Minuten aktiviert. Die sieben Applikationen mit der NMDA-Lösung erfolgten für jeweils eine Minute, anschließend wurde jeweils mit der Ringer-Lösung ausgewaschen. Um einen vollständigen Flüssigkeitsaustausch zu garantieren, wurde das Ventil zwei Mal hintereinander für die Dauer von je 2 sec geöffnet.

Der Rezeptorkanal vermittelte in Bezug auf die erste Aktivierung bei der zweiten Aktivierung eine deutliche Verkleinerung der Stromamplitude. Die Größe der Stromamplituden der folgenden Aktivierungen blieb auf dem Niveau der zweiten Aktivierung, in einigen Fällen stiegen die Stromamplituden mit jeder weiteren NMDA-Applikation wieder an, so dass häufig die siebte NMDA-Applikation das Niveau der ersten Applikation erreichte. Auf Grund dieses Antwortverhaltens wurde die erste Aktivierung verworfen und die Amplitude des Ionenstroms der zweiten Aktivierung als Bezugswert für die folgenden Aktivierungen gleich 100 % gesetzt.

Die Wirkung der Arsenverbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte analog der Kontrollreihe. Zu Beginn wurde NMDA für eine Minute appliziert. Nach 20 Minuten wurde erneut NMDA appliziert. Nach weiteren 20 Minuten wurde dann NMDA zunächst mit der am niedrigsten gewählten Arsenkonzentration (0,1  $\mu\text{mol/l}$  bei Versuchsreihen mit Monomethylarsensäure und Dimethylarsinsäure; 1  $\mu\text{mol/l}$  bei Versuchsreihen mit Arseniger Säure) für eine Minute koappliziert, nach weiteren 20 Minuten mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Arsen (bzw.

10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen bei Arseniger Säure), wieder 20 Minuten später mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen (bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  bei Arseniger Säure) und abschließend mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen (bzw. 1000  $\mu\text{mol/l}$  bei Arseniger Säure) koappliziert. Nach der Gabe von 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen (bzw. 1000  $\mu\text{mol/l}$  bei Arseniger Säure) wurde nach 20 Minuten noch einmal zur Kontrolle NMDA appliziert, um die Reversibilität eventueller Effekte zu überprüfen.

Die Konzentration der NMDA-Lösung betrug zwischen 50 und 100  $\mu\text{mol/l}$  NMDA und enthielt 10  $\mu\text{mol/l}$  Glycin (s. Tab. 2.4).

Die erste Aktivierung durch NMDA wurde verworfen, die Stromamplitude nach der 2. NMDA-Applikation auf 100 % normiert und die Stromamplitude aller folgenden NMDA-Applikationen (in Prozent) darauf bezogen. Aus allen Stromamplituden der dritten NMDA-Aktivierung wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Entsprechend wurden die Mittelwerte der Stromamplituden aller vierten bis siebten Aktivierungen berechnet.

Bei der Applikation der Arsenverbindungen zusammen mit NMDA wurde aus den Prozentwerten der Amplituden von allen Arsenapplikationen mit der niedrigsten Konzentration der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet und mit dem Mittelwert aller Amplituden der dritten Aktivierungen aus den Kontrollmessungen verglichen. Aus allen Amplituden nach Applikation mit der nächst höheren Konzentration wurde ebenso der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet und mit dem Mittelwert der Amplituden aus den vierten Aktivierungen der Kontrollmessungen verglichen. Entsprechend wurde der Mittelwert der Amplituden von Applikationen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen (bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  bei Arseniger Säure) mit dem Mittelwert der Amplituden der fünften Aktivierung verglichen und der Mittelwert der Amplituden nach Applikation von 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen (bzw. 1000  $\mu\text{mol/l}$  bei Arseniger Säure) mit dem Mittelwert der sechsten Aktivierung aus den Kontrollmessungen.

### *2.3.3 Wirkung der Arsenverbindungen auf den metabotropen Glutamatrezeptor*

Der metabotrope Glutamatrezeptor wird durch den synthetischen Liganden Quisqualat aktiviert (QUIS, s. Tab. 2.3). Zwischen den Aktivierungen durch Quisqualat wurde eine Ruhepause von 15 Minuten eingehalten.

Der metabotrope Glutamatrezeptor wies bei der sukzessiven Aktivierung eine über die Dauer der Quisqualat-Applikation zunehmende Reduktion der Stromamplitude auf. Außerdem wurde die Latenzzeit, nach der die typischen Oszillationen auftraten, bei jeder erneuten Applikation länger. Die sukzessive Applikationsform war zur Testung der Arsenverbindungen daher ungeeignet, so dass bei diesem Rezeptorkanal Quisqualat kontinuierlich appliziert und die Arsenlösung eingewaschen wurde. Nach Aktivierung des Rezeptors durch Quisqualat wurde 2 bis 5 Minuten gewartet, bis sich die Ionenströme weitgehend stabilisierten. Dann wurde die Arsenlösung koappliziert und für ca. 2 Minuten an der Zelle belassen. Nach der Auswaschung der Arsenverbindung verblieb Quisqualat für eine weitere Minute und wurde schließlich mit Oozytenringer ebenfalls ausgewaschen.

Die Kurven konnten auf Grund der für Quisqualat typischen Oszillationen und häufigen Verlagerung der Grundlinie quantitativ nicht ausgewertet werden. Es erfolgte daher eine qualitative Beurteilung der Ionenströme unter Arsenapplikation.

In Tabelle 2.3 sind alle untersuchten Glutamatrezeptorkanäle mit ihren Agonisten und Antagonisten zusammengefasst.

Agonist	Rezeptortyp	Antagonist
NMDA/Glycin	NMDA	APV
Kainat	AMPA	CNQX
QUIS	mGluR	

**Tab. 2.3:** Übersicht der Glutamat-Rezeptorkanäle sowie ihrer synthetischen Agonisten und Antagonisten.

Lösungen		Konzentration
Rezeptorkanal-Agonisten	Kainat	1 mmol/l
	NMDA/Glycin	1 mmol/l / 0,1 mmol/l
	QUIS	1 mmol/l
Rezeptorkanal-Antagonisten	APV	1 mmol/l
	CNQX	1 mmol/l
Arsenhaltige Verbindungen	anorgan. Arsensäure	1 mmol/l
	H <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub>	
	Monomethylarsonsäure	1 mmol/l
	CH <sub>3</sub> AsO(OH) <sub>2</sub>	
Dimethylarsinsäure	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO(OH)	1 mmol/l
Oozyten-Ringer	NaCl	115 mmol/l
	KCl	2 mmol/l
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mmol/l
	HEPES	10 mmol/l

**Tab. 2.4:** Stammlösungen für die Experimente.



### **3. Ergebnisse**

Das Ergebniskapitel gliedert sich in vier Abschnitte. Zunächst erfolgt eine Beschreibung der pharmakologischen Charakteristika von Glutamat-Rezeptorkanälen (3.1). In einem nächsten Abschnitt werden die Kontrollversuche mit repetitiver Applikation der verschiedenen Glutamat-Agonisten dargestellt (3.2). Anschließend werden Versuche mit alleiniger Applikation von Arsenverbindungen aufgeführt (3.3) und in einem letzten Abschnitt werden die Ergebnisse bei repetitiver Koapplikation von Glutamat-Agonisten und Arsenverbindungen gezeigt (3.4).

#### **3.1. Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchung der Glutamat-Rezeptorkanäle**

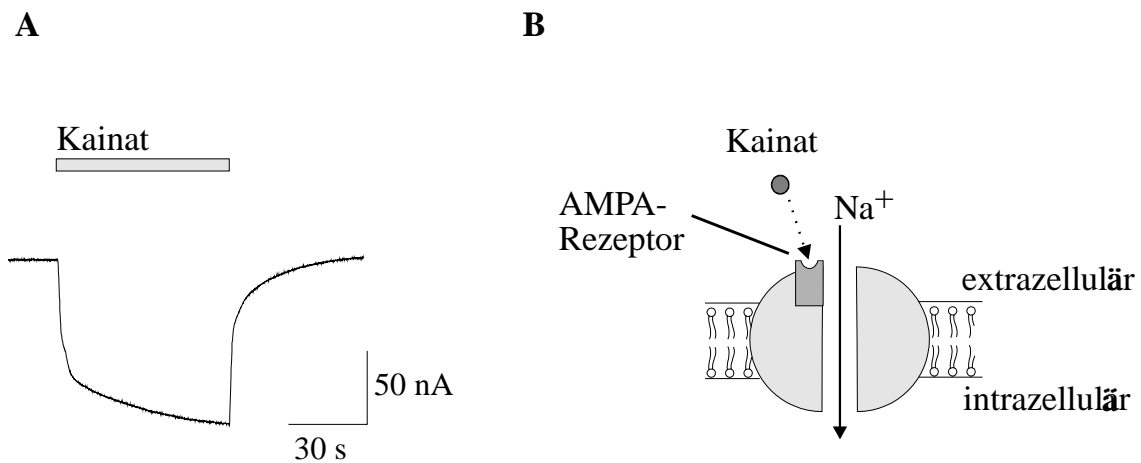
##### *3.1.1 Analyse der Kainat-induzierten Ionenströme*

Durch Applikation von Kainat wurden transmembranöse Ionenströme induziert, die ab dem dritten Tag nach Injektion von mRNA in die *Xenopus* Oozyten gemessen wurden. Die Dauer der Kainat-Applikation betrug dabei jeweils eine Minute.

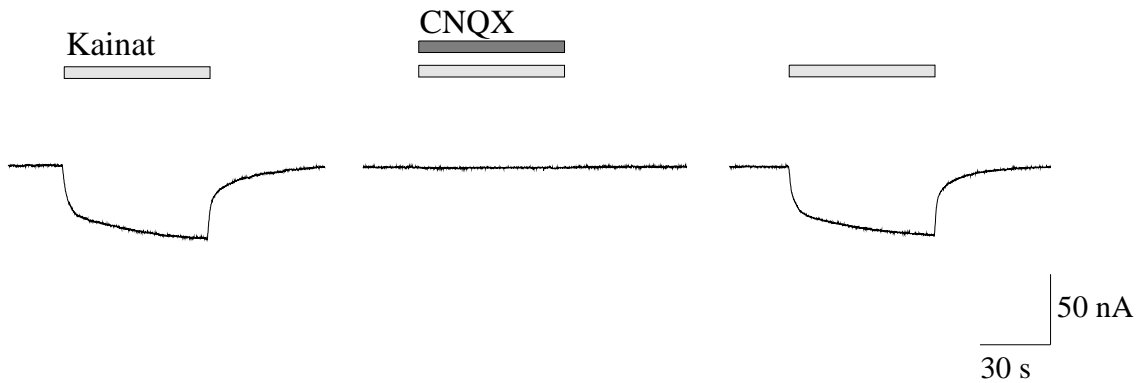
Nach Rezeptorkanalaktivierung durch Kainat folgte ein Ioneneinwärtsstrom, welcher dann im Laufe der Applikation langsam zunahm. Beim Auswaschen des Agonisten Kainat kam es zu einer rasch einsetzenden Verminderung der Ioneneinströme bis auf die Grundlinie. Abbildung 3.1A zeigt eine typische Originalregistrierung, Abbildung 3.1B den schematischen Aufbau des AMPA-Rezeptorkanals. Bei den initial einströmenden Ionen handelt es sich um Natriumionen, die durch die AMPA-Rezeptorkanäle in die Oozyte gelangen (z.B. Michaelis, 1998; Dingledine et al., 1999).

Bei Koapplikation von Kainat und dem AMPA-Rezeptorkanal-spezifischen Antagonisten CNQX (Hollman und Heinemann, 1994) waren keine transmembranösen Ionenströme mehr nachweisbar (Abb. 3.2). Da Kainat als Ligand sowohl an AMPA-Rezeptorkanälen als auch an Kainat-Rezeptorkanälen bindet,

kann ein Ionenstrom grundsätzlich auch durch Kainat-Rezeptorkanäle vermittelt werden. Aus Voruntersuchungen ergab sich jedoch, dass die Expression von Kainat-Rezeptorkanälen bei der vorliegenden methodischen Vorgehensweise nicht nachweisbar ist (Prof. Mußhoff, persönliche Mitteilung), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die beschriebenen Ionenströme nach Kainatapplikation ausschließlich über Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle vermittelt werden.



**Abb. 3.1:** Charakteristische Ionenströme an mRNA injizierten Oozyten nach Applikation des synthetischen Glutamat-Agonisten Kainat. **A:** Originalregistrierung der Ionenströme nach Rezeptoraktivierung durch 50  $\mu\text{mol/l}$  Kainat. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotenzial betrug  $-70\text{ mV}$ . Der Balken gibt die Dauer der Substanzapplikation wieder. **B:** Schematischer Aufbau des AMPA-Rezeptorkanals in der Zellmembran. Dargestellt ist der Netto-Einwärtsstrom nach Rezeptorkanalaktivierung. Die Rezeptorbindungsstelle ist dunkelgrau gemustert.



**Abb. 3.2:** Hemmung der Kainat-induzierten transmembranösen Ionenströme durch den AMPA-Rezeptorkanal-Antagonist CNQX. Die Balken geben die Dauer der Substanzapplikationen wieder, wobei der dunkelgrau gemusterte Balken die Gabe des Antagonisten angibt. Originalmessung an einer einzelnen Oozyte mit 10 min Latenz zwischen den einzelnen Applikationen. Die Konzentrationen von Kainat und CNQX betragen jeweils 50  $\mu\text{mol/l}$ . Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotenzial betrug -70 mV.

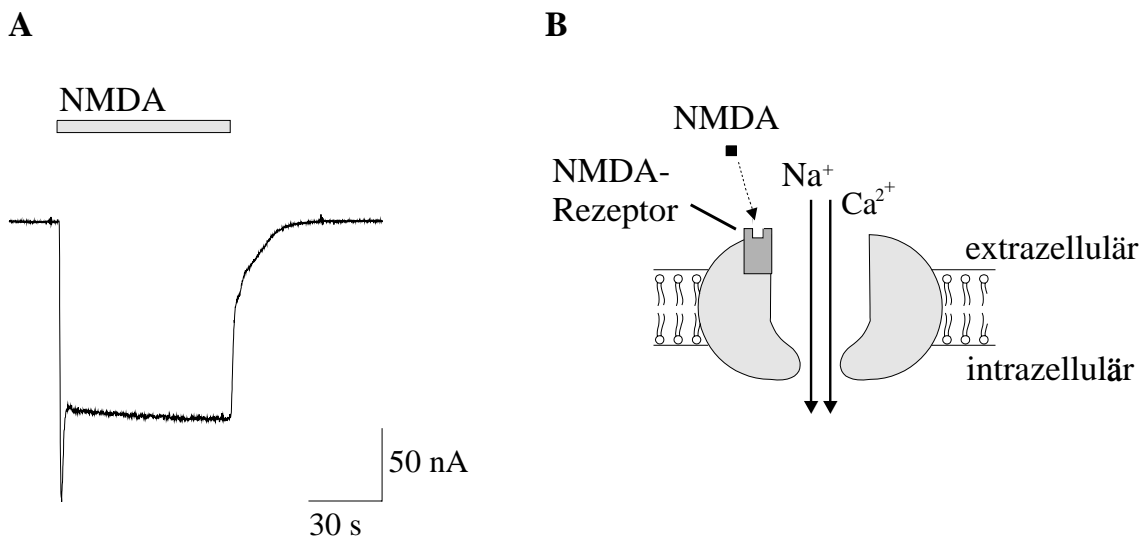
### 3.1.2 Analyse der NMDA-induzierten Ionenströme

Die NMDA-induzierten transmembranösen Ionenströme wurden ab dem vierten Tag nach Injektion von mRNA in die *Xenopus* Oozyten gemessen. Die Dauer der NMDA-Applikation betrug jeweils eine Minute.

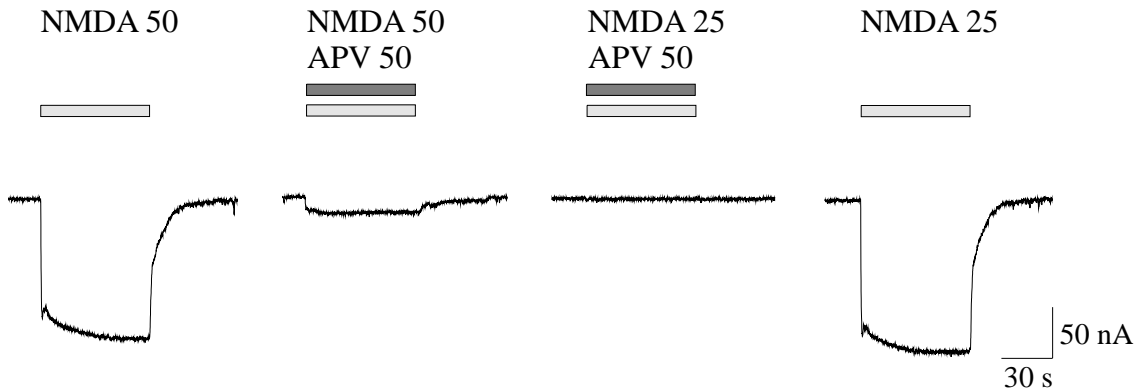
Nach Rezeptorkanalaktivierung durch NMDA folgte initial ein schneller Ioneneinwärtsstrom. Dieser initiale Ionenstrom überschritt nach circa einer Sekunde sein Maximum und wurde dann kleiner. Je nach Zelle war der initiale Einwärtsstrom in seiner Größe sehr variabel und in einigen Fällen gar nicht ausgebildet (vergl. Abb. 3.3A und Abb. 3.4). Im Laufe der Applikation nahm der Ionenstrom dann wieder in unterschiedlichem Maße zu. Beim Auswaschen des Agonisten NMDA kam es zu einer rasch einsetzenden Verminderung des Ionenstromes bis auf die Grundlinie. Abbildung 3.3A zeigt eine typische Originalregistrierung, Abbildung 3.3B den schematischen Aufbau des NMDA-Rezeptorkanals. Aus früheren Publikationen geht hervor, dass es sich bei dem initialen Ionenstrom um einen schnellen Chloridausstrom handelt. Er wird

ausgelöst durch Kalzium, welches nach Rezeptoraktivierung durch die geöffnete NMDA-Ionophore in die Zelle strömt und dort einen endogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chlorid-Ionenkanal aktiviert. Rasch überschreitet dieser Chloridausstrom sein Maximum, und es folgt ein Natriumeinstrom, der den Kurvenverlauf im weiteren kennzeichnet (vergl. Mayer und Westbrook, 1987).

Bei der Koapplikation des spezifischen NMDA-Rezeptorkanal-Antagonisten APV ( $50 \mu\text{mol/l}$ ) mit  $50 \mu\text{mol/l}$  NMDA wurde der Ionenstrom stark reduziert (Abb. 3.4). Nach Halbierung der Ligandenkonzentration war dann kein Ionenstrom mehr nachweisbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die beschriebenen Ionenströme über die Aktivierung von NMDA-Rezeptorkanälen vermittelt werden (Watkins und Olverman, 1987). Die komplette Hemmung der Ionenströme durch Reduktion der Ligandenkonzentration um die Hälfte (wie im abgebildeten Versuch dargestellt) veranschaulicht den bekannten kompetitiven Hemmungsmechanismus von APV.



**Abb. 3.3:** Charakteristische Ionenströme an mRNA injizierten Oozyten nach Applikation des synthetischen Glutamat-Agonisten NMDA. **A:** Originalregistrierung der Ionenströme nach Rezeptoraktivierung durch  $50 \mu\text{mol/l}$  NMDA. Der Balken gibt die Dauer der Substanzapplikation wieder. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial:  $-70 \text{ mV}$ . **B:** Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptorkanals in der Zellmembran. Dargestellt ist der Netto-Einwärtsstrom nach Rezeptorkanalaktivierung. Die Rezeptorbindungsstelle ist dunkelgrau gemustert.



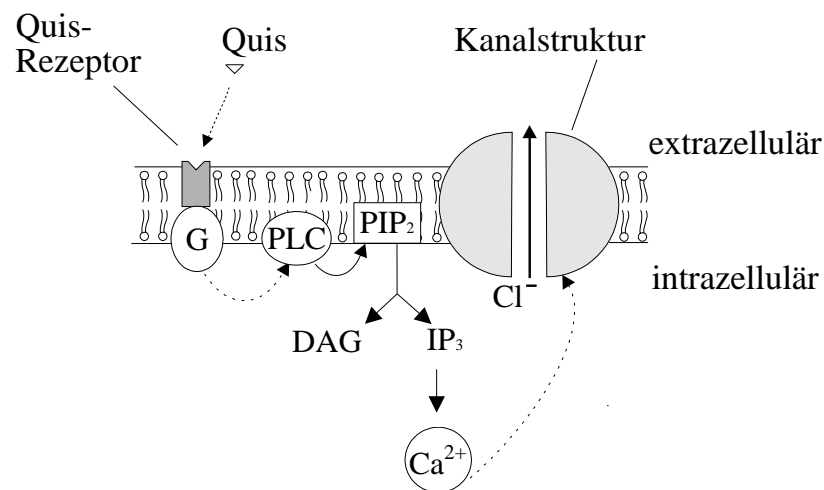
**Abb. 3.4:** Hemmung der transmembranösen Ionenströme durch APV. Die Balken geben die Dauer der Substanzapplikation wieder, wobei der dunkelgrau gemusterte Balken die Gabe des Antagonisten angibt. Messung an einer Oozyte mit 20 min Latenz zwischen den einzelnen Applikationen. APV-Konzentration und NMDA-Konzentration sind in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotenzial betrug  $-70\text{ mV}$ .

### 3.1.3 Analyse der Quisqualat-induzierten Ionenströme

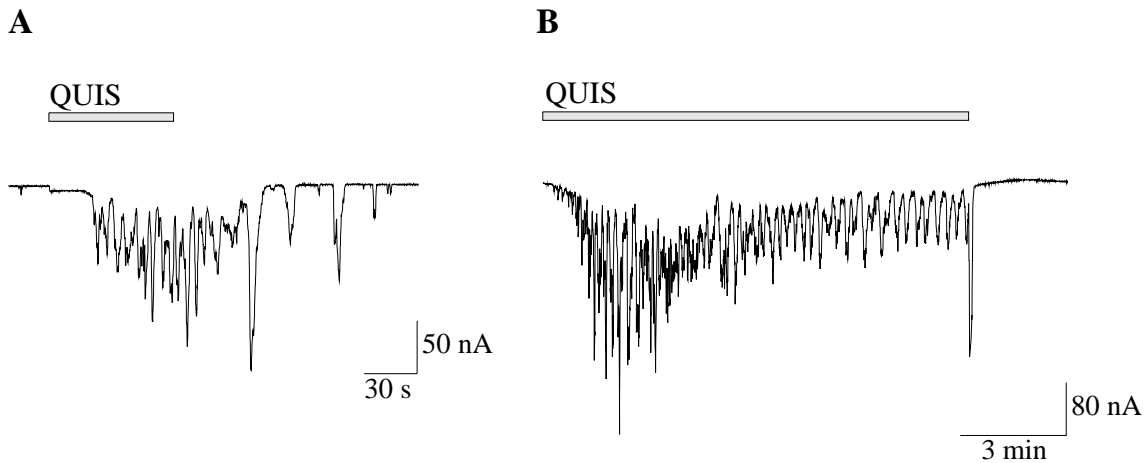
Die Applikation von Quisqualat führte zu transmembranösen Ionenströmen, die zwei Komponenten aufwiesen. Die erste Komponente setzte gleich nach Rezeptoraktivierung ein und kennzeichnete den „glatte“ Kurvenanteil. Die zweite Komponente setzte verzögert ein und war gekennzeichnet durch einen oszillierenden Kurvenverlauf, der die glatte Komponente überlagerte. Der Kurvenverlauf dieser zweiten Komponente war sehr unterschiedlich. In der Regel waren die Amplituden der Oszillationen zu Beginn groß, mit einer deutlichen Verschiebung der Grundlinie. Im Verlauf der Applikation nahm sowohl die Amplitude der Oszillationen als auch das Niveau der Grundlinie der Ionenströme ab, so dass sich die Grundlinie wieder dem eingestellten Haltepotenzial annäherte. Beim Auswaschen des Agonisten Quisqualat konnten zwei verschiedene Reaktionen auftreten: zum einen sistierten die Ionenströme nach Auswaschung (Abb. 3.6B), zum anderen persistierten die Oszillationen lange über das Applikationsende hinaus (Abb. 3.6A). In Abbildung 3.5 ist der

schematische Aufbau des Rezeptors mit der durch seine Aktivierung induzierten metabolischen Kaskade gezeigt.

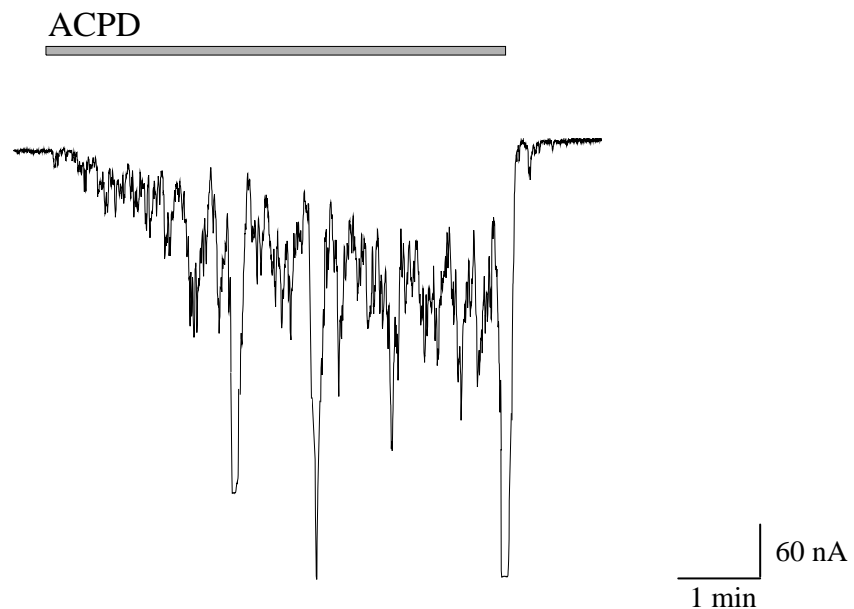
Der Agonist Quisqualat aktiviert, ähnlich wie Kainat, nicht-selektiv den metabotropen Glutamatrezeptor. Quisqualat führt zusätzlich zu einer Aktivierung von AMPA-Rezeptorkanälen (vergl. Keinänen, Wisden, Sommer et al., 1990). Die glatte Komponente im Kurvenverlauf ist hierbei Ausdruck einer Aktivierung von AMPA-Rezeptorkanälen durch Quisqualat. Die zweite Komponente entsteht nach Aktivierung des metabotropen Glutamatrezeptors (mGluR), wobei über ein G-Protein eine metabolische Kaskade in Gang gesetzt wird, welche zu einem Chloridausstrom führt (vergl. Sladeczek et al., 1985; Nicoletti et al. 1986). Die Applikation des selektiven Agonisten für die metabotropen Glutamatrezeptoren ACPD führt dagegen zu Oszillationen ohne die initiale AMPA-induzierte Komponente (s. Abb. 3.7)



**Abb. 3.5:** Schematischer Aufbau des metabotropen Glutamatrezeptors in der Zellmembran. Der Rezeptor ist in der Oozytenmembran an ein G-Protein gekoppelt, welches die Phospholipase C aktiviert. Diese spaltet PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> wiederum setzt Kalzium aus intrazellulären Speichern frei. Diese Erhöhung der zyttoplasmatischen Kalziumionenkonzentration führt dann zur Öffnung von endogenen Chloridkanälen.



**Abb. 3.6:** Originalregistrierung von Ionenströmen an zwei mRNA injizierten Oozyten nach Applikation des synthetischen Glutamat-Agonisten Quisqualat. Die Konzentration von Quisqualat betrug  $10 \mu\text{mol/l}$ . Der Balken gibt die Dauer der Substanzapplikation wieder. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotenzial lag bei  $-60 \text{ mV}$ . In Registrierung A ist ein Beispiel für das Persistieren der Oszillationen nach Auswaschung dargestellt, Abbildung B zeigt das sofortige Sistieren der Oszillationen nach Auswaschung.



**Abb. 3.7:** Originalregistrierung von Ionenströme an einer mRNA injizierten Oozyte nach Applikation des selektiven mGluR-Agonisten ACPD. Die Konzentration von ACPD betrug  $10 \mu\text{mol/l}$ . Mit Beginn der Applikation setzen die Oszillationen ein, die „glatte“ AMPA-Komponente fehlt. Der Balken gibt die Dauer der Substanzapplikation wieder. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Das Haltepotenzial lag bei  $-60 \text{ mV}$ .

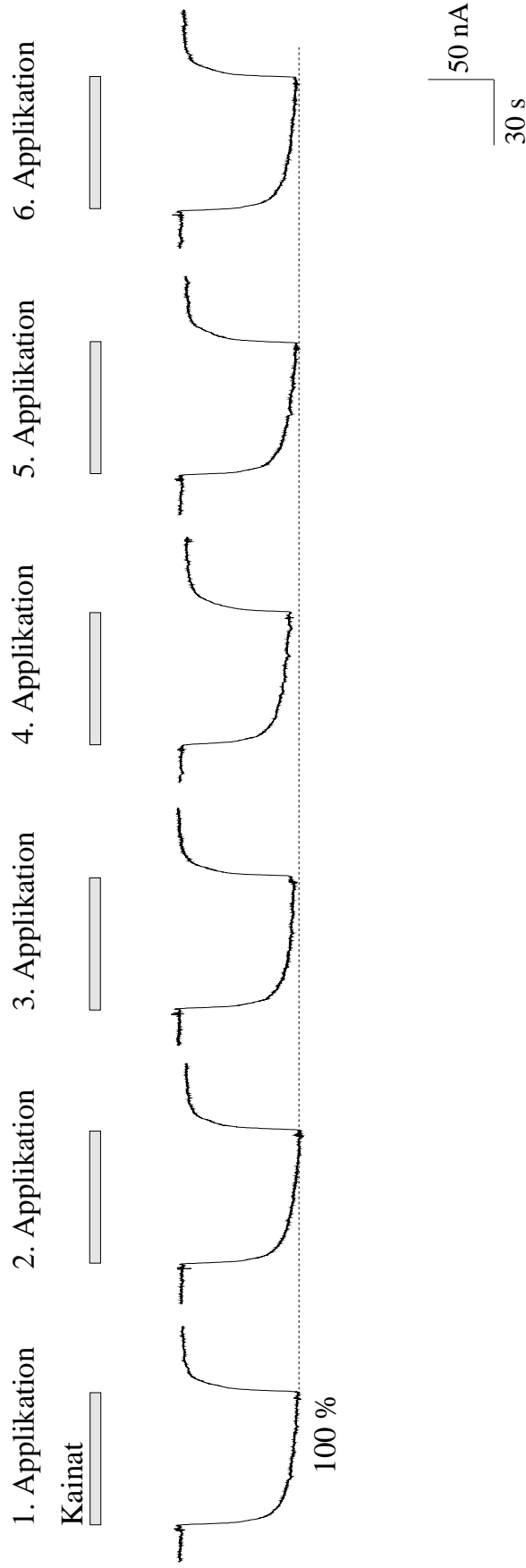
## 3.2. Kontrollversuche

In einer Reihe von Kontrollversuchen wurde zunächst das Verhalten der Glutamat-Rezeptorkanäle bei wiederholter Applikation ihrer jeweils spezifischen Agonisten getestet.

### *3.2.1 Repetitive Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle durch den synthetischen Agonisten Kainat*

Die AMPA-Rezeptorkanäle wurden bis zu sieben Mal im Abstand von jeweils 10 min durch Kainat aktiviert. Die Amplitude und Kinetik der Ionenströme waren bei Anwendung dieses Versuchsprotokolls weitgehend reproduzierbar. In Abbildung 3.8 ist die Originalregistrierung einer solchen Applikationsserie gezeigt. Die serielle Aktivierung von AMPA-Rezeptorkanälen wurde an bis zu 15 Zellen durchgeführt. Kainat wurde dabei jeweils in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Die Amplitude der ersten Aktivierung einer solchen Serie durch Kainat wurde gleich 100 % gesetzt und die Amplituden der folgenden Kainat-induzierten Ionenströme darauf bezogen. Die relativen Amplituden der zweiten Aktivierungen aller Applikationsserien mit Kainat wurden gemittelt, und es wurde die Standardabweichung mit Standardfehler berechnet. Ebenso wurde mit allen dritten bis siebten Aktivierungen verfahren. Die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Eine grafische Darstellung der Mittelwerte ist in Diagramm 3.1 abgebildet.

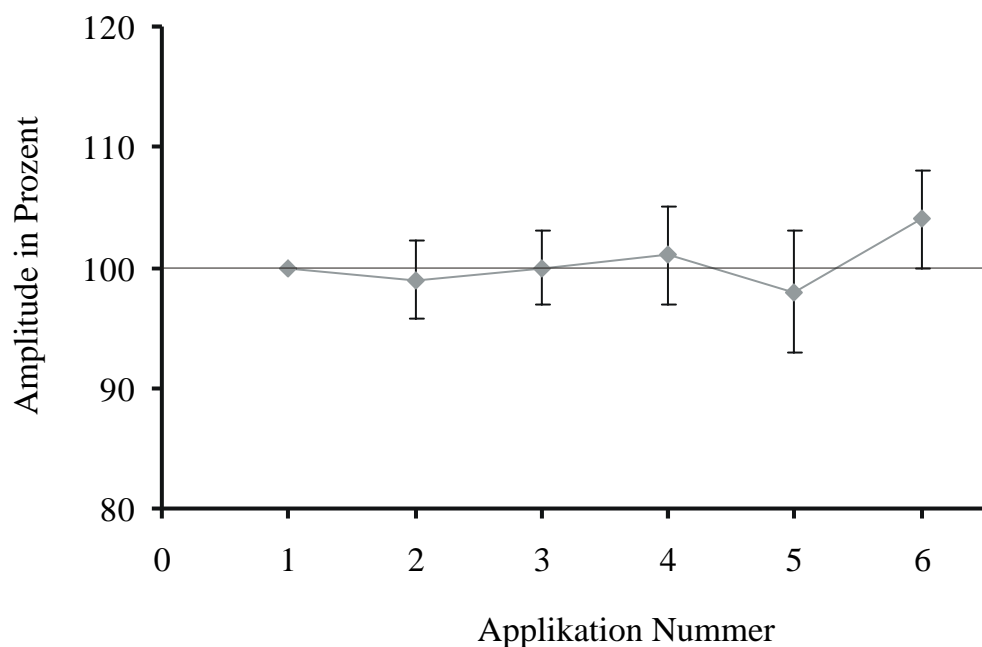




**Abb. 3.8:** Beispiel einer Kontrollreihe. Sechsmalige Applikation von 50  $\mu\text{mol}$  Kainat im Abstand von 10 min an einer mRNA injizierten Xenopus Oozyte. Die Applikationsdauer betrug 1 min. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der ersten Aktivierung durch Kainat. Diese Amplitude wurde gleich 100 % gesetzt. Ausschlag nach unten bei Einwärtsstrom. Das Haltepotenzial betrug -70 mV.

Applikation Nummer	Anzahl der Zellen	Mittelwerte (%)	Standardabweichung	Standardfehler
1	15	100	0	0
2	15	99	± 12	± 3
3	15	99	± 11	± 3
4	10	100	± 13	± 4
5	9	97	± 14	± 5
6	9	104	± 12	± 4
7	7	98	± 13	± 4

**Tab. 3.1.:** Statistische Auswertung der repetitiven Applikation von Kainat: Normierung auf die erste Applikation. Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2. bis 7. Aktivierungen gemittelt und die zugehörigen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler berechnet.

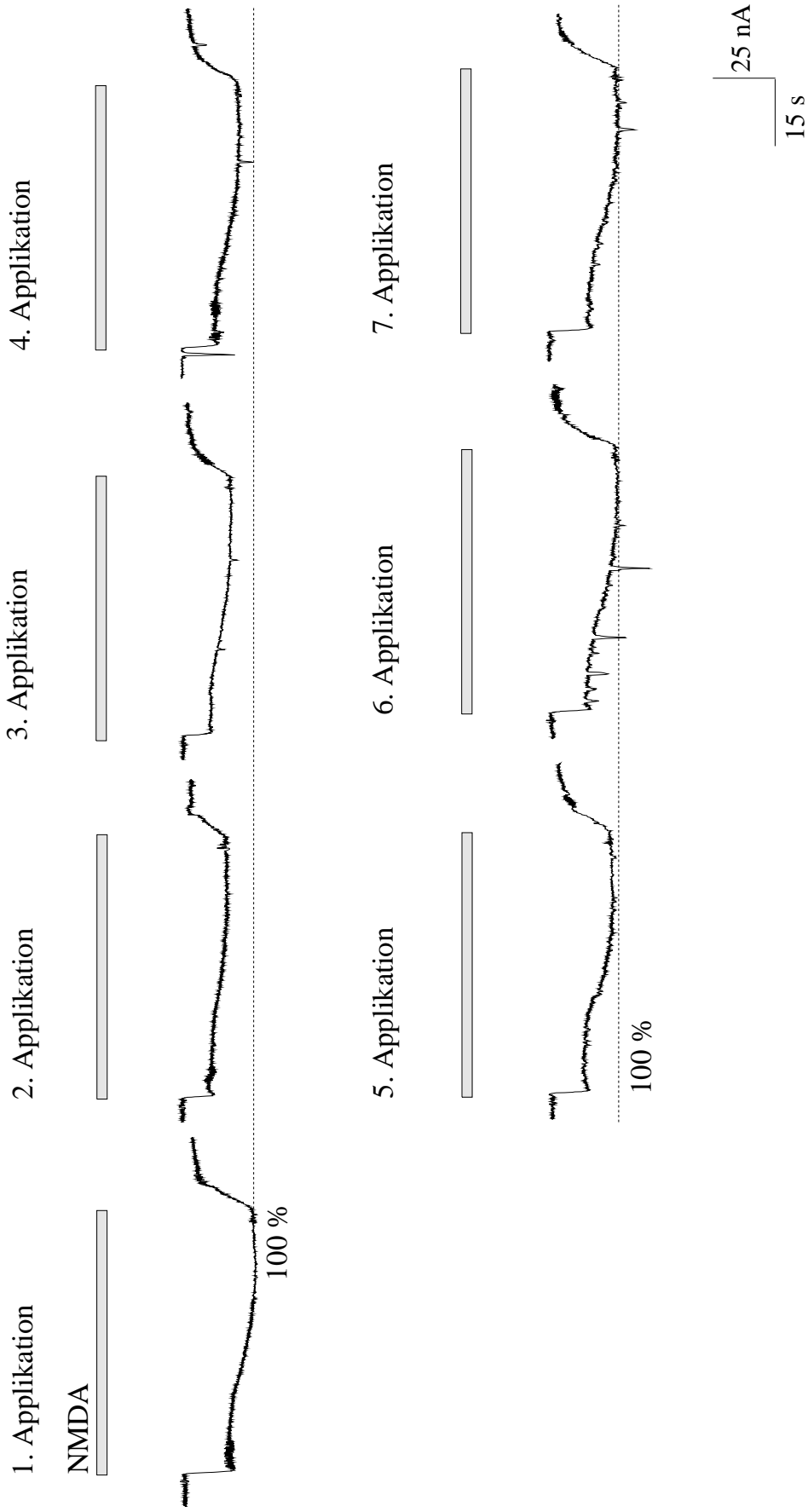


**Diagramm 3.1:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Kainat-induzierten Ionenströme bei repetitiver Applikation von Kainat: Normierung auf die erste Applikation. Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach repetitiver Applikation durch Kainat mit Angabe der Standardfehler.

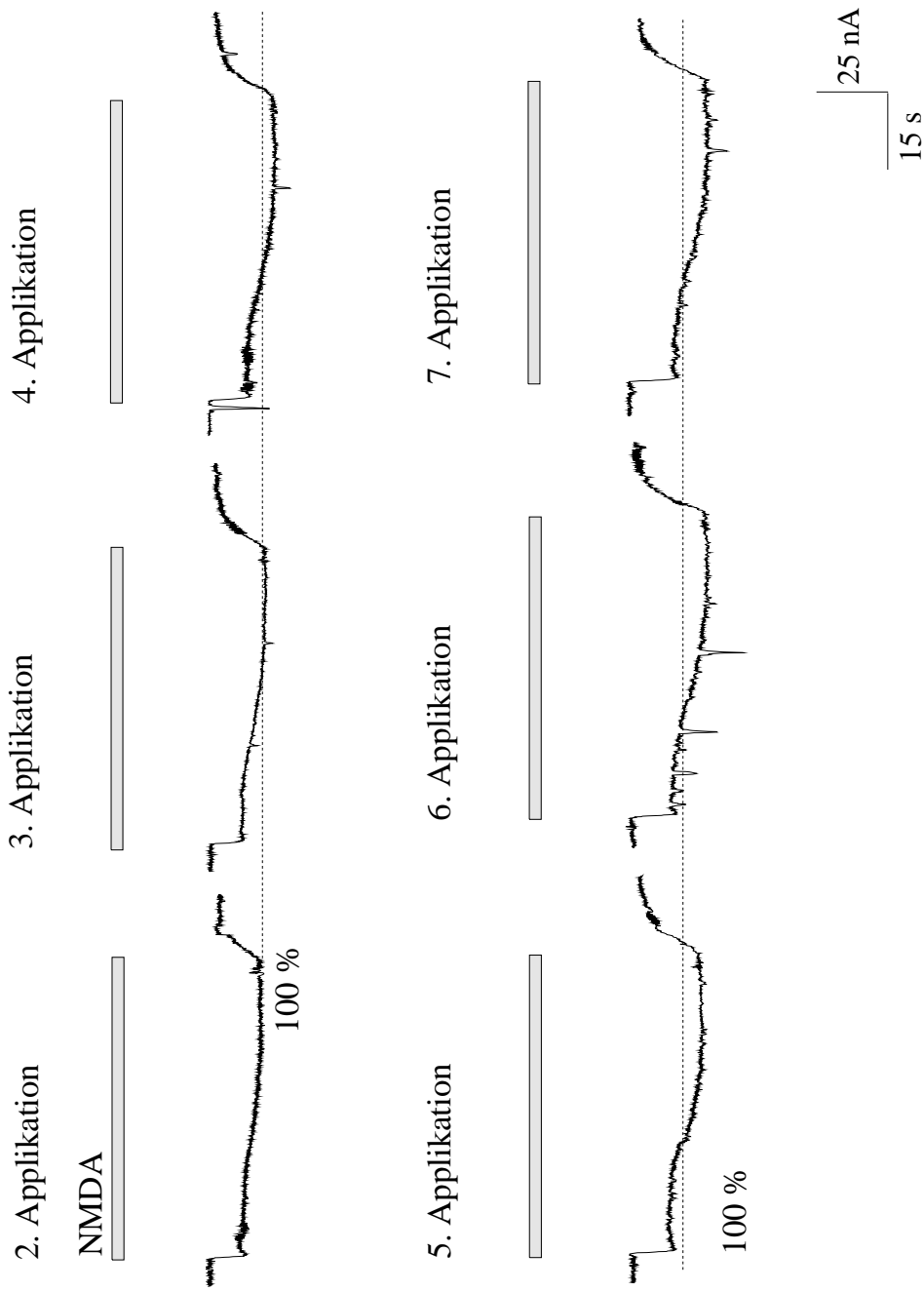
### *3.2.2 Repetitive Aktivierung der NMDA-Rezeptorkanäle durch den synthetischen Agonisten NMDA*

Die NMDA-Rezeptorkanäle wurden bis zu siebenmal im Abstand von jeweils 20 min durch NMDA aktiviert. Die serielle Aktivierung von NMDA-Rezeptorkanälen wurde an 19 Zellen durchgeführt. NMDA wurde jeweils in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Die Amplitude der Ionenströme nach Applikation von NMDA variierte dabei in ihrer Größe. Bei der zweiten Aktivierung des Rezeptorkanals durch NMDA zeigte sich eine signifikante Reduktion der Amplitudengröße (in einem Fall bis auf 34 %), die sich aber bei den folgenden Aktivierungen nicht weiter fortsetzte. Ab der vierten Applikation von NMDA wurden die Ionenströme in den meisten Fällen wieder größer und die Amplitude der siebten Applikation erreichte in vielen Fällen wieder das Niveau der ersten Aktivierung. Sieben Zellen wichen von diesem Antwortmuster ab. Vier dieser Zellen wurden allerdings mit einer anderen Agonisten-Stammlösung gemessen und stammten aus einer anderen Oozyten-Charge (Daten der Einzelversuche s. Tabelle 3.2). Abbildung 3.9 zeigt die Originalregistrierung einer Applikationsserie. Die Amplituden aller zweiten Aktivierungen durch NMDA wurden gemittelt und es wurde die Standardabweichung mit Standardfehler berechnet. Ebenso wurde mit allen dritten bis siebten Aktivierungen verfahren. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt, sowie in Diagramm 3.2 grafisch dargestellt.

Auf Grund des oben beschriebenen Antwortverhaltens der NMDA-Rezeptorkanäle bei repetitiver Applikation von NMDA wurde das Protokoll 2 durchgeführt, bei dem jeweils die erste Antwort verworfen und die zweite Antwort einer Applikationsreihe gleich 100 % gesetzt wurde (s. Abschnitt 2.3.2). In Abbildung 3.10 ist die Normierung auf die zweite Applikation an Originalkurven gezeigt. Die aus dieser Normierung auf die zweite Antwort resultierenden Mittelwerte sind mit Standardabweichungen und Standardfehlern in Tabelle 3.4 aufgeführt. Diagramm 3.3 stellt grafisch die Mittelwerte mit Standardfehler der Amplituden dar.



**Abb. 3.9:** Beispiel einer Kontrollreihe. Siebenmalige Applikation von 50  $\mu\text{mol}$  NMDA im Abstand von 20 min an einer mRNA injizierten Xenopus Oozyte. Die Applikationsdauer betrug 1 min. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der ersten Aktivierung durch NMDA. Diese Amplitude wurde gleich 100 % gesetzt. Ausschlag nach unten bei Einwärtsstrom. Das Haltepotenzial betrug -70 mV.



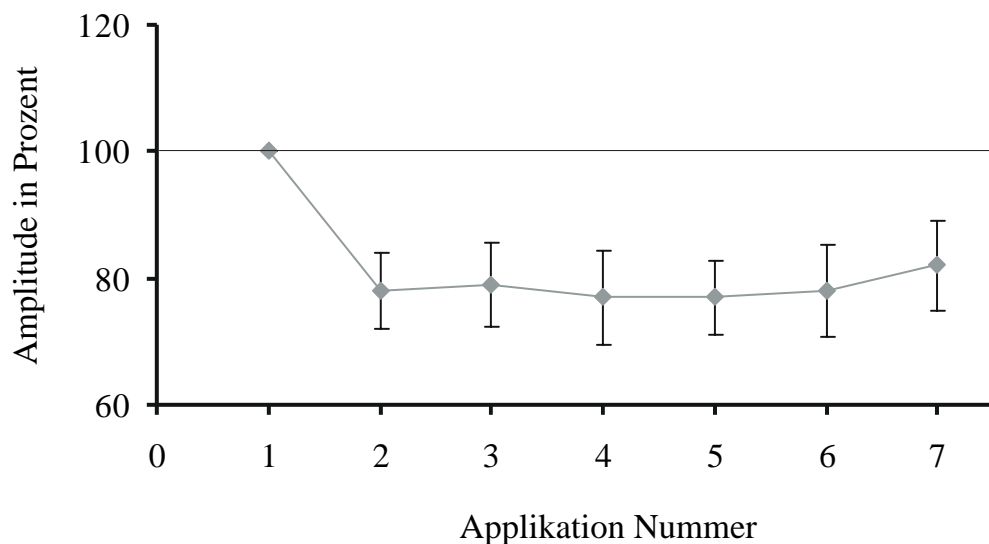
**Abb. 3.10:** Beispiel einer Kontrollreihe. Siebenmalige Applikation von 50  $\mu\text{mol}$  NMDA im Abstand von 20 min an einer mRNA injizierten *Xenopus* Oozyte. Die Applikationsdauer betrug 1 min. Die gestrichelte Linie markiert die Größe der Amplitude der zweiten Aktivierung durch NMDA. Diese Amplitude wurde gleich 100 % gesetzt. Ausschlag nach unten bei Einwärtsstrom. Das Haltepotenzial betrug  $-70$  mV.

Daten der Einzelversuche bei Normierung auf die erste Antwort							
Applikation Nummer							
	2	3	4	5	6	7	8
Zelle	Amplitude in Prozent						
1	100	104					
2	103	100					
3	100	100					
4	79	91					
5	107	121					
6	43	53	65	63			
7	34	31	56	69			
8	100	90	115	110			
9	111	119	121	116	111	111	111
10	74	63	70	68	70	67	63
11	67	74	79	83	89	96	91
12	54	41	49	64	61	58	64
13	100	114	109	91	91	91	100
14	69	53	50	63	50	69	106
15	58	42	33	50	58		
16	113	100	83	67			
17	53	82	94				
18	39	39					
19	85	76	75	81	92	85	85

**Tab. 3.2:** Darstellung der Einzelversuche. Die Normierung erfolgte auf die erste Antwort nach Applikation von NMDA. Dargestellt sind die Amplituden in Prozent nach serieller Applikation von NMDA. Zellen Nummer 1-5 stammen aus einer anderen Oozyten-Charge.

Applikation Nummer	n	Mittelwert (%)	Standardabweichung	Standardfehler	Signifikanz $p < 0,05$
1	19	100	0	0	0
2	19	78	$\pm 23$	$\pm 6$	<0,001
3	19	79	$\pm 28$	$\pm 7$	0,003
4	13	77	$\pm 30$	$\pm 7$	<0,001
5	12	77	$\pm 21$	$\pm 6$	<0,001
6	8	78	$\pm 21$	$\pm 7$	<0,001
7	7	82	$\pm 19$	$\pm 7$	<0,001

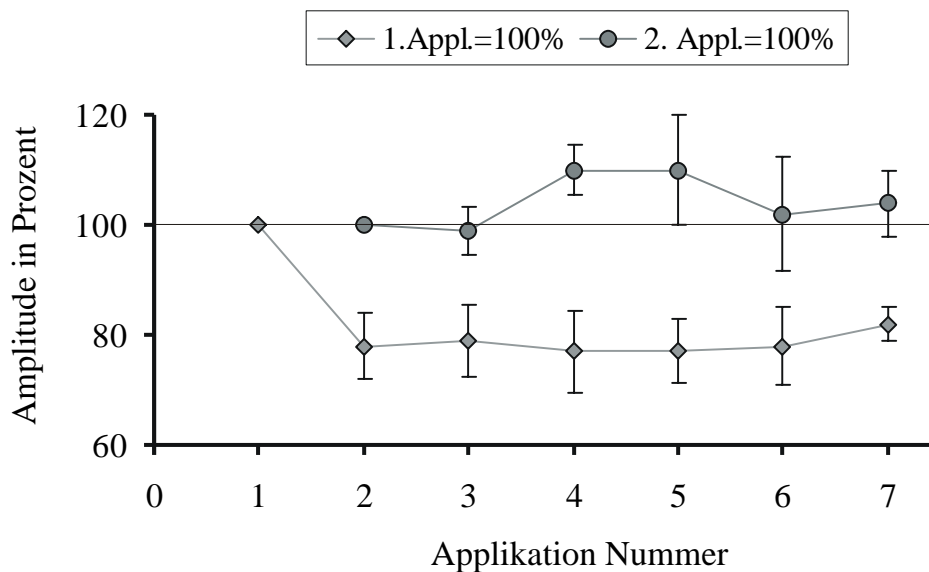
**Tab. 3.3:** Statistische Auswertung der NMDA-induzierten Ionenströme bei repetitiver Applikation von NMDA: Normierung auf die erste Applikation. Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2. bis 7. Aktivierung gemittelt und die zugehörigen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler berechnet. n = Anzahl der Zellen



**Diagramm 3.2:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der NMDA-induzierten Ionenströme bei repetitiver Applikation von NMDA: Normierung auf die erste Applikation. Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach repetitiver Applikation durch NMDA mit Angabe der Standardfehler.

Applikation Nummer	Anzahl der Zellen	Mittelwert (%)	Standardabweichung	Standardfehler
2	19	100	0	0
3	19	99	± 20	± 4
4	13	110	± 35	± 4
5	12	110	± 36	± 10
6	8	102	± 17	± 10
7	7	104	± 24	± 6

**Tab. 3.4:** Statistische Auswertung der NMDA-induzierten Ionenströme bei repetitiver Applikation von NMDA: Normierung auf die zweite Applikation. Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 3. bis 7. Aktivierungen gemittelt und die zugehörigen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler berechnet.

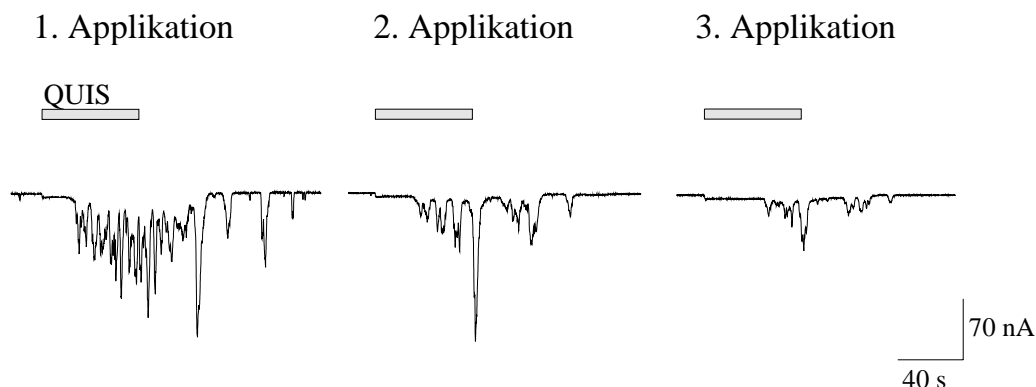


**Diagramm 3.3:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der NMDA-induzierten Ioneneinwärtsströme bei repetitiver Applikation von NMDA: Die erste Aktivierung wurde verworfen, die zweite Aktivierung wurde gleich 100 % gesetzt (Punkte). Zum Vergleich sind die Mittelwerte bei Normierung auf die Amplitude nach erster Aktivierung durch NMDA (Rauten) gezeigt. Alle Werte sind mit dem Standardfehler dargestellt.



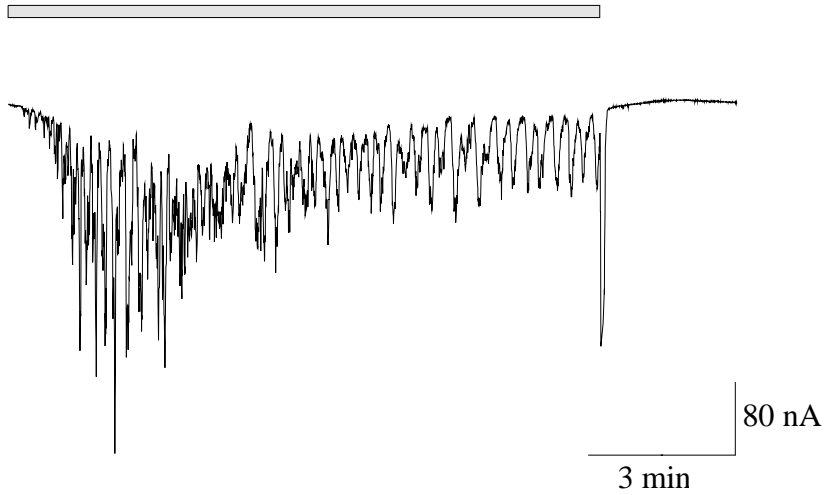
### 3.2.3 Repetitive Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren durch den synthetischen Agonisten Quisqualat

Die metabotropen Glutamatrezeptoren wurden dreimal im Abstand von jeweils 15 min durch 10  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat aktiviert. Bei der ersten Applikation waren jeweils deutliche, oszillierende Einwärtsströme mit Amplituden bis zu 180 nA zu beobachten. Bei der zweiten Rezeptoraktivierung durch Quisqualat veränderten sich die Einwärtsströme: zum einen verlängerte sich die Latenzzeit, d.h. die Zeit von Beginn der Quisqualatapplikation bis zum Auftreten der oszillierenden Ionenströme, zum anderen nahm die Amplitude der Oszillationen deutlich ab. Diese Veränderungen verstärkten sich bei den folgenden Aktivierungen, sodass häufig bei der dritten Applikation kaum noch Reaktionen nachweisbar waren (Abbildung 3.11). Wenn Quisqualat über einen längeren Zeitraum appliziert wurde, z.B. 15 Minuten, konnte man dagegen eine relativ konstante Antwort messen. Sowohl die Amplitudengröße als auch die Grundlinie der Ionenströme stabilisierten sich dabei im Applikationsverlauf. In Abbildung 3.12 ist eine Originalregistrierung gezeigt. Auf Grund dieses Antwortverhaltens bei repetitiver Applikation wurde das Protokoll 3 (siehe 2.3.3) angewendet, bei dem eine kontinuierliche Applikation von Quisqualat mit Einwaschung der Arsensubstanzen erfolgte.



**Abb. 3.11:** Originalregistrierung einer repetitiven Applikation von 10  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat im Abstand von 15 min an einer mRNA injizierten *Xenopus* Oozyte. Der Balken markiert die Applikation von Quisqualat. Die Applikationsdauer betrug 1 min. Das Haltepotenzial lag bei -60 mV. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom.

QUIS



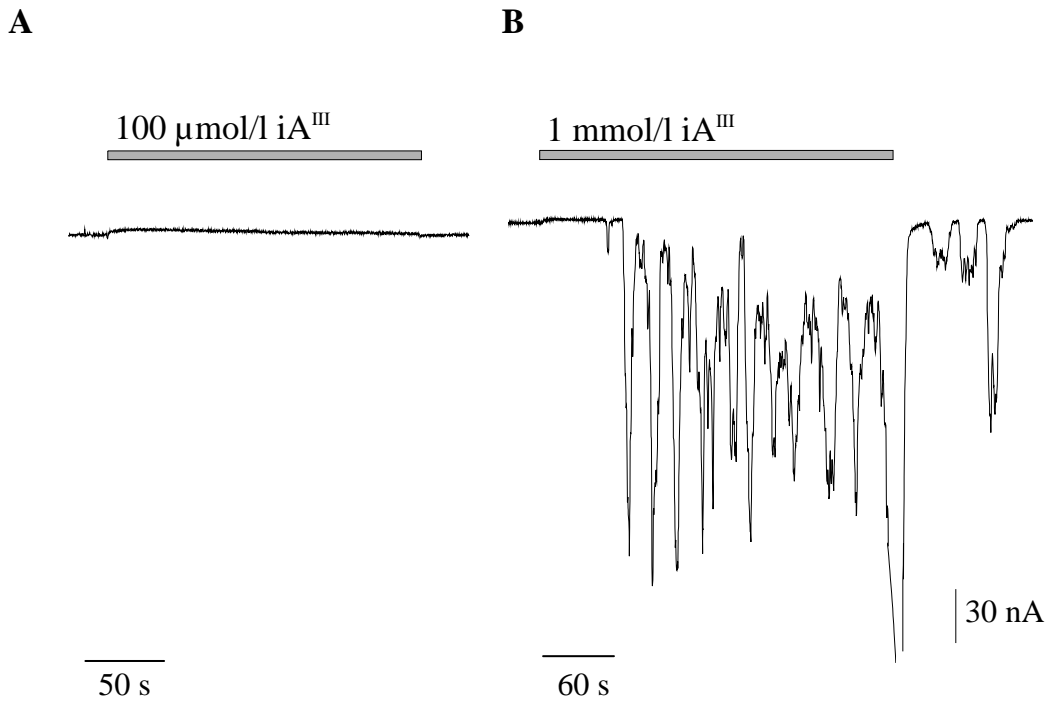
**Abb. 3.12:** Originalregistrierung einer kontinuierlichen Applikation von 10  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat über 15 min an einer mRNA injizierten *Xenopus* Oozyte. Der Balken markiert die Applikation von Quisqualat. Das Haltepotenzial betrug -60 mV. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom

### **3.3 Wirkung von Arsenverbindungen auf die bioelektrischen Eigenschaften von *Xenopus* Oozyten**

Vor der Analyse der Wirkung von Arsenverbindungen auf Glutamat-Rezeptorkanäle wurde überprüft, ob die einzelnen Arsenverbindungen bei alleiniger Applikation messbare elektrophysiologische Effekte an den mRNA-injizierten *Xenopus laevis* Oozyten auslösen. Insgesamt wurden 7 mit mRNA-injizierte *Xenopus* Oozyten gemessen.

#### *3.3.1 Applikation von Arseniger Säure ( $iA^{III}$ )*

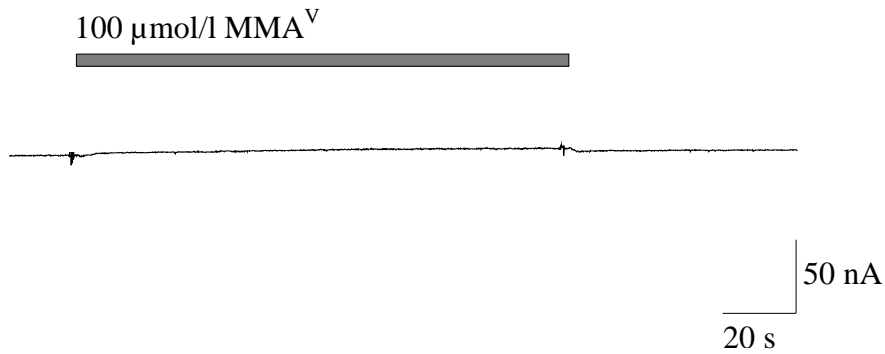
Arsenige Säure ( $iA^{III}$ ) wurde in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$  und 1000  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Die Substanz bewirkte im Konzentrationsbereich zwischen 0,1-100  $\mu\text{mol/l}$  bei keiner der gemessenen Oozyten eine Änderung der transmembranösen Halteströme (Abbildung 3.13 A). Bei Applikation von 1  $\text{mmol/l}$  traten jedoch nach einigen Minuten an den gemessenen Zellen oszillierende transmembranöse Ionenströme auf, die verschieden stark ausgeprägt waren (Abbildung 3.13 B). Diese Oszillationen ähnelten in Kinetik und Amplitude den Quisqualat-induzierten Ionenströmen, zeigten im Unterschied dazu jedoch keine „glatte“ Komponente. Mit Auswaschung von 1  $\text{mmol/l}$   $iA^{III}$  gingen die oszillierenden Ionenströme langsam zurück.



**Abb. 3.13:** Applikation von Arseniger Säure (  $iA^{III}$  ) an injizierten Xenopus Oozyten. **A:** Applikation von 100 µmol/l  $iA^{III}$  über einen Zeitraum von 2 min. **B:** Applikation von 1 mmol/l  $iA^{III}$  über einen Zeitraum von 5 min. Der graue Balken kennzeichnet die Applikationsdauer, das Haltepotenzial betrug -60 mV. Ausschlag nach unten bei Ionen-einwärtsstrom.

### 3.3.2 Applikation von Monomethylarsonsäure ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ )

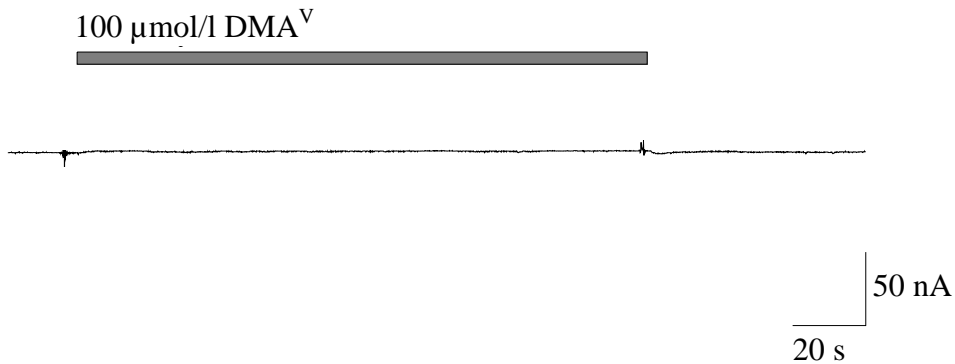
Monomethylarsonsäure ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) wurde in Konzentrationen von 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Bei der Applikation von Monomethylarsonsäure im Konzentrationsbereich von 1-100  $\mu\text{mol/l}$  zeigte sich auch bei einer Applikationsdauer über einer Minute kein Substanzeffekt auf die transmembranösen Halteströme. In Abbildung 3.14 ist eine typische Originalregistrierung dargestellt.



**Abb. 3.14:** Applikation von Monomethylarsonsäure ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) an einer injizierten *Xenopus* Oozyte. Die Applikationsdauer betrug 2 min. Der graue Balken kennzeichnet die Applikationsdauer, das Haltepotenzial betrug -60 mV. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

### 3.3.2 Applikation von Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>)

Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>) wurde in Konzentrationen von 1 µmol/l, 10 µmol/l und 100 µmol/l appliziert. Bei der Applikation von Dimethylarsinsäure im Konzentrationsbereich von 1-100 µmol/l zeigte sich auch bei einer Applikationsdauer von über einer Minute kein Substanzeffekt auf die transmembranösen Halteströme. In Abbildung 3.15 ist eine typische Originalregistrierung dargestellt.



**Abb. 3.15:** Beispiel einer Applikation von 100 µmol/l Dimethylarsinsäure an einer injizierten *Xenopus* Oozyte. Die Applikationsdauer betrug 2 min. Der graue Balken kennzeichnet die Applikationsdauer, das Haltepotenzial betrug -60 mV. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

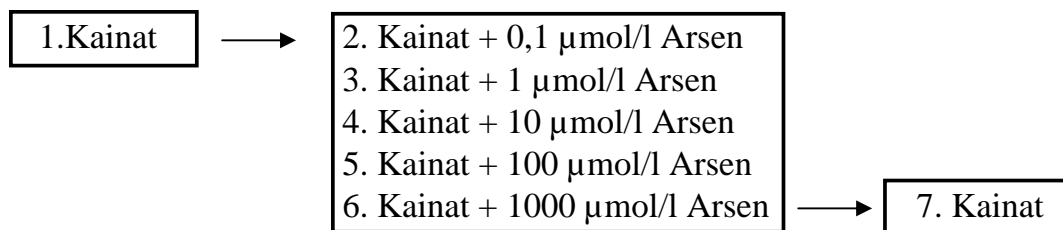
### 3.4. Wirkungen von Arsenverbindungen auf Glutamat-Rezeptorkanäle

In den folgenden Versuchsreihen wurden die Arsensubstanzen Arsenige Säure ( $iA^{III}$ ; 3.4.1), Monomethylarsonsäure ( $MMA^V$ ; 3.4.2) und Dimethylarsinsäure ( $DMA^V$ ; 3.4.3) in unterschiedlichen Konzentrationen an injizierten Oozyten appliziert.

#### 3.4.1 Wirkung von Arseniger Säure

##### 3.4.1.1 Wirkung von Arseniger Säure auf AMPA-Rezeptorkanäle

Die Wirkung von Arseniger Säure auf die AMPA-Rezeptorkanäle wurde durchgeführt wie in 2.3.1 beschrieben. Nach einer Aktivierung mit Kainat als Kontrolle wurde im Abstand von jeweils 10 min Arsenige Säure in steigender Konzentration koappliziert. Es ergab sich folgende Applikationsreihe:



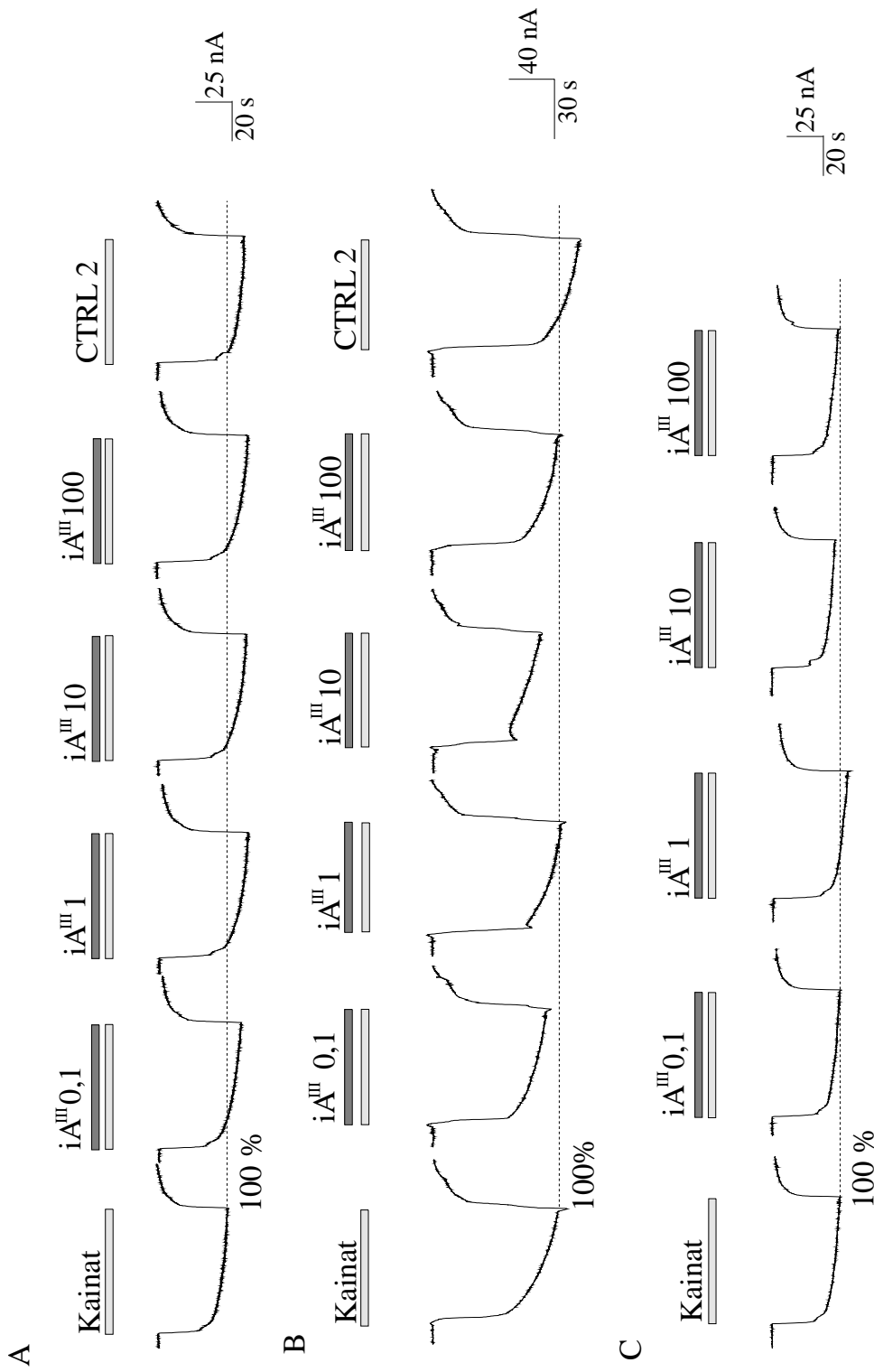
Die Konzentration von Kainat zur Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle betrug bei zwei Zellen 25  $\mu\text{mol/l}$ , bei sieben Zellen 50  $\mu\text{mol/l}$ . Die Versuche erfolgten an defollikulierten Zellen, einige Originalregistrierungen sind in der Abbildung 3.16 gezeigt. Bei Koapplikation von Kainat und Arseniger Säure konnten folgende Veränderungen registriert werden:

Zwei Zellen zeigten eine Amplitudengröße von 130 % bei Applikation von 1000  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure. Eine dieser Zellen zeigte schon bei einer Arsenkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  eine Amplitudenvergrößerung von 117 % und bei 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$  eine Steigerung auf 128 %. Bei einer weiteren Zelle vergrößerte sich der Ionenstrom auf 120 % bei 1000  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure.

Auch bei dieser Zelle war schon bei den geringen Arsenkonzentrationen (0,1 und 1  $\mu\text{mol/l}$ ) eine Amplitudenvergrößerung auf 109 % zu beobachten. Bei 10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen erhöhte sich die Amplitude auf 115 % und bei 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen stieg sie auf 121 %. Diese Beeinflussung von Ionenströmen ist in Abbildung 3.16A anhand von Originalregistrierungen beispielhaft dargestellt. Eine Zelle zeigte eine deutliche Verkleinerung der Amplitude auf 83 % bei der Applikation von 1000 und 100  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure. Eine Zelle wies eine Reduktion der Amplitude auf 88 % bei einer Arsenkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  auf. Eine weitere Zelle zeigte schon bei 10  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure eine Reduktion des Ionenstroms auf 85 %. Diese Hemmung von Ionenströmen ist in Abbildung 3.16B anhand von Originalregistrierungen beispielhaft dargestellt.

Alle anderen Zellen wiesen nur eine geringe Schwankung ihrer Amplituden-größe bei den Arsenapplikationen auf (z.B. Abb. 3.16 C). In Tabelle 3.5 sind die Daten der Einzelversuche dargestellt. Die einzelnen Oozyten sind jeweils auf die gleiche Art präpariert und injiziert, sowie im gleichen Zeitraum mit denselben Agonisten und Arsenstammlösungen gemessen worden. Fasst man alle Versuche statistisch zusammen, so ergibt sich keine signifikante Beeinflussung der Kainat-induzierten Ionenströme durch Arsenige Säure (Tabelle 3.6). Die abschließende Applikation von Kainat (CTRL 2) ergab statistisch ebenfalls keine signifikante Änderungen der Ionenströme (8 Zellen; Mittelwert 106 %; Standardabweichung 11,2; Standardfehler 4;  $p= 0,22$ ). Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse mit der statistischen Auswertung zusammen. In Diagramm 3.4 sind die Mittelwerte der relativen Amplituden nach Arsenapplikation grafisch dargestellt.





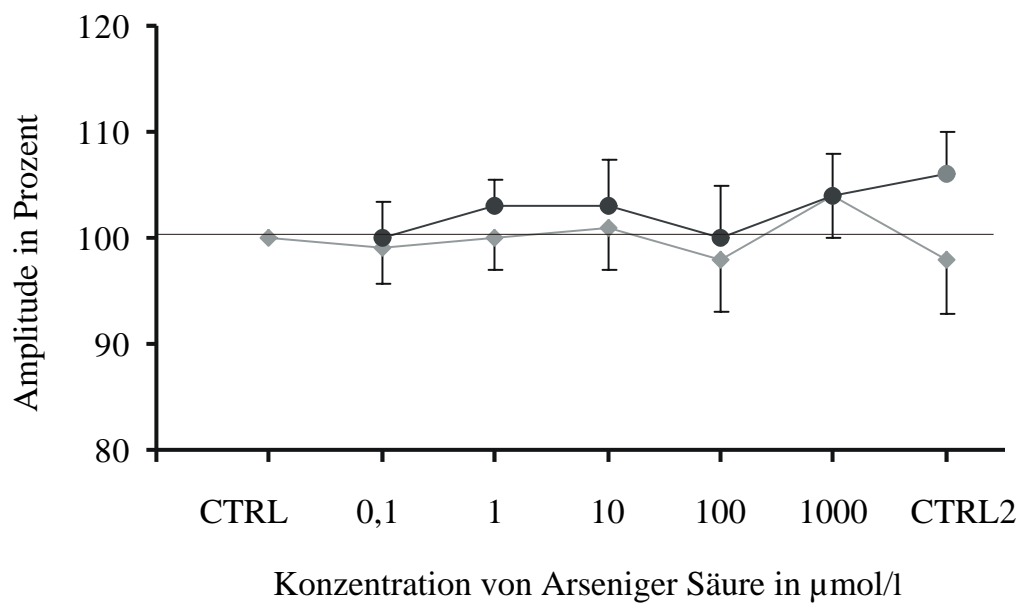
**Abb. 3.16:** Versuchsreihen zur Wirkung von Arseniger Säure (iA<sup>III</sup>) auf Kainat-induzierte Ionenströme: Nach Applikation von Kainat wurde im Abstand von 10 min Arsenige Säure in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 μmol/l mit Kainat koappliziert. **A:** Versuchsreihe mit Vergrößerung der Ionenströme unter Arsenapplikation **B:** Versuchsreihe mit teilweise Verkleinerung der Ionenströme unter Arsenapplikation **C:** Versuchsreihe mit wenig Beeinflussungen der Ionenströme unter Arsenapplikation. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial: -70 mV. CTRL2: Kainat-Applikation am Ende der Versuchsreihe. Hellgrauer Balken: Kainat. Dunkelgrauer Balken: Arsenige Säure.

Arsenige Säure (iA <sup>III</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]						
Zelle	0,1	1	10	100	1000	CTRL 2
1	89 %	103 %	85 %	100 %		116 %
2	105 %	100 %	109 %	91 %		109 %
3	93 %	93 %	93 %	88 %	107 %	102 %
4		111 %	107 %	107 %	129 %	99 %
5		117 %	128 %	128 %	130 %	126 %
6		103 %	95 %	95 %	95 %	95 %
7	109 %	109 %	115 %	121 %	120 %	109 %
8	94 %	95 %	98 %	91 %	86 %	
9	108 %	92 %	96 %	83 %	83 %	92 %

**Tab.: 3.5:** Darstellung der Versuche zur Wirkung von Arseniger Säure: Gezeigt sind die relativen Amplituden der Ionenströme nach Koapplikation von Kainat mit Arseniger Säure (iA<sup>III</sup>) in den Arsenkonzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol}$  und 1000  $\mu\text{mol/l}$ .

Arsen (iA <sup>III</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mittelwerte (%)	Standardabweichung	Standardfehler	Signifikanz $p < 0,05$
0,1	6	100	$\pm 9$	$\pm 3$	0,95
1	9	103	$\pm 8$	$\pm 3$	0,31
10	9	103	$\pm 12$	$\pm 4$	0,72
100	9	100	$\pm 14$	$\pm 5$	0,69
1000	7	104	$\pm 12$	$\pm 4$	0,68

**Tab. 3.6:** Statistische Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von Kainat und Arseniger Säure: Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2. bis 6. Aktivierungen gemittelt und mit den Mittelwerten aus den Kontrollversuchen verglichen. Die jeweiligen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler wurden berechnet. n = Anzahl der Zellen.

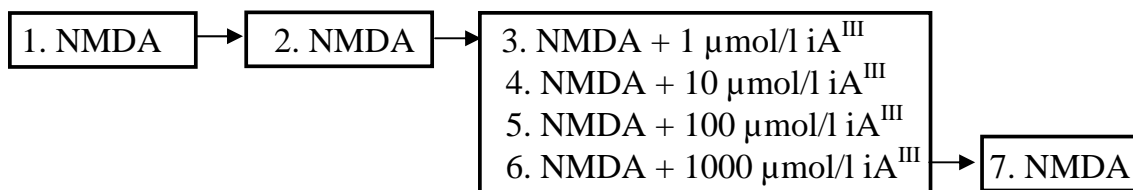


**Diagramm 3.4:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von Kainat und Arseniger Säure: Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach Koapplikation von Kainat und Arseniger Säure (dunkelgraue Punkte). Die hellgrauen Rauten zeigen die statistische Auswertung der Ionenströme bei repetierter Applikation von Kainat (Kontrollversuche). CTRL: Kainatapplikation vor Beginn der Versuchsreihe. CTRL2: Kainatapplikation im Anschluß an die Versuchsreihe (grauer Punkt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

### 3.4.1.2 Wirkung von Arseniger Säure auf NMDA-Rezeptorkanäle

Die Wirkung von Arseniger Säure auf die NMDA-Rezeptorkanäle wurde nach dem Protokoll 2 getestet (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Konzentration des synthetischen Agonisten NMDA betrug bei allen Versuchen 50  $\mu\text{mol/l}$ . Vor der Applikation von Arsen wurden die Rezeptorkanäle zweimal durch NMDA aktiviert. Das Intervall zwischen den Rezeptoraktivierungen betrug 20 min. Die Arsenige Säure wurde in Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{mol/l}$  appliziert, beginnend mit 1  $\mu\text{mol/l}$ . Nach der höchsten Arsenkonzentration (1000  $\mu\text{mol/l}$ ) wurde abschließend noch einmal NMDA appliziert.

Daraus ergibt sich folgende Applikationsreihe:

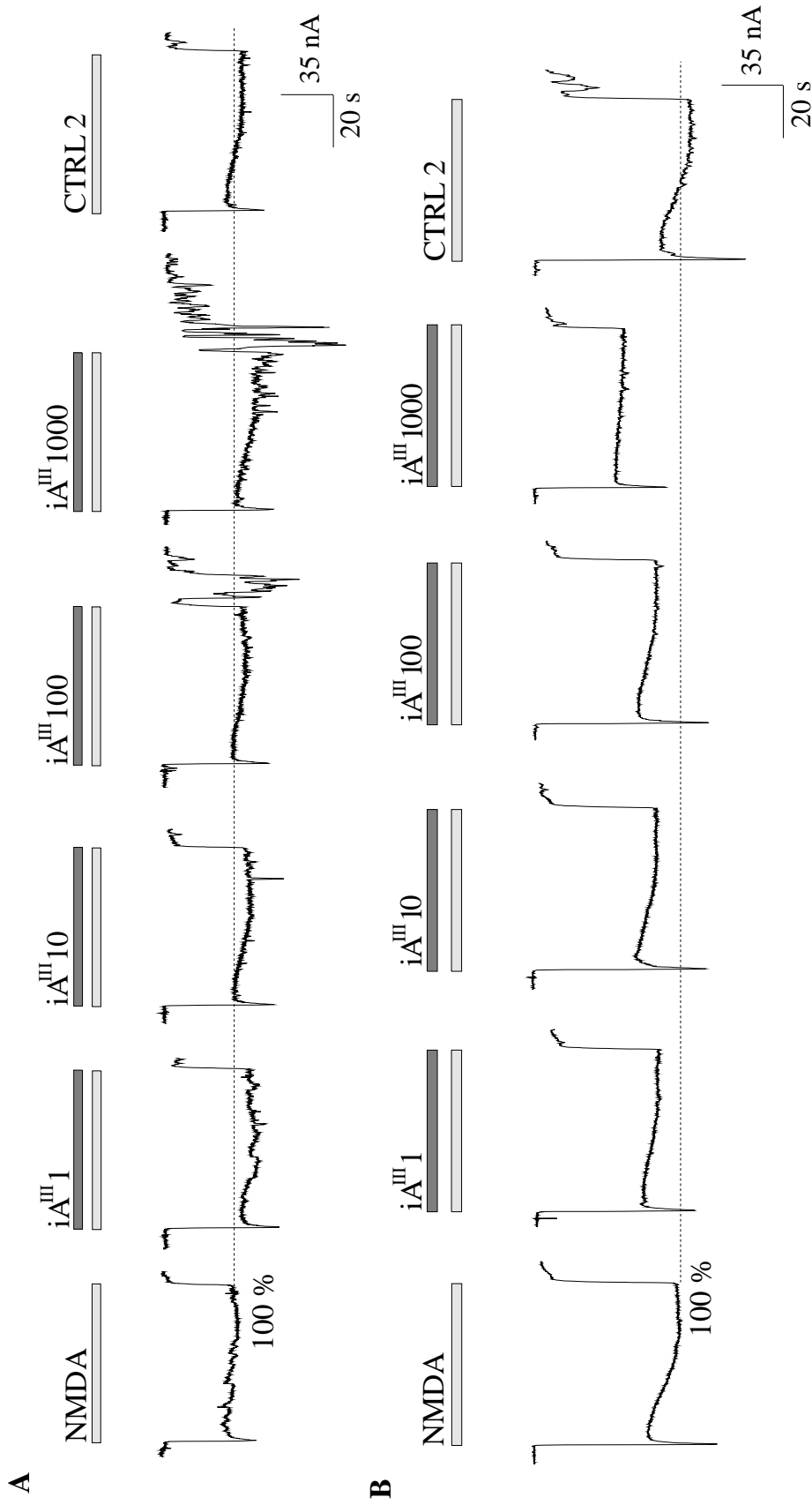


Die Experimente mit Arseniger Säure erfolgten an defollikulierten Zellen. Die Rezeptorkanäle reagierten allerdings sehr uneinheitlich auf die Applikation von Arseniger Säure, wobei die einzelnen Oozyten jeweils auf die gleiche Art präpariert und injiziert wurden, sowie im gleichen Zeitraum mit denselben Agonisten und Arsenstammlösungen gemessen. Die Versuche lassen sich nach ihren Messergebnissen in zwei Gruppen unterteilen: Versuche, bei denen die Applikation von Arseniger Säure eine Steigerung der NMDA-induzierten Ionenströme zeigte, und Versuche, bei denen die Applikation von Arseniger Säure eine Hemmung der NMDA-induzierten Ionenströme zeigte. Dabei konnte eine Zelle bei unterschiedlichen Konzentrationen von Arseniger Säure sowohl Hemmung als auch Induktion der Ionenströme aufweisen. Tabelle 3.7 fasst die Versuchsdaten zusammen.

Eine deutliche Steigerung der Ionenströme auf bis zu 200 % wurde an vier Zellen beobachtet. Die Höhe der Arsenkonzentration korrelierte nicht mit dem Ausmaß der Amplitudensteigerung. Eine Zelle zeigte eine Steigerung der Ionenströme auf 170 % nach Applikation von 1  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure und bei Applikation von 100  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure auf 138 %. Eine weitere Zelle zeigte bei Applikation der höchsten Arsenkonzentration auch die stärkste Steigerung der Stromamplitude. In Abbildung 3.17A ist eine Originalkurve dargestellt.

Eine Hemmung der Ionenströme auf bis zu 64 % der NMDA Kontrolle wurde bei drei Zellen beobachtet. Die Höhe der Arsenkonzentration korrelierte nicht mit dem Ausmaß der Amplitudensteigerung. An zwei Zellen wurden die Ionenströme bei einer Arsenkonzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  am stärksten gehemmt, bei einer anderen Zelle erreichten erst 1000  $\mu\text{mol/l}$  die größte Reduktion, eine weitere Zelle zeigte bei 100  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure eine Reduktion der Ionenströme. In Abbildung 3.17B ist eine Originalkurve dargestellt.

Fasst man alle Versuche statistisch zusammen, so ergibt sich keine signifikante Beeinflussung der NMDA-induzierten Ionenströme durch Arsenige Säure (Tabelle 3.8). Die grafische Darstellung der Statistik ist in Diagramm 3.5 abgebildet. Die Applikation von NMDA nach der höchsten Arsenkonzentration ergab statistisch keine signifikante Änderungen der Ionenströme (3 Zellen; Mittelwert 100 %; Standardabweichung 19; Standardfehler 9,3;  $p=0,32$ ).



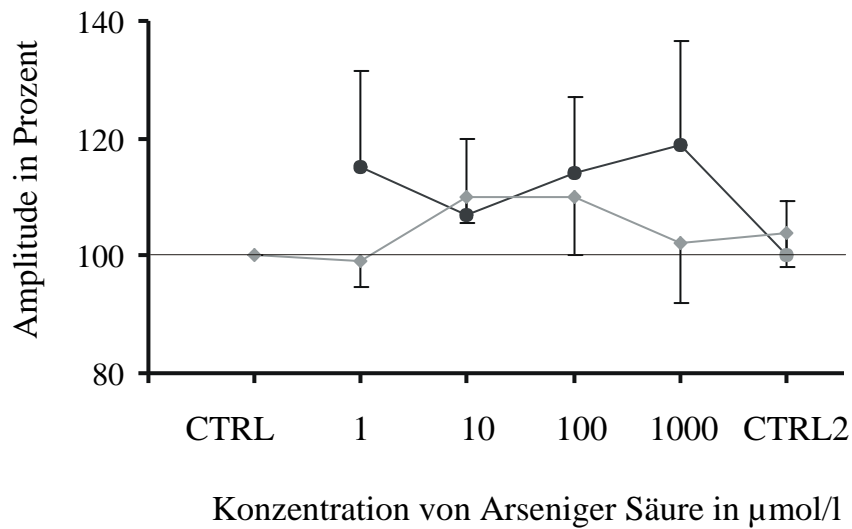
**Abb. 3.17:** Versuchsreihen zur Wirkung von Arseniger Säure ( $iA^{III}$ ) auf NMDA-induzierte Ionenströme: Nach Applikation von NMDA wurde im Abstand von 20 min Arsenige Säure in den Konzentrationen 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{mol/l}$  mit NMDA koappliziert. **A:** Versuchsreihe mit Vergrößerung der Ionenströme unter Arsenapplikation **B:** Versuchsreihe mit Verkleinerung der Ionenströme unter Arsenapplikation Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial:  $-70\text{ mV}$ . CTRL2: NMDA-Applikation am Ende der Versuchsreihe. Hellgrauer Balken: NMDA. Dunkelgrauer Balken: Arsenige Säure.

Arsenige Säure (iA <sup>III</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Zelle	1	10	100	1000	CTRL 2
1	170 %	163 %	163 %	200 %	
2	138 %	138 %	138 %	138 %	125 %
3		105 %	119 %	148 %	
4		112 %	88 %	112 %	102 %
5	141 %				
6	93 %	83 %	92 %	91 %	
7	82 %	79 %	82 %	82 %	82 %
8	64 %	69 %	88 %	64 %	

**Tab.: 3.7:** Darstellung der Versuche zur Wirkung von Arseniger Säure: Gezeigt sind die relativen Amplituden der Ionenströme nach Koapplikation von NMDA mit Arseniger Säure (iA<sup>III</sup>) in den Arsenkonzentrationen 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$  und 1000  $\mu\text{mol}$ .

Arsenige Säure (iA <sup>III</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Arsen (iA <sup>III</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mittelwert (%)	Standardabweichung	Standardfehler	Signifikanz $p < 0,05$
1	6	115	$\pm 41$	$\pm 17$	0,26
10	7	107	$\pm 34$	$\pm 13$	0,88
100	7	114	$\pm 31$	$\pm 12$	0,81
1000	7	119	$\pm 45$	$\pm 18$	0,32

**Tab. 3.8 :** Statistische Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von NMDA und Arseniger Säure: Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 3. bis 6. Aktivierungen gemittelt und mit den Mittelwerten aus den Kontrollversuchen verglichen. Die jeweiligen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler wurden berechnet. n = Anzahl der Zellen.



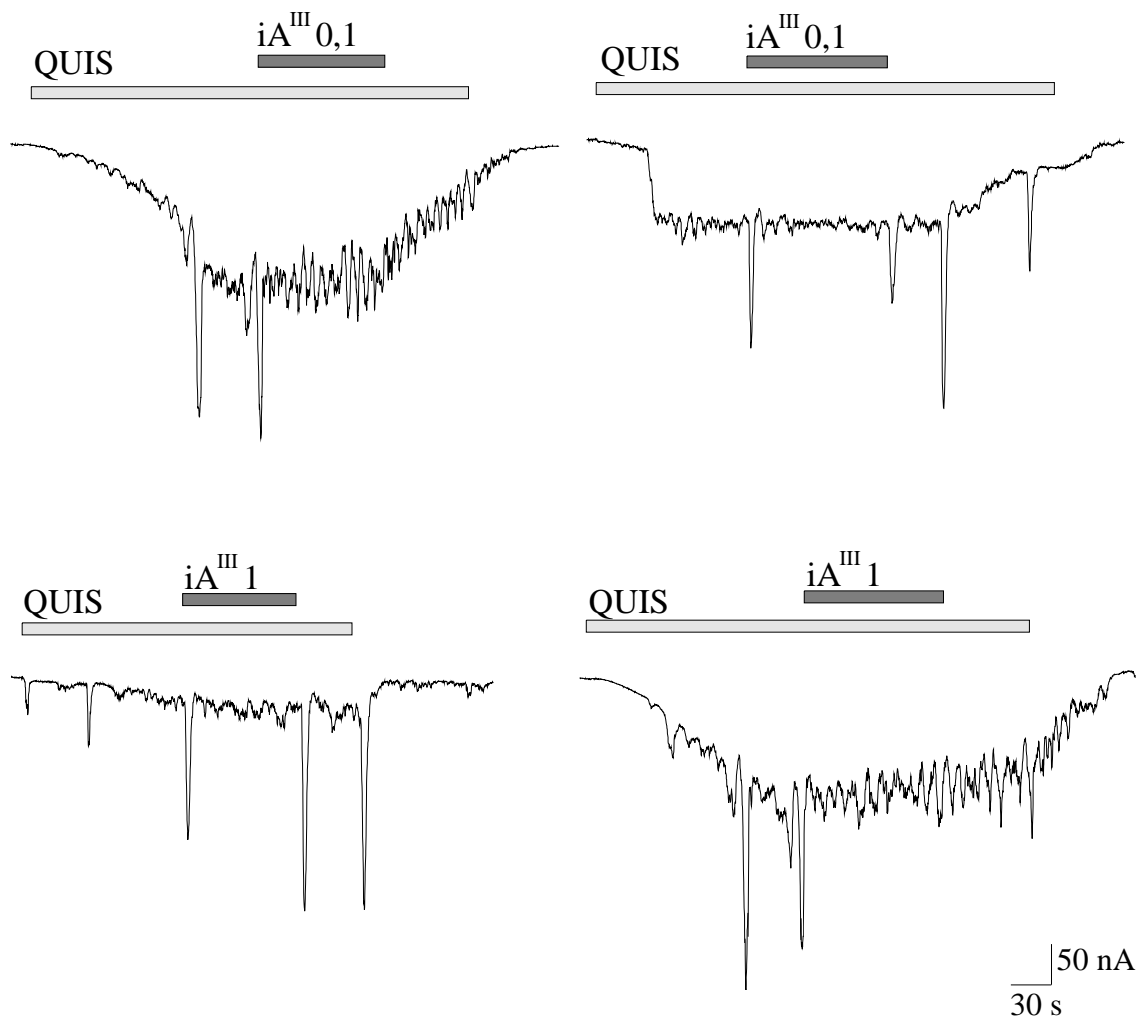
**Diagramm 3.5:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von NMDA und Arseniger Säure: Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach Koapplikation von NMDA und Arseniger Säure (dunkelgraue Punkte). Die hellgrauen Rauten zeigen die statistische Auswertung der Ionenströme bei repetierter Applikation von NMDA (Kontrollversuche). CTRL: NMDA-Applikation vor Beginn der Versuchsreihe. CTRL2: NMDA-Applikation im Anschluss an die Versuchsreihe (grauer Punkt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.



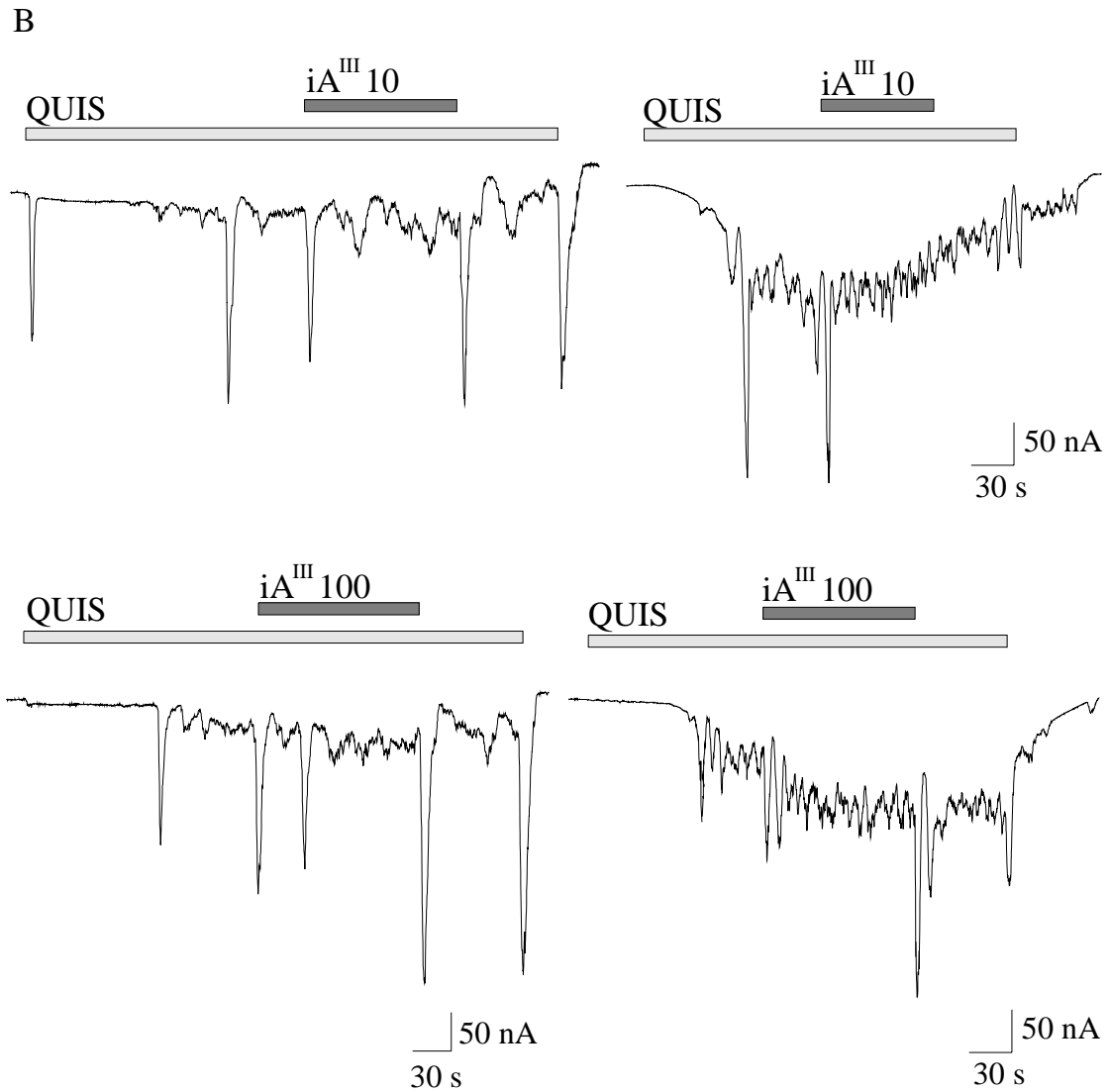
### 3.4.1.3 *Wirkung von Arseniger Säure auf den metabotropen Glutamat-rezeptor*

Die Wirkung von Arseniger Säure auf den metabotropen Glutamatrezeptor wurde nach dem Protokoll 3 getestet. Die Konzentration des synthetischen Agonisten Quisqualat betrug bei allen Versuchen  $1 \mu\text{mol/l}$ . Zunächst wurde der Rezeptor durch Applikation von Quisqualat aktiviert, dann wurde nach unterschiedlich langer Latenz (1-5 min) Arsenige Säure koappliziert. Nach etwa 2 min wurde die Arsenige Säure und Quisqualat zusammen ausgewaschen. Die Ruhezeit zwischen den Rezeptoraktivierungen betrug 15 min. Analysiert wurde Arsenige Säure in den Konzentrationen  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $1 \mu\text{mol/l}$ ,  $10 \mu\text{mol/l}$  und  $100 \mu\text{mol/l}$  an insgesamt fünf verschiedenen Zellen. Die Applikation von Arseniger Säure erfolgte an Zellen mit Follikelzellschichten. Eine quantitative Auswertung ist auf Grund der oszillierenden Ionenströme nicht möglich. Jedoch können größere Abweichung der Stromamplitude und Frequenz der Oszillationen im Sinne einer qualitativen Auswertung festgestellt werden. Wie aus den Originalregistrierungen ersichtlich, lassen sich bei keiner der gemessenen Zellen relevante Abweichungen der Grundlinie oder der Amplitudengröße bei Applikation von Arseniger Säure beobachten. Für die Arsenkonzentrationen  $0,1$  und  $1 \mu\text{mol/l}$  sind in Abbildung 3.18A zwei Originalkurven abgebildet. Für die Konzentrationen  $10$  und  $100 \mu\text{mol/l}$  sind Originalkurven in Abbildung 3.18B gezeigt.

A



**Abb. 3.18 A:** Wirkung von Arseniger Säure auf Quisqualat-induzierte Ionenströme: Koapplikation von 0,1 und 1  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure ( $iA^{III}$ ) und 1  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat. Haltepotenzial: -60 mV. Der hellgraue Balken zeigt die Applikationsdauer des Agonisten Quisqualat an, der dunkelgraue Balken gibt die Applikationsdauer von Arseniger Säure wieder. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

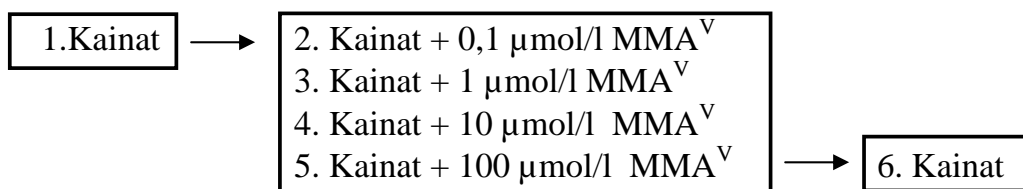


**Abb. 3.18 B:** Wirkung von Arseniger Säure auf Quisqualat-induzierte Ionenströme: Koapplikation von 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$  Arseniger Säure ( $iA^{III}$ ) und 1  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat. Haltepotenzial: -60 mV. Der hellgraue Balken zeigt die Applikationsdauer des Agonisten Quisqualat an, der dunkelgraue Balken gibt die Applikationsdauer von Arseniger Säure wieder. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

### 3.4.2 Wirkung von Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>)

#### 3.4.2.1 Wirkung von Monomethylarsonsäure auf den AMPA-Rezeptorkanal

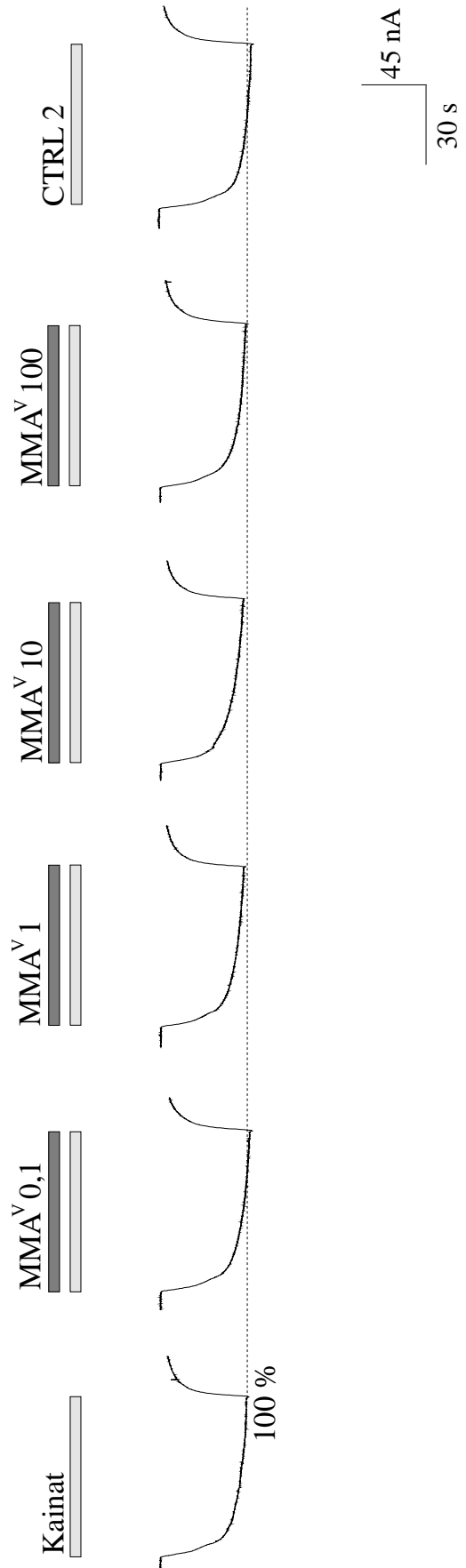
Die Wirkung von Monomethylarsonsäure auf den AMPA-Rezeptorkanal wurde nach Protokoll 1 (Abschnitt 2.3.1) durchgeführt. Die Konzentration von Kainat betrug bei allen Versuchen 50  $\mu\text{mol/l}$ . Monomethylarsonsäure wurde in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Nach einer Aktivierung mit Kainat als Kontrolle wurde im Abstand von jeweils 10 min Monomethylarsonsäure in steigender Konzentration koappliziert. Es ergab sich folgende Applikationsreihe:



Die Untersuchungen wurden an sechs verschiedenen Zellen durchgeführt. Zwei der Zellen waren defollikuliert, die vier anderen Zellen waren noch mit den Follikelzellschichten behaftet. Es konnte kein Unterschied der Arsenwirkung zwischen defollikulierten Zellen und Zellen mit Follikelzellschichten festgestellt werden.

Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  stieg der Ionenstrom bei zwei Zellen an (119 % bzw. 114 % der Kontrollamplitude). Eine Zelle zeigte bei der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  eine Amplitudenvergrößerung auf 111 %. Bei einer anderen Zelle stieg die relative Amplitude der Ionenströme auf 112 % unter 10  $\mu\text{mol/l}$  Monomethylarsonsäure an. Die häufigsten Abweichungen von der Kontrollamplitude wurden bei einer Monomethylarsonsäurekonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  beobachtet. Zwei Zellen zeigten bei dieser Konzentration eine Reduktion der Ionenströme auf 72 % bzw. 77 %. Die Auswertung der Ergebnisse durch den t-Tests für verbundene Stichproben ergab jedoch keine signifikante Beeinflus-

sung der transmembranösen Ionenströme durch Monomethylarsonsäure. Die Applikation von Kainat nach der höchsten Arsenkonzentration ergab statistisch ebenfalls keine signifikanten Änderungen der Ionenströme (5 Zellen; Mittelwert 102 %; Standardabweichung 3,0; Standardfehler 1,6;  $p= 0,80$ ). In Tabelle 3.9 sind die Daten der Einzelversuche dargestellt, Tabelle 3.10 zeigt die Statistik der Versuche (grafische Darstellung der Ergebnisse in Diagramm 3.6). Abbildung 3.19 zeigt repräsentative Originalkurven.



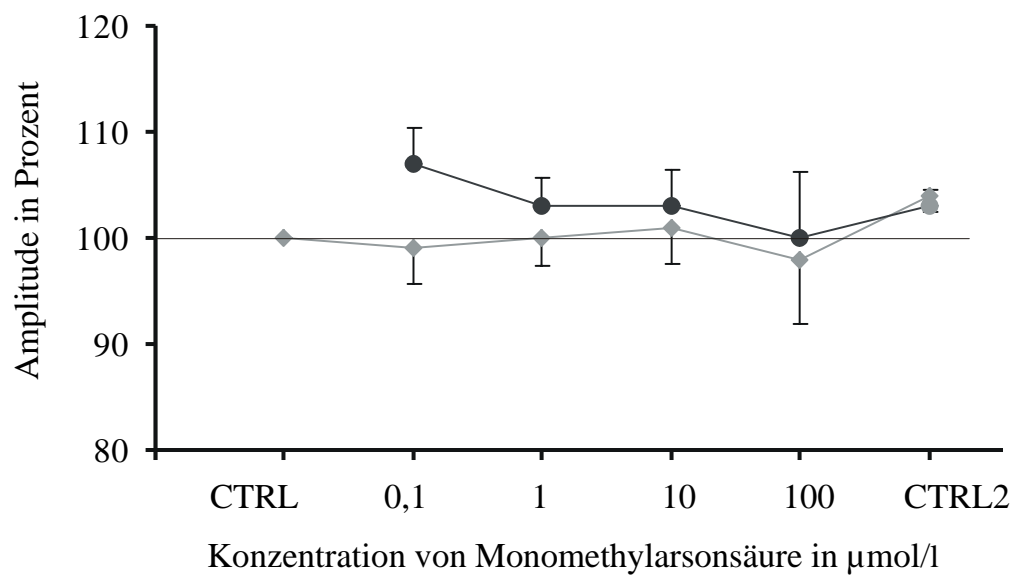
**Abb. 3.19:** Versuchsreihe zur Wirkung von Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>) auf Kainat-induzierte Ionenströme. Nach Applikation von Kainat wurde im Abstand von 10 min Monomethylarsonsäure in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/l}$  mit Kainat koappliziert. Auschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial: -70 mV. CTRL2: Kainat-Applikation am Ende der Versuchsreihe. Hellgrauer Balken: Kainat. Dunkelgrauer Balken: Monomethylarsonsäure.

Monomethylarsonsäure (MMA <sup>V</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Zelle	0,1	1	10	100	CTRL 2
1	107 %	105 %	107 %	103 %	107 %
2	102 %	95 %	97 %	98 %	100 %
3	104 %	94 %	94 %	96 %	102 %
4	119 %	98 %	112 %	112 %	107 %
5	95 %	103 %	90 %	72 %	100 %
6	114 %	111 %	105 %	77 %	

**Tab. 3.9:** Darstellung der Versuche zur Wirkung von Monomethylarsonsäure: Gezeigt sind die relativen Amplituden der Ionenströme nach Koapplikation von Kainat mit Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>) in den Arsenkonzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol}$ . Zellen 3 und 4 waren defollikuliert.

MMA <sup>V</sup> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mittelwerte (%)	Standard- abweichung	Standard- fehler	Signifikanz $p < 0,05$
0,1	6	107	$\pm 9$	$\pm 3$	0,17
1	6	101	$\pm 5$	$\pm 3$	0,83
10	6	101	$\pm 9$	$\pm 4$	1,00
100	6	93	$\pm 14$	$\pm 6$	0,57

**Tab. 3.10:** Statistische Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von Kainat und Monomethylarsonsäure: Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2. bis 5. Aktivierung gemittelt und mit den Mittelwerten aus den Kontrollversuchen verglichen. Die jeweiligen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler wurden berechnet. n = Anzahl der Zellen.

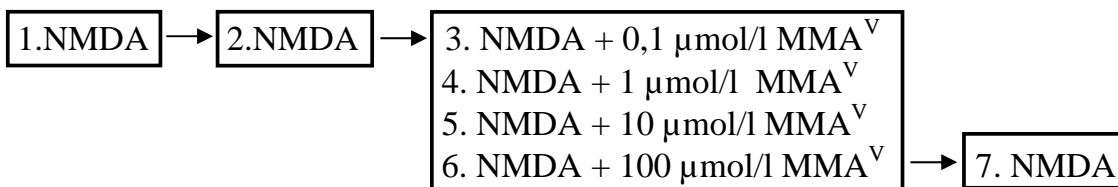


**Diagramm 3.6:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von Kainat und Monomethylarsonsäure: Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach Koapplikation von Kainat und Monomethylarsonsäure (dunkelgraue Punkte). Die hellgrauen Rauten zeigen die statistische Auswertung der Ionenströme bei repetierter Applikation von Kainat (Kontrollversuche). CTRL: Kainatapplikation vor Beginn der Versuchsreihe. CTRL2: Kainatapplikation im Anschluß an die Versuchsreihe (grauer Punkt). Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an.



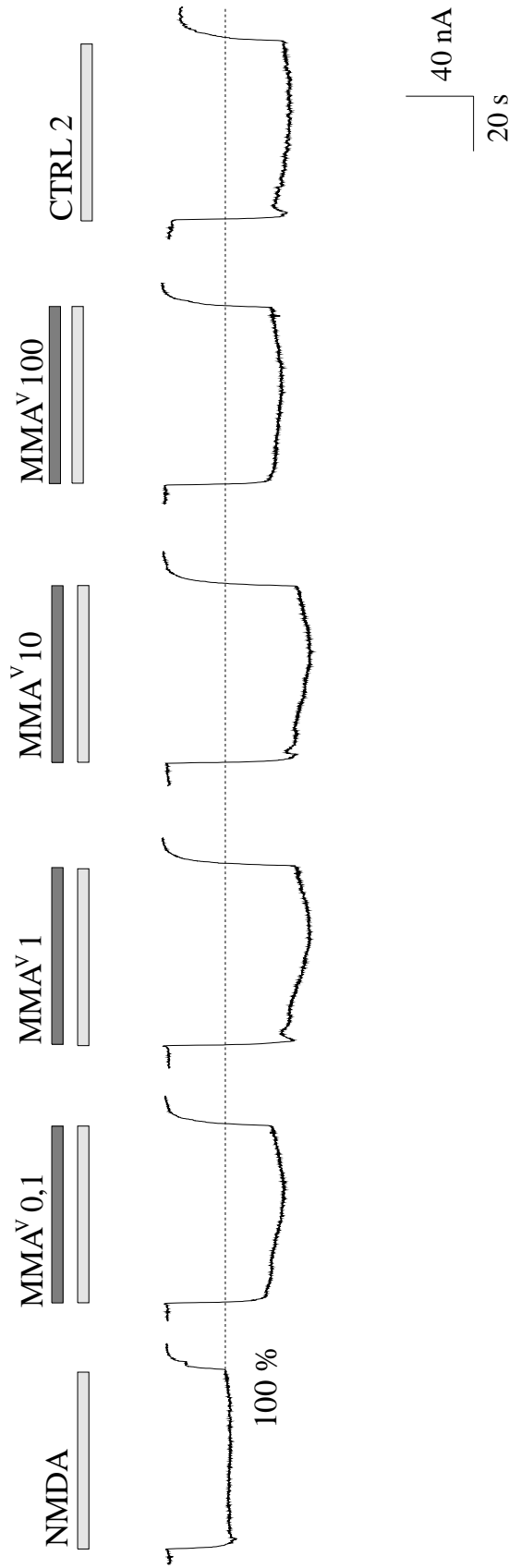
### 3.4.2.2 Wirkung von Monomethylarsonsäure auf den NMDA-Rezeptorkanal

Die Wirkung von Monomethylarsonsäure auf den NMDA-Rezeptorkanal wurde nach dem Protokoll 2 (Abschnitt 2.3.2) getestet. Die Konzentration des synthetischen Agonisten NMDA betrug bei allen Versuchen 50  $\mu\text{mol/l}$ . Getestet wurde Monomethylarsonsäure in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$ . Nach zwei Aktivierung mit NMDA wurde im Abstand von jeweils 20 min Monomethylarsonsäure in steigender Konzentration koappliziert. Es ergab sich folgende Applikationsreihe:



Die Experimente mit Monomethylarsonsäure erfolgten an bis zu 11 verschiedenen Zellen, wobei zwei Zellen defollikuliert waren. Es konnte kein Unterschied der Arsenwirkung zwischen defollikulierten Zellen und Zellen mit Follikelzellschichten festgestellt werden. Fast alle Zellen zeigten eine Steigerung der Ionenströme unter Monomethylarsonsäure. Eine charakteristische Originalkurve ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Bei zwei Zellen reduzierte sich jedoch die Stromamplitude unter Applikation von Monomethylarsonsäure: Nach Applikation von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  und 1  $\mu\text{mol/l}$  auf 63 % bzw. 69 % bei der einen Zelle, auf 85 % der Kontrollamplitude bei Applikation von 100  $\mu\text{mol/l}$  Monomethylarsonsäure bei der anderen Zelle. Die Einzeldaten aller Versuche sind in Tabelle 3.11 zusammen gestellt.

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Steigerung der Ionenströme unter 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  Monomethylarsonsäure (s. Tab. 3.12, grafische Darstellung der Effekte in Diagramm 3.7). Die Ionenströme bei NMDA-Applikation nach 100  $\mu\text{mol/l}$  Monomethylarsonsäure waren ebenfalls deutlich erhöht (z.T. auf 225 %). Diese Steigerung ist aber statistisch nicht signifikant (5 Zellen; Mittelwert 143 %; Standardabweichung 50; Standardfehler 22,3;  $p=0,11$ ).



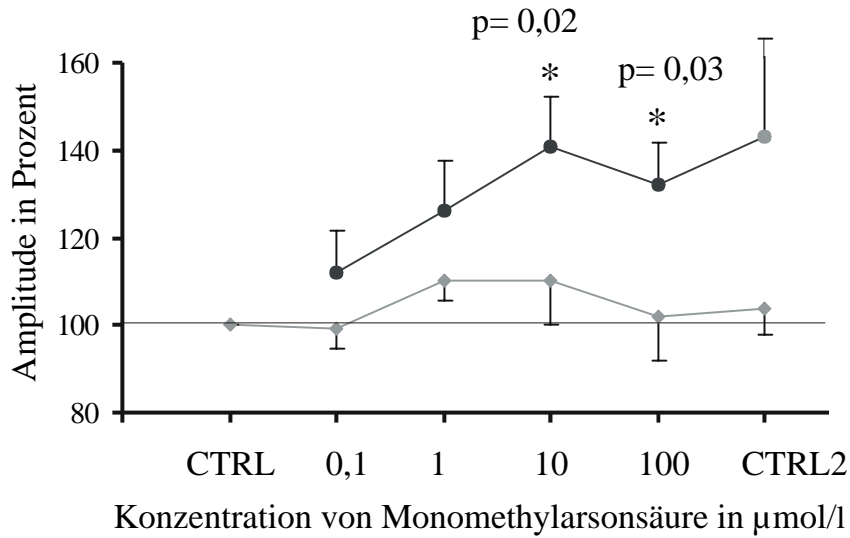
**Abb. 3.20:** Versuchsreihen zur Wirkung von Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>) auf NMDA-induzierte Ionenströme: Nach Applikation von NMDA wurde im Abstand von 20 min Monomethylarsonsäure in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/l}$  mit NMDA koappliziert. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial: -70 mV. CTRL2: NMDA-Applikation am Ende der Versuchsreihe. Hellgrauer Balken: NMDA. Dunkelgrauer Balken: Monomethylarsonsäure.

Monomethylarsonsäure (MMA <sup>V</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Zelle	0,1	1	10	100	CTRL 2
1	92 %	96 %	92 %	146 %	81 %
2	171 %	152 %	196 %	158 %	158 %
3	109 %	132 %	132 %	120 %	
4	182 %	221 %	225 %	182 %	186 %
5	108 %	125 %	121 %	121 %	
6	100 %	143 %	182 %	173 %	
7	103 %	114 %	119 %	108 %	135 %
8	63 %	69 %	163 %	175 %	38 %
9	108 %	131 %	173 %	154 %	200 %
10		111 %	156 %		
11	103 %	115 %	110 %	85 %	113 %

**Tab. 3.11:** Darstellung der Versuche zur Wirkung von Monomethylarsonsäure: Gezeigt sind die relativen Amplituden der Ionenströme nach Koapplikation von NMDA mit Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>) in den Arsenkonzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol}$ . Zellen 2 und 6 waren defolikuliert.

MMA <sup>V</sup> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mittelwerte (%)	Standard- abweichung	Standard- fehler	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
0,1	10	112	$\pm 31$	$\pm 10$	0,23
1	11	126	$\pm 39$	$\pm 12$	0,21
10	11	141	$\pm 36$	$\pm 11$	0,03
100	10	132	$\pm 29$	$\pm 10$	0,02

**Tab. 3.12:** Statistische Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von NMDA und Monomethylarsonsäure: Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 3. bis 6. Aktivierungen gemittelt und mit den Mittelwerten aus den Kontrollversuchen verglichen. Die jeweiligen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler wurden berechnet. n = Anzahl der Zellen.



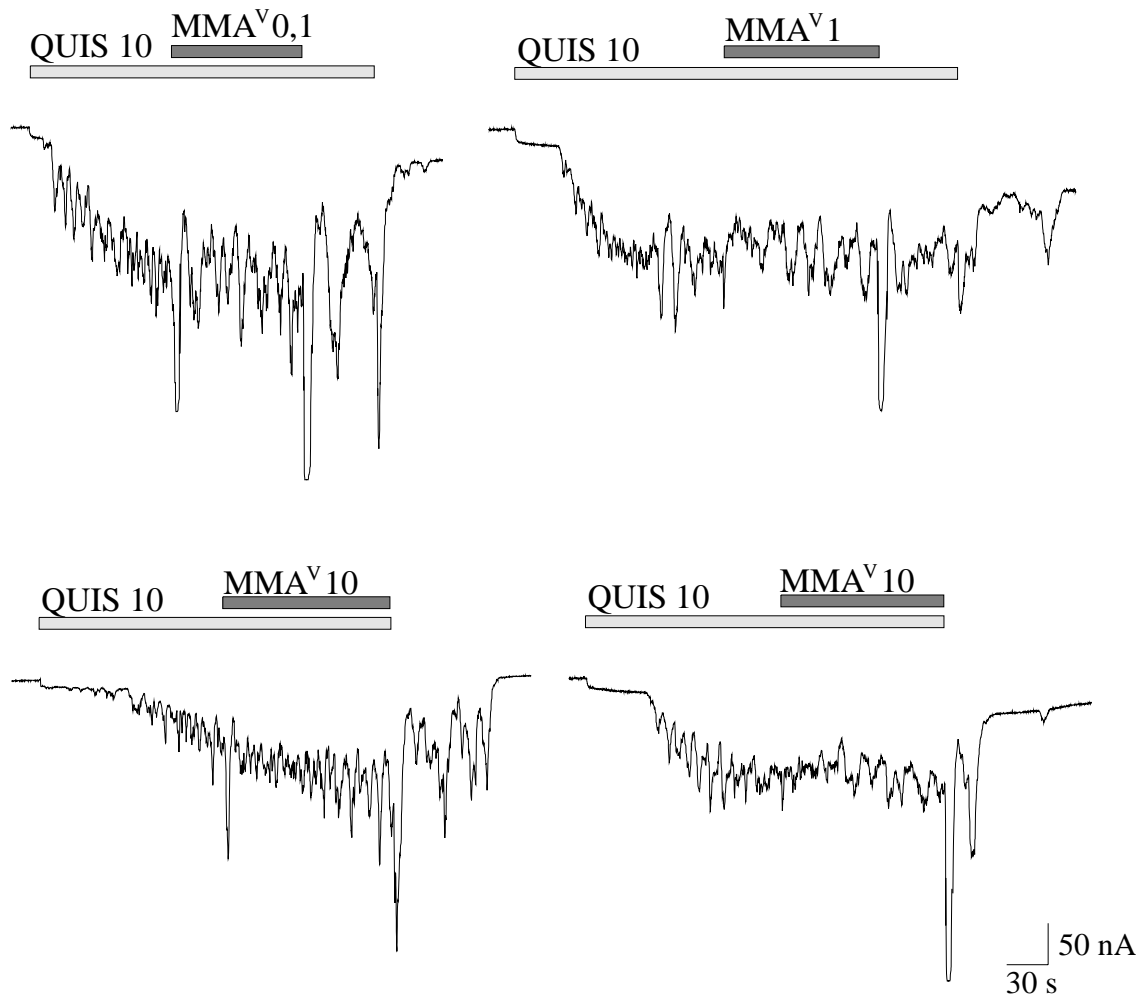
**Diagramm 3.7:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von NMDA und Monomethylarsonsäure: Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach Koapplikation von NMDA und Monomethylarsonsäure (dunkelgraue Punkte). Die hellgrauen Rauten zeigen die statistische Auswertung der Ionenströme bei repetierter Applikation von NMDA (Kontrollversuche). CTRL: NMDA-Applikation zu Beginn der Versuchsreihe. CTRL 2: NMDA-Applikation am Ende der Versuchsreihe (grauer Punkt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.  
\* : signifikant unterschiedliche Messwerte

### 3.3.4.3 Wirkung von Monomethylarsonsäure ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) auf den metabotropen Glutamatrezeptor

Die Wirkung von Monomethylarsonsäure auf den metabotropen Glutamatrezeptor wurde nach dem Protokoll 3 (Abschnitt 2.3.3) getestet. Die Konzentration des synthetischen Agonisten Quisqualat betrug bei allen Versuchen  $10 \mu\text{mol/l}$ . Zunächst wurde der Rezeptor mit Quisqualat aktiviert und dann mit unterschiedlicher Latenzzeit (1-5 min) Monomethylarsonsäure eingewaschen. Nach etwa 2 min wurde die Arsenlösung und Quisqualat zusammen ausgewaschen. Die Ruhezeit zwischen den Rezeptoraktivierungen betrug 15 min. Getestet wurde Monomethylarsonsäure in Konzentrationen von  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $1 \mu\text{mol/l}$ ,  $10 \mu\text{mol/l}$  und  $100 \mu\text{mol/l}$ . Die Applikationen der Arsenkonzentrationen erfolgte an jeweils 5 Zellen mit Follikelzellschicht und an je zwei Zellen, die defollikuliert waren. Es ergab sich kein Unterschied in der Beeinflussung der Ionenströme zwischen Follikelzellen und defollikulierten Zellen bei der Applikation von Monomethylarsonsäure. Für die Arsenkonzentrationen  $0,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $1 \mu\text{mol/l}$ ,  $10 \mu\text{mol/l}$  und  $100 \mu\text{mol/l}$  sind in Abbildung 3.21A und 3.21 B die Originalkurven gezeigt.

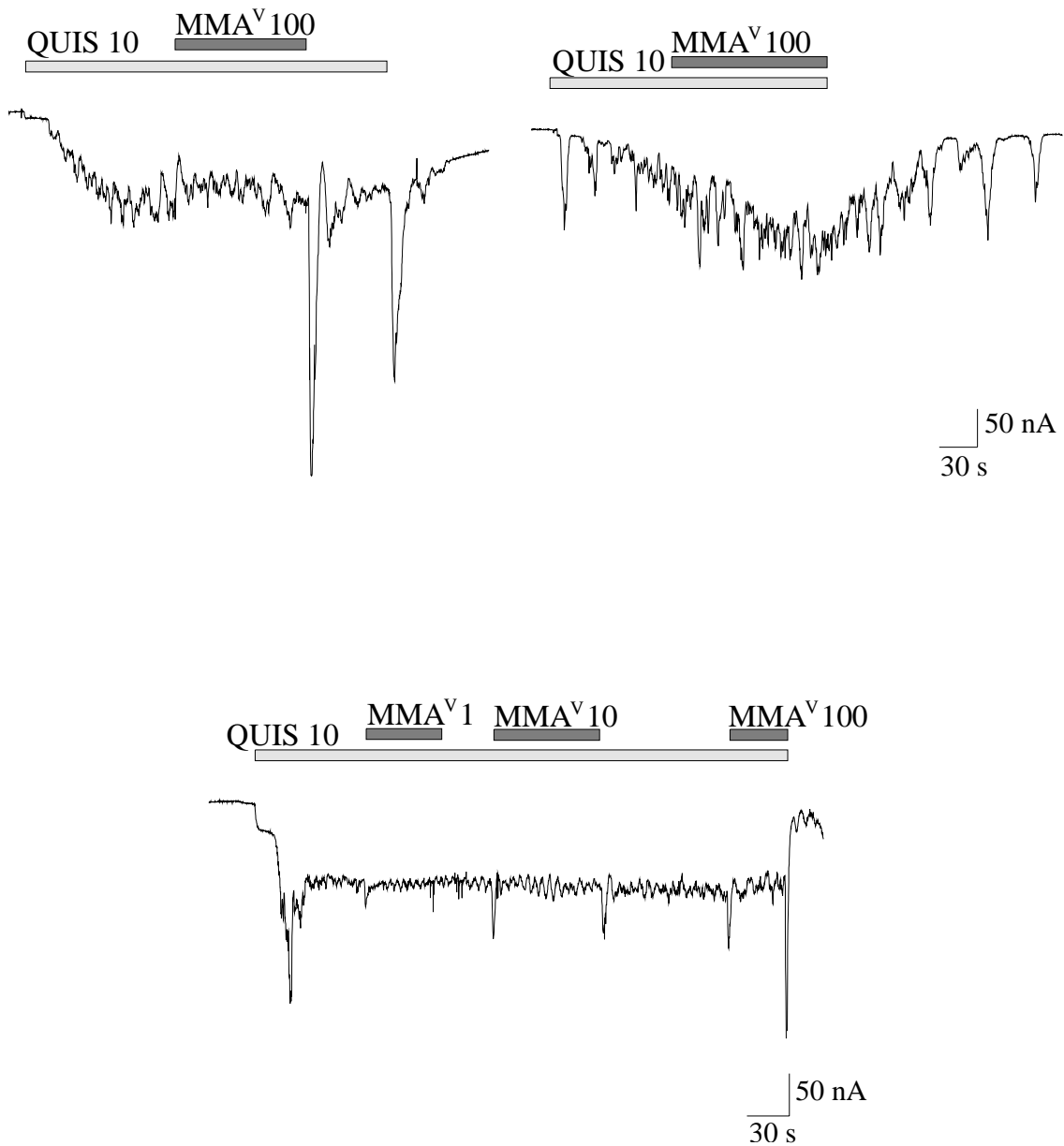
Wie daraus ersichtlich, kommt es bei einigen Versuchen zu einer leichten Abnahme der Grundlinie der Oszillationen. Insgesamt wurde dies an 5 Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen gesehen (z.B. bei Applikation von  $0,1 \mu\text{mol/l}$   $\text{MMA}^{\text{V}}$ , Abb. 3.21A). Ebenso konnte aber auch eine leichte Anhebung der Grundlinie beobachtet werden, insgesamt bei 6 Zellen (z.B. bei Applikation von  $10 \mu\text{mol/l}$   $\text{MMA}^{\text{V}}$ , Abb. 3.21B).

A



**Abb. 3.21 A:** Wirkung von Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>) auf Quisqualat-induzierte Ionenströme: Koapplikation von 0,1, 1 und 10  $\mu\text{mol/l}$  Monomethylarsonsäure und 1  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat. Haltepotenzial: -60 mV. Der hellgraue Balken gibt die Applikationsdauer des Agonisten Quisqualat an, der dunkelgraue Balken gibt die Applikationsdauer von Monomethylarsonsäure wieder. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

B

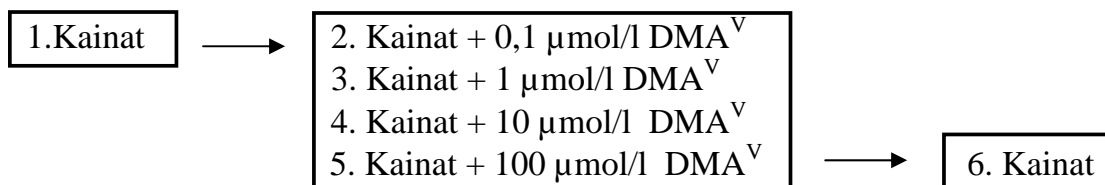


**Abb. 3.21B:** Wirkung von Monomethylarsonsäure (MMA<sup>V</sup>) auf Quisqualat-induzierte Ionenströme: Koapplikation von 1, 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$  Monomethylarsonsäure und 1  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat. Haltepotenzial: -60 mV. Der hellgraue Balken gibt die Applikationsdauer des Agonisten Quisqualat an, der dunkelgraue Balken gibt die Applikationsdauer von Monomethylarsonsäure wieder. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

### 3.4.3 Wirkung von Dimethylarsinsäure

#### 3.4.3.1 Wirkung von Dimethylarsinsäure auf den AMPA-Rezeptorkanal

Die Testung von Dimethylarsinsäure auf den AMPA-Rezeptorkanal wurde nach Protokoll 1 durchgeführt (Abschnitt 2.3.1). Die Konzentration von Kainat betrug bei allen Versuchen 50  $\mu\text{mol/l}$ . Dimethylarsinsäure wurde in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Nach einer Aktivierung mit Kainat als Kontrolle wurde im Abstand von jeweils 10 min Dimethylarsinsäure in steigender Konzentration koappliziert. Es ergab sich folgende Applikationsreihe:

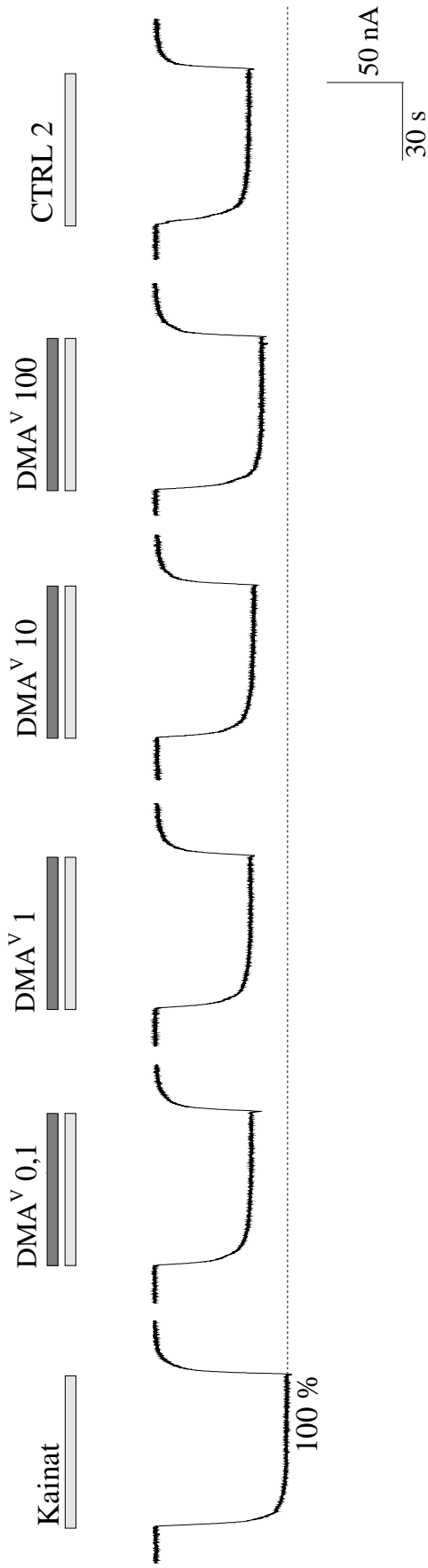


Die verschiedenen Dimethylarsinsäure-Konzentrationen wurden an jeweils acht Zellen mit Follikelzellschichten und einer defollikulierten Zelle appliziert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Beeinflussung der Ionenströme zwischen diesen beiden Zelltypen bei der Applikation von Dimethylarsinsäure.

Bei der Applikation von Dimethylarsinsäure ergab sich eine einheitliche Beeinflussung der Kainat-induzierten Ionenströme. Die Zellen zeigten bei jeweils unterschiedlichen Arsenkonzentrationen Reduktionen der Ionenströme. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  Arsen wurden die Ionenströme auf bis zu 70 % gehemmt. Auch bei 1  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure ließen sich diese Effekte nachweisen. Es kam zu Reduktionen der Ionenströme auf bis zu 72 % der Ausgangsamplitude. Die Applikation von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure reduzierte die Ionenströme bei zwei Zellen auf bis zu 73 %. Die Einzeldaten aller Versuche sind in Tabelle 3.13 zusammen gestellt.



In der statistischen Auswertung ergab sich eine signifikante Reduktion der Kainat-induzierten Ionenströme durch Dimethylarsinsäure in Konzentrationen von 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  (Tab. 3.14, grafische Darstellung der Statistik in Diagramm 8). Bei sieben Zellen wurde nach 100  $\mu\text{mol/l}$  Arsen noch einmal Kainat appliziert (s. Protokoll 1). Bei vier Zellen konnte eine Reduktion der Ionenströme gemessen werden. Diese Reduktion ist statistisch allerdings nicht signifikant (7 Zellen; Mittelwert 94 %; Standardabweichung 22; Standardfehler 8,2;  $p=0,25$ ). Abbildung 3.22 zeigt eine typische Originalkurve.



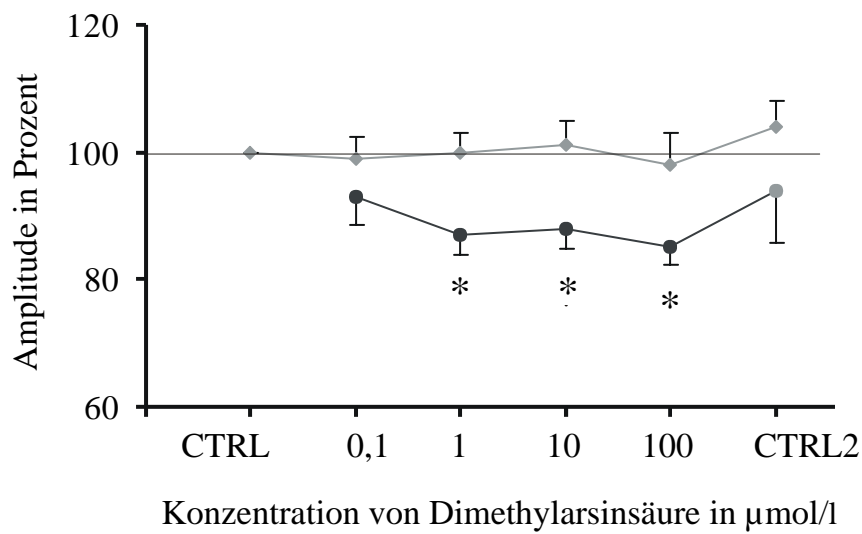
**Abb. 3.22:** Versuchsreihe zur Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>) auf Kainat-induzierte Ionenströme: Nach Applikation von Kainat wurde im Abstand von 10 min Dimethylarsinsäure in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 μmol/l mit Kainat koappliziert. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial: -70 mV. CTRL2: Kainat-Applikation am Ende der Versuchsreihe. Hellgrauer Balken: Kainat. Dunkelgrauer Balken: Dimethylarsinsäure.

Dimethylarsinsäure (DMA <sup>V</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Zelle	0,1	1	10	100	CTRL 2
1	102 %	93 %	92 %	85 %	90 %
2	73 %	72 %	74 %	81 %	70 %
3	88 %	92 %	79 %	104 %	58 %
4	109 %	97 %	97 %	91 %	
5	94 %	90 %	94 %	88 %	115 %
6	108 %	79 %	95 %	76 %	104 %
7	94 %	97 %	94 %	84 %	
8	100 %	88 %	94 %	83 %	112 %
9	74 %	76 %	70 %	75 %	107 %

**Tab. 3.13:** Darstellung der Versuche zur Wirkung von Dimethylarsinsäure: Gezeigt sind die relativen Amplituden der Ionenströme nach Koapplikation von Kainat mit Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>) in den Arsenkonzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol}$ . Zelle 3 war defollikuliert.

DMA <sup>V</sup> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mittelwert (%)	Standard- abweichung	Standard- fehler	Signifikanz $p < 0,05$
0,1	9	93	$\pm 13$	$\pm 4$	0,33
1	9	87	$\pm 9$	$\pm 3$	0,01
10	9	88	$\pm 10$	$\pm 3$	0,03
100	9	85	$\pm 9$	$\pm 3$	0,05

**Tab. 3.14:** Statistische Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von Kainat und Dimethylarsinsäure: Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 2. bis 5. Aktivierungen gemittelt und mit den Mittelwerten aus den Kontrollversuchen verglichen. Die jeweiligen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler wurden berechnet. n = Anzahl der Zellen.

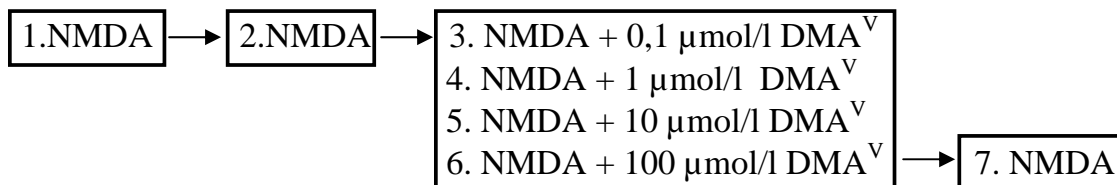


**Diagramm 3.8:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von Kainat und Dimethylarsinsäure: Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach Koapplikation von Kainat und Dimethylarsinsäure (dunkelgraue Punkte). Die hellgrauen Rauten zeigen die statistische Auswertung der Ionenströme bei repetierter Applikation von Kainat (Kontrollversuche). CTRL: Kainat-Applikation zu Beginn der Versuchsreihe. CTRL 2: Kainat-Applikation am Ende der Versuchsreihe (grauer Punkt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. \* : signifikant unterschiedliche Messwerte.

### 3.4.3.2 Wirkung von Dimethylarsinsäure auf den NMDA-Rezeptorkanal

Die Wirkung von Dimethylarsinsäure auf den NMDA-Rezeptorkanal wurde nach dem Protokoll 2 (Abschnitt 2.3.2) getestet. Die Konzentration des synthetischen Agonisten NMDA betrug bei allen Versuchen 50  $\mu\text{mol/l}$ . Vor der Applikation von Arsen wurden die Rezeptorkanäle zweimal durch NMDA aktiviert. Dimethylarsinsäure wurde in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  im Abstand von 20 min koappliziert.

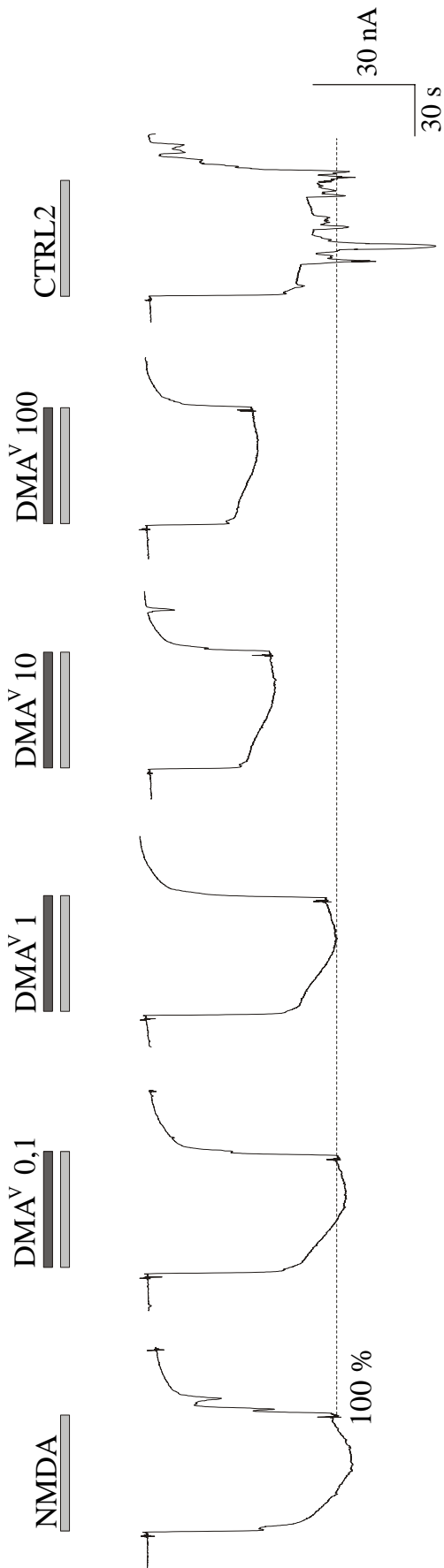
Es ergab sich folgende Applikationsreihe:



Die Applikation von Dimethylarsinsäure erfolgte an 11 verschiedenen Zellen, wobei alle Zellen mit den Follikelzellschichten behaftet waren. Bei der Applikation von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  Arsen zeigte sich bei drei Zellen eine Steigerung der Ionenströme auf bis zu 127 %. Sieben Zellen zeigten eine z.T. deutliche Reduktion der Ionenströme bis auf 29 % der Ausgangsamplitude. Nach Applikation von 1  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure wiesen, bis auf zwei Zellen, alle eine Hemmung der Ionenströme auf. Die Stärke der Reduktionen variierte zwischen 80 % und 6 % der Ausgangsamplitude. Bei einer Zelle wurde eine Steigerung der Stromamplitude auf 142 % gemessen. Unter Applikation von 10  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure fand sich eine Steigerung der Stromamplituden bei zwei Zellen. Bei acht Zellen zeigte sich eine Reduktion der Ionenströme auf bis zu 4 %. Auch bei der Applikation von 100  $\mu\text{mol/l}$  konnte an acht Zellen eine z.T. erhebliche Reduktion der Ionenströme bis zur fast vollständigen Blockade der Ionenströme in einem Fall beobachtet werden. Eine Zelle wies eine Steigerung der Ionenströme auf 167 % auf. Die Einzeldaten aller Versuche sind in Tabelle 3.15 zusammengestellt.

In der statistischen Auswertung ergab sich eine signifikante Reduktion der Ionenströme für die Dimethylarsinsäurekonzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  (Statistik in Tab. 3.16, grafische Darstellung der Statistik in Diagramm 9). Die Ionenströme bei NMDA-Applikation nach 100  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure waren nicht signifikant verändert (10 Zellen; Mittelwert 112 %; Standardabweichung 57; Standardfehler 18,4;  $p=0,70$ ).

Abbildung 3.23 zeigt Originalkurven.



**Abb. 3.23:** Versuchsreihe zur Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>) auf NMDA-induzierte Ionenströme: Nach Applikation von NMDA wurde im Abstand von 20 min Dimethylarsinsäure in den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/l}$  mit NMDA koappliziert. Ausschlag nach unten: Ioneneinwärtsstrom. Haltepotenzial: -70 mV. CTRL2: NMDA-Applikation am Ende der Versuchsreihe. Hellgrauer Balken: NMDA. Dunkelgrauer Balken: Dimethylarsinsäure.

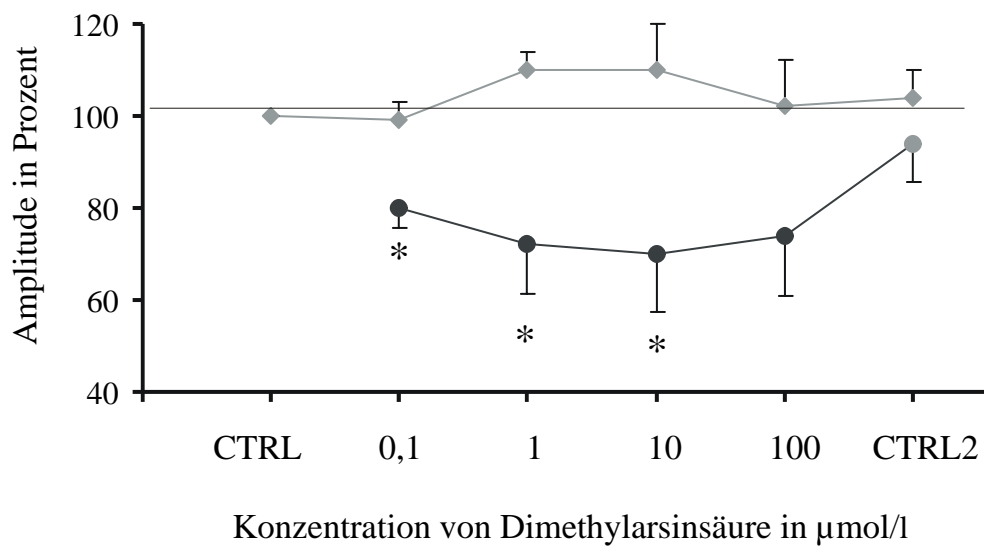
Dimethylarsinsäure (DMA <sup>V</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]					
Zelle	0,1	1	10	100	CTRL 2
1	108 %	142 %	158 %	167 %	183 %
2	82 %	79 %	100 %	100 %	157 %
3	77 %	66 %	63 %	51 %	74 %
4	69 %	56 %	66 %	94 %	113 %
5	113 %	80 %	67 %	80 %	107 %
6	71 %	64 %	50 %	71 %	136 %
7	67 %	42 %	30 %	35 %	48 %
8	29 %	6 %	4 %	1 %	3 %
9	118 %	104 %	124 %	107 %	185 %
10	101 %	97 %	63 %	57 %	99 %
11	59 %	67 %	59 %	65 %	111 %

**Tab. 3.15:** Darstellung der Versuche zur Wirkung von Dimethylarsinsäure: Gezeigt sind die relativen Amplituden der Ionenströme nach Koapplikation von NMDA mit Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>) in den Arsenkonzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol}$ .

(DMA <sup>V</sup> ) [ $\mu\text{mol/l}$ ]	n	Mittelwert (%)	Standard- abweichung	Standard- fehler	Signifikanz $p < 0,05$
0,1	11	80	$\pm 27$	$\pm 4$	0,02
1	11	72	$\pm 34$	$\pm 11$	0,02
10	11	70	$\pm 43$	$\pm 13$	0,03
100	11	74	$\pm 42$	$\pm 13$	0,12

**Tab. 3.16:** Statistische Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von NMDA und Dimethylarsinsäure: Es wurden jeweils die relativen Amplituden aller 3. bis 6. Aktivierungen gemittelt und mit den Mittelwerten aus den Kontrollversuchen verglichen. Die jeweiligen Standardabweichungen sowie die entsprechenden Standardfehler wurden berechnet. n = Anzahl der Zellen.





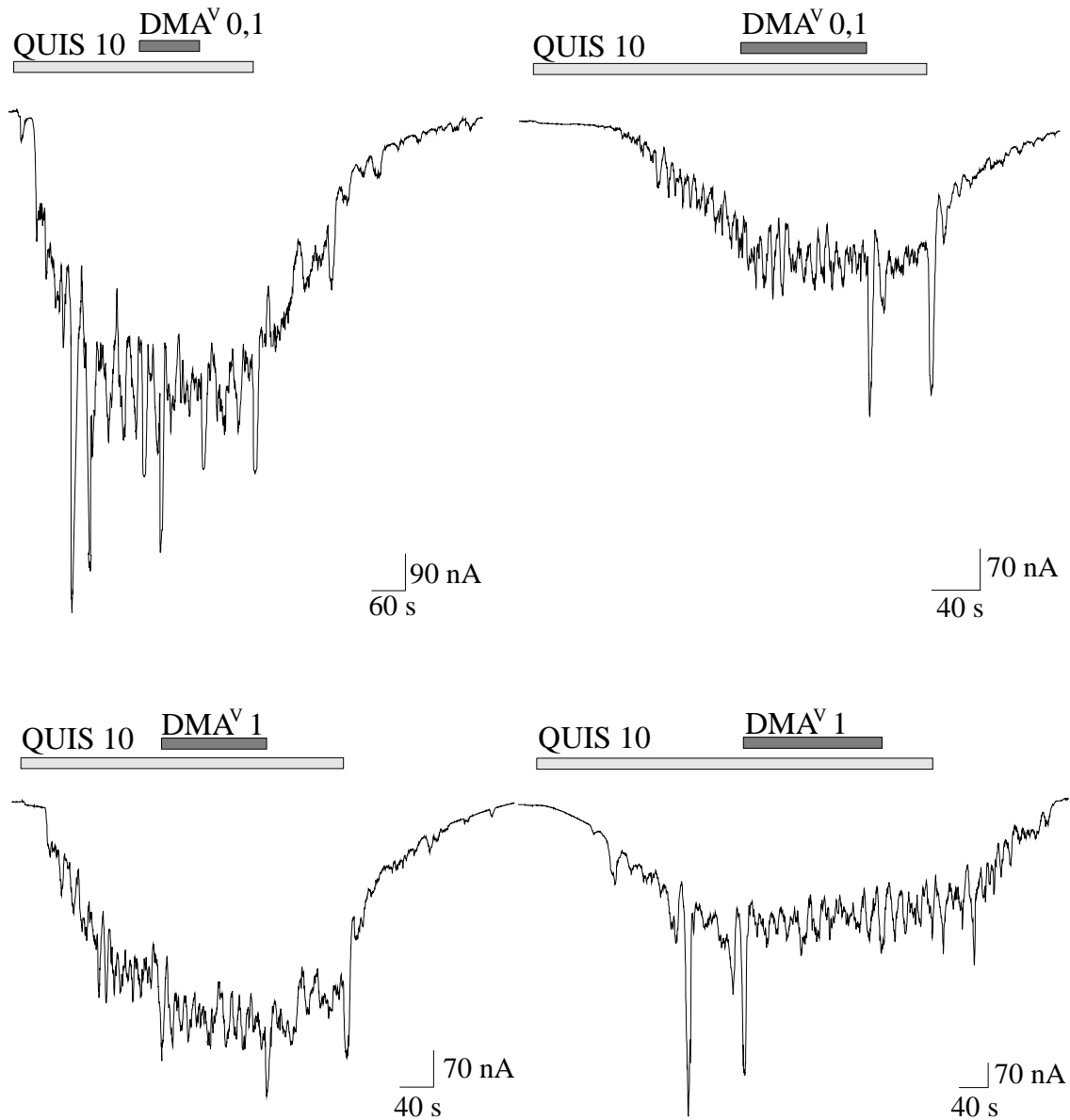
**Diagramm 3.9:** Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Ionenströme bei Koapplikation von NMDA und Dimethylarsinsäure: Gezeigt sind die Mittelwerte der Amplituden nach Koapplikation von NMDA und Dimethylarsinsäure (dunkelgraue Punkte). Die hellgrauen Rauten zeigen die statistische Auswertung der Ionenströme bei repetierter Applikation von NMDA (Kontrollversuche). CTRL: NMDA-Applikation zu Beginn der Versuchsreihe. CTRL 2: NMDA-Applikation am Ende der Versuchsreihe (grauer Punkt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. \* : signifikant unterschiedliche Messwerte.

### *3.4.3.3 Wirkung von Dimethylarsinsäure auf den metabotropen Glutamat-rezeptor*

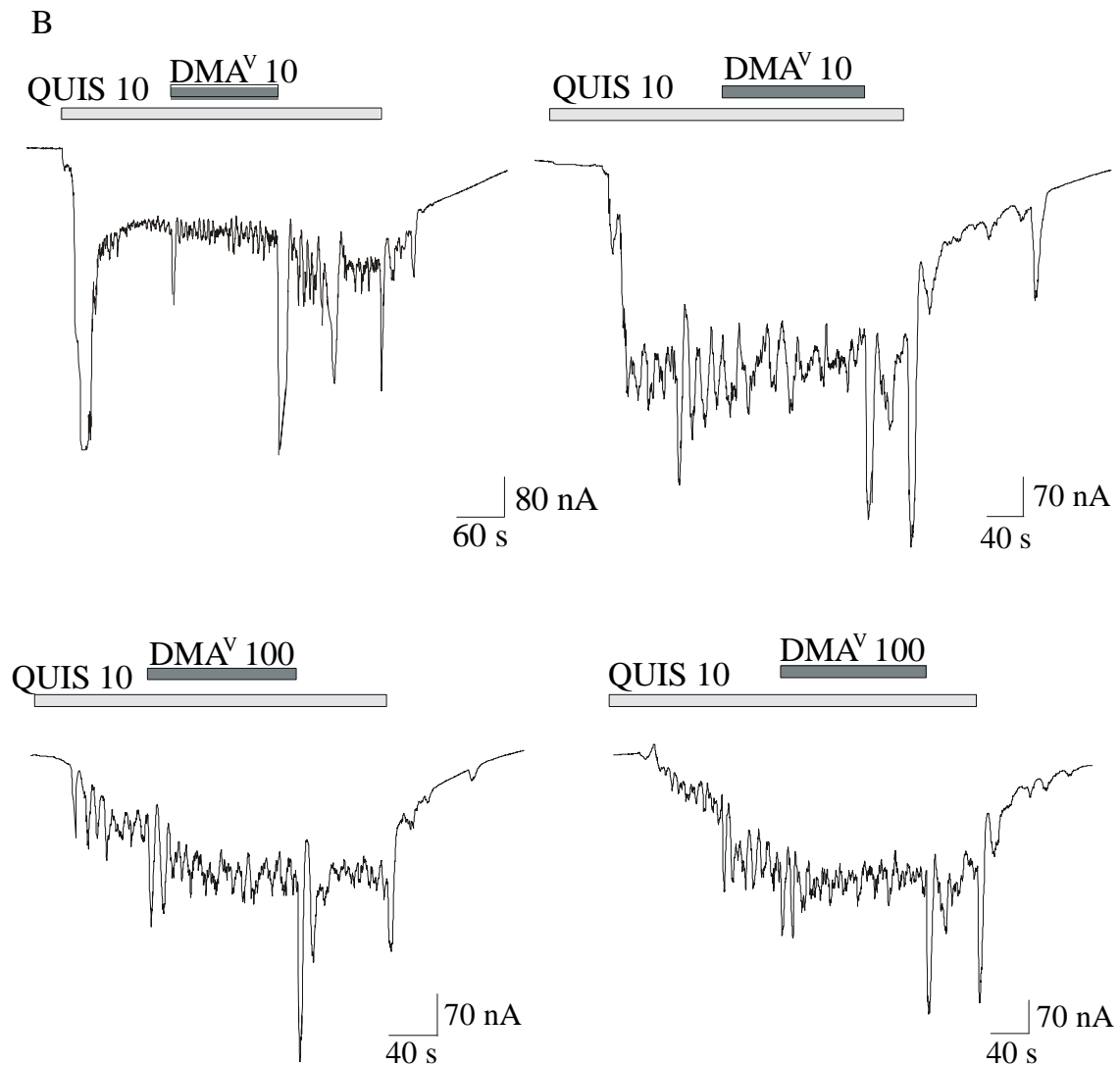
Die Wirkung von Dimethylarsinsäure auf den metabotropen Glutamatrezeptor wurde nach dem Protokoll 3 getestet (siehe 2.3.3). Die Konzentration des synthetischen Agonisten Quisqualat betrug bei zwei Zellen 10  $\mu\text{mol/l}$ , bei den anderen drei Zellen 1  $\mu\text{mol/l}$ . Zunächst wurde der Rezeptor mit Quisqualat aktiviert und dann mit unterschiedlicher Latenzzeit (1-5 min) Dimethylarsinsäure koappliziert. Nach etwa 2 min wurde die Arsenlösung und Quisqualat zusammen ausgewaschen. Die Ruhezeit zwischen den Rezeptoraktivierungen betrug 15 min. Getestet wurde Dimethylarsinsäure in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$ . Alle Konzentrationen wurden an jeweils 5 Zellen mit Follikelzellschicht appliziert. Die Zellen verhielten sich unter Applikation der Arsenlösung relativ konstant. Die Ionenströme wurden bei keiner der Konzentrationen auffallend beeinflusst. Eine quantitative Auswertung ist auf Grund der oszillierenden Ionenströme nicht möglich. Abbildung 3.24A zeigt Originalkurven mit den Dimethylarsinsäurekonzentrationen 0,1 und 1  $\mu\text{mol/l}$ . Abbildung 3.24B zeigt Originalkurven mit den Dimethylarsinsäurekonzentrationen 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$ .

Zur abschließenden Darstellung der Wirkung von Arsenverbindungen auf Glutamat-Rezeptorkanäle sind die Ergebnisse in Tabelle 3.17 zusammengefasst. Die Diagramme 3.10A-C zeigen eine grafische Darstellung der Wirkung von den applizierten Arsenverbindungen auf die verschiedenen Glutamat-Rezeptorkanäle.

A



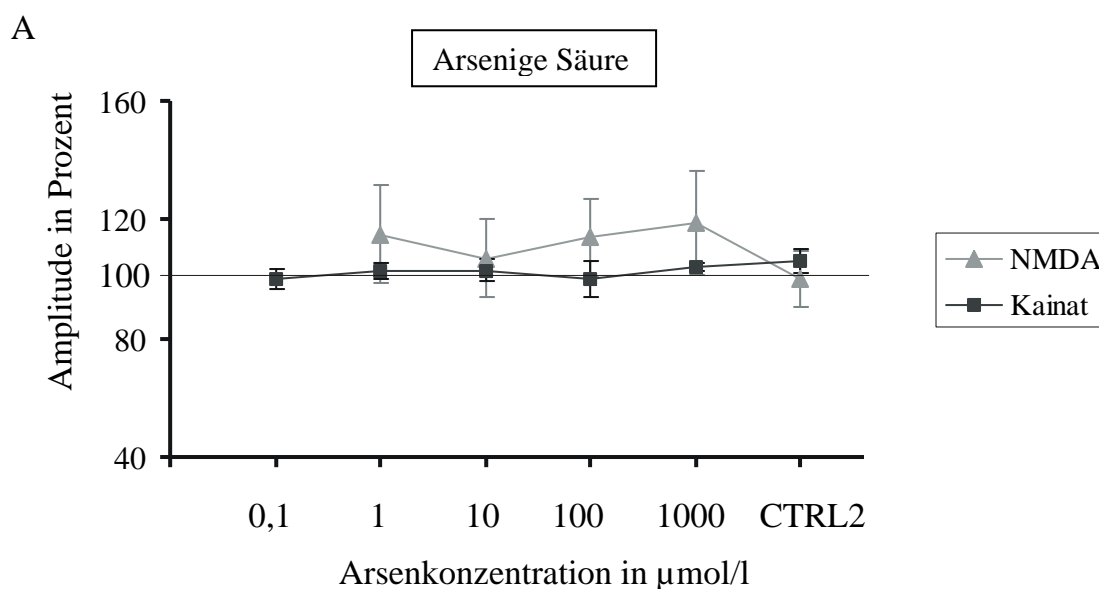
**Abb. 3.24A:** Wirkung von Dimethylarsinsäure ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) auf Quisqualat-induzierte Ionenströme: Koapplikation von 0,1 und 1  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure und 1  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat. Haltepotenzial: - 60 mV. Der hellgraue Balken zeigt die Applikationsdauer des Agonisten Quisqualat an, der dunkelgraue Balken gibt die Applikationsdauer von Dimethylarsinsäure wieder. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.



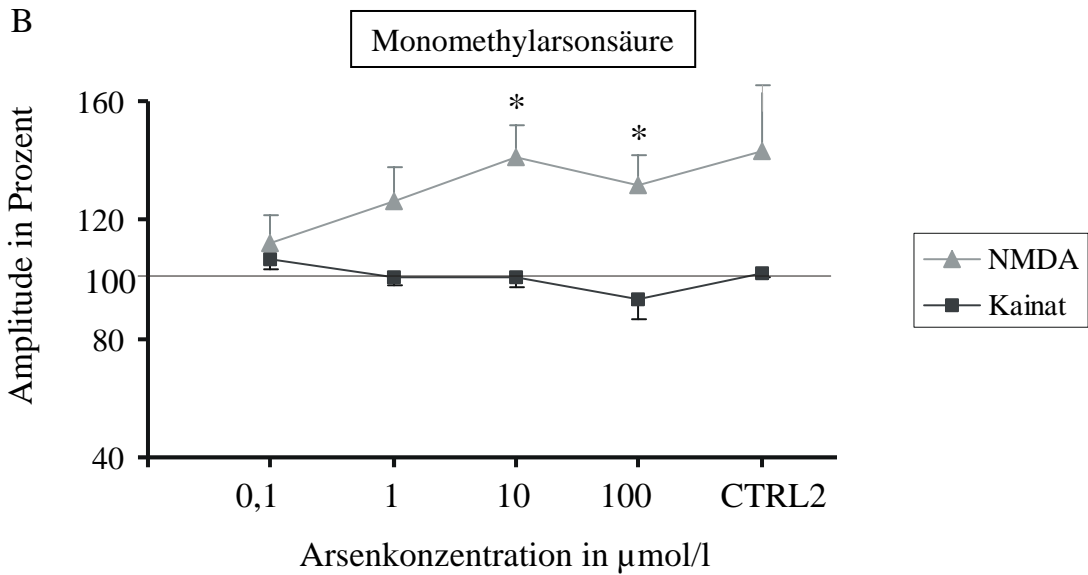
**Abb. 3.24B:** Wirkung von Dimethylarsinsäure (DMA<sup>V</sup>) auf Quisqualat-induzierte Ionenströme: Koapplikation von 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$  Dimethylarsinsäure und 1  $\mu\text{mol/l}$  Quisqualat. Haltepotenzial: - 60 mV. Der hellgraue Balken zeigt die Applikationsdauer des Agonisten Quisqualat an, der dunkelgraue Balken gibt die Applikationsdauer von Dimethylarsinsäure wieder. Ausschlag nach unten bei Ioneneinwärtsstrom.

Rezeptorkanal	Arsen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$\text{iA}^{\text{III}}$	$\text{MMA}^{\text{V}}$	$\text{DMA}^{\text{V}}$
AMPA	0,1	---	---	---
	1	---	---	Reduktion
	10	---	---	Reduktion
	100	---	---	Reduktion
NMDA	0,1	---	---	Reduktion
	1	---	---	Reduktion
	10	---	Steigerung	Reduktion
	100	---	Steigerung	---
mGluR	0,1-100	---	---	---

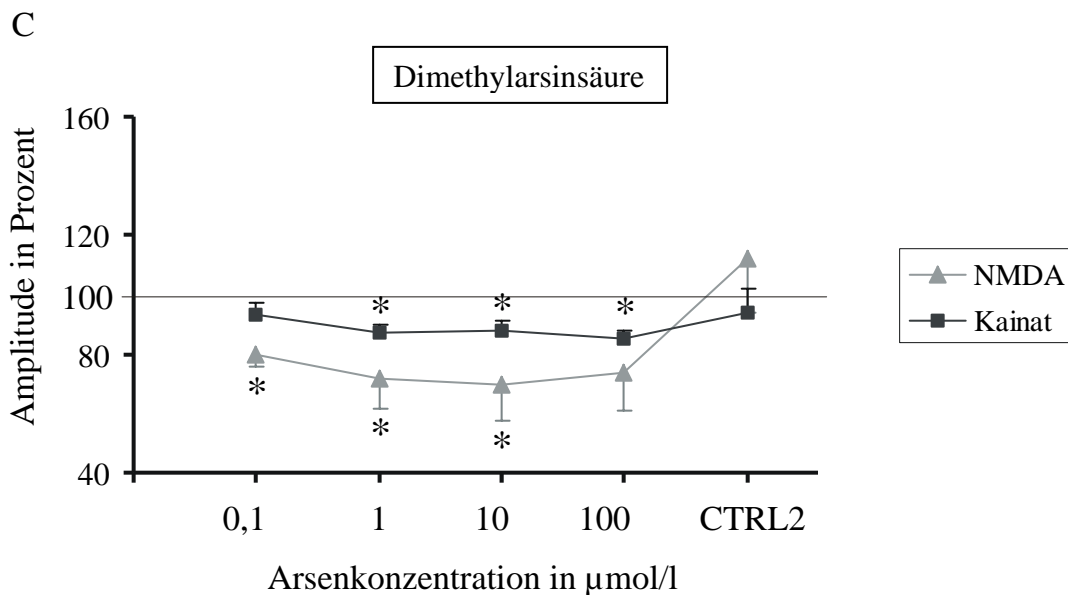
**Tab. 3.17:** Qualitative Darstellung der Ergebnisse zur Wirkung von Arseniger Säure, Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure auf Kainat-, NMDA- und Quisqualat-induzierte Ionenströme.



**Diagramm 10A:** Qualitative Darstellung der Wirkung von Arseniger Säure ( $\text{iA}^{\text{III}}$ ) auf AMPA- und NMDA-Rezeptorkanäle. Beeinflussung des NMDA-Rezeptorkanals und des Kainat-Rezeptorkanals durch Arseniger Säure ( $\text{iA}^{\text{III}}$ ). CTRL 2: Agonist-Applikation am Ende der Versuchsreihe.



**Diagramm 3.10B:** Grafische Darstellung der Wirkung von Monomethylarsensäure ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) auf AMPA- und NMDA-Rezeptorkanäle. Beeinflussung des NMDA-Rezeptorkanals und des Kainat-Rezeptorkanals durch Monomethylarsensäure ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ). CTRL 2: Agonist-Applikation am Ende der Versuchsreihe.\* : signifikant unterschiedliche Messwerte.



**Diagramm 3.10C:** Grafische Darstellung der Wirkung von Dimethylarsinsäure ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) auf AMPA- und NMDA-Rezeptorkanäle. Beeinflussung des NMDA-Rezeptorkanals und des Kainat-Rezeptorkanals durch Dimethylarsinsäure ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ). CTRL 2: Agonist -Applikation am Ende der Versuchsreihe.\* : signifikant unterschiedliche Messwerte.

## 4. Diskussion

Metallorganische Arsenverbindungen aus anthropogenen, biogenen und geogenen Quellen stellen eine wichtige Gruppe umweltgiftiger Substanzen dar. Die Biomethylierung anorganischen Arsens durch Mikroorganismen, das große natürliche Vorkommen der Arsenverbindungen in Mineralien und die Verwendung der Arsensubstanzen in Industrie und Landwirtschaft führen zu einer weitreichenden Kontamination von Wasser, Luft und Sedimenten. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob von metallorganischen Arsenverbindungen eine neurotoxische Wirkung durch Beeinflussung von Glutamat-Rezeptorkanälen ausgehen kann. Weiterhin sollte die Frage näher geklärt werden, ob organische Arsenverbindungen ein größeres neurotoxisches Potenzial als entsprechende anorganische Verbindungen besitzen.

Die Diskussion der durchgeführten Experimente ist in vier Abschnitte gegliedert. Dabei werden methodenkritische Aspekte der Arbeit dargestellt (4.1), die Versuchsergebnisse kritisch analysiert und interpretiert (4.2) und die Bedeutung der gefundenen Arseneffekte im Hinblick auf das Nervensystem erläutert (4.3). Abschließend erfolgt ein Ausblick über mögliche weiterführende Untersuchungen (4.4).

### 4.1 Diskussion des methodischen Vorgehens

In diesem Abschnitt werden das verwendete neurophysiologische Untersuchungsmodell (4.1.1) und das Versuchsprotokoll (4.1.2) erläutert.

#### *4.1.1 Perspektiven und Grenzen des Expressionssystems der Xenopus Oozyten*

Um ein physiologisches Modell von neuronalen Rezeptorkanälen auf die Verhältnisse im Ursprungsgewebe übertragen zu können, muss gewährleistet sein, dass die Rezeptorkanäle in Aufbau und Funktion den Rezeptorkanälen in

Nervenzellen weitgehend entsprechen. Die elektrophysiologisch registrierte Zellaktivität nach Injektion von neuronaler mRNA aus Rattengehirn und Applikation von Neurotransmittern muss einwandfrei durch de novo synthetisierte, rattenhirnspezifische Ionenkanäle verursacht sein. Diese Voraussetzungen sind in zahlreichen Studien für das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte überprüft worden (z.B. Mußhoff et al., 1992; Siegel, 1987; Yang et al., 1991; Kelso und Leonard, 1991; Randle et al., 1988). Für die Glutamat-Rezeptorkanäle konnte nachgewiesen werden, dass die Oozyte die komplexen Translationsprozesse so durchführt, dass funktionstüchtige Rezeptorkanäle in die Oozytenmembran eingebaut werden (Mußhoff et al., 1992). Die exprimierten Rezeptorkanäle besitzen alle pharmakologischen Eigenschaften, die für Glutamat-Rezeptorkanäle in nativem Gewebe beschrieben wurden (Nicoll et al., 1990). Auch die spezielle Kinetik der transmembranösen Ionenströme nach Rezeptoraktivierung zeigt eine große Übereinstimmung von den in anderen Studien beschriebenen Ergebnissen (Kelso und Leonard, 1991; Randle et al., 1988). Trotz der Übereinstimmungen von heterologen und nativen Rezeptorkanälen kann jedoch keine völlige Analogie vom Modell zur humanen Nervenzelle postuliert werden. So muss zum Beispiel beim metabotropen Glutamatrezeptor beachtet werden, dass der Rezeptor in verschiedenen Neuronen an unterschiedliche Reaktionskaskaden gekoppelt ist, die möglicherweise nicht alle in der Oozyte vorhanden sind (Schoepp und Conn, 1993). Einige Glutamatrezeptorkanäle (z.B. der NMDA-Rezeptorkanal) sind heteromer aus mehreren Untereinheiten aufgebaut (z.B. Luo et al., 1997) und weisen in den Hirnregionen eine zellspezifische Zusammensetzung der Rezeptorkanaluntereinheiten auf (Monyer et al., 1994). Die Untereinheiten sind von Bedeutung unter anderem für Kinetik und Desensitivierungsverhalten der Rezeptoren. Zum Beispiel werden verschiedene Untereinheiten unterschiedlich durch Enzyme (wie die Proteinkinase A) beeinflusst, die eine Änderung der Rezeptoraktivität herbeiführen (Tingley et al., 1997; Harada et al., 1991; Raman et al., 1996). In diesem Untersuchungsmodell kann auf die Verteilung der Untereinheiten nach ihrer intrazellulären Expression kein Einfluss genommen



werden, da die Verteilung wahrscheinlich stochastisch erfolgt. Dies kann einen möglichen Nachteil in der Beurteilung sowohl des Ausmaßes, als auch des Angriffspunktes der Arsenwirkung darstellen.

Ein weiterer Nachteil des Oozyten-Modells ist die reduzierte pharmakologische Sensitivität für viele Substanzen gegenüber Säugetierzellen. Dies liegt an den Hüllschichten der Oozyte. Madeja et al. (1997) zeigten einen reduzierten Substanzeffekt an spannungsabhängigen Kaliumkanälen für kleine Moleküle (Tetraethylammonium), einzelne Ionen (Blei) und Peptide ( $\alpha$ -Dendrotoxin) bedingt durch die Follikelzellschicht. Der qualitative Effekt der einzelnen Substanzen war bei Oozyten mit und ohne Hüllschichten gleich, nur das Ausmaß der Beeinflussung war bei den Oozyten ohne Hüllschichten größer. Für andere Substanzen, wie zum Beispiel Serotonin, wurde hingegen kein Unterschied zwischen Oozyten mit und ohne Hüllschichten gefunden (Gunderson et al., 1983). Um eine mögliche Effektreduktion zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Versuchsreihen mit Arseniger Säure an Oozyten ohne Hüllschichten durchgeführt, für die Versuche mit den organischen Arsenverbindungen wurden Oozyten mit und ohne Hüllschichten parallel getestet (Ausnahme: Dimethylarsinsäure-Applikation am NMDA-Rezeptorkanal). Die Entfernung der Hüllschichten ist für die hier durchgeführten Experimente allerdings von Nachteil, weil die Hüllschichten der elektrophysiologischen Messung Stabilität geben und die Oozyte robuster machen, was für die oft langen Versuchsserien und teilweise hohen Arsenkonzentrationen hilfreich war. Hinweise auf eine stärkere Beeinflussung der Rezeptorkanäle bei den Oozyten ohne Hüllschichten konnte nicht festgestellt werden. Ob die Hüllschichten einen Einfluß auf die Arsenpermeabilität haben, kann mit diesen, in dieser Hinsicht nur orientierend ausgerichteten Untersuchungen, nicht abschließend geklärt werden. Für die qualitative Analyse einer neurotoxischen Wirkung an Rezeptorkanälen kann dieser Aspekt zunächst in den Hintergrund treten.

Für die prinzipielle Beurteilung der Funktionsweise der Rezeptorkanäle bzw. die Beeinflussung ihrer Funktion ist das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte

sehr gut geeignet: Die Substanz kann direkt an den Rezeptorkanälen wirken. Da es sich bei der Oozyte um Einzelzellversuche handelt, wird eine Verfälschung der Untersuchung durch Aufnahme der Substanz in benachbarte Zellen oder Transmitterfreisetzungen aus umgebenden Nervenzellen sowie eine Veränderung der Extrazellulärflüssigkeit z.B. durch Zelluntergänge vermieden.

Die Oozyten sind im Vergleich zu Nervenzellen sehr unempfindlich, so dass Untersuchungen über mehrere Stunden möglich sind und die Zelle auch am Folgetag der Untersuchung erneut getestet werden kann. Auf diese Weise lassen sich Langzeiteffekte und Reversibilität erfassen. Darüber hinaus bietet das Oozytensystem eine selbstregulierende Qualitätssicherung, da die Eizelle nur lebensfähig ist, wenn die Oozytenmembran, also der Ort der Rezeptorexpression, regelgerecht aufgebaut ist.

#### *4.1.2 Vor- und Nachteile des Versuchsprotokolls*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Substanzapplikation nach drei verschiedenen Protokollen durchgeführt (s. Methodik-Kapitel). An einer Zelle wurden im Abstand von definierten Ruhepausen bis zu fünf verschiedene Arsenkonzentrationen appliziert. Bei dieser seriellen Substanzapplikation besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich Arseneffekte summieren und es zu einer Überlagerung der Beeinflussungen von vorangehender und nachfolgender Arsenapplikation kommt.

Bei den Versuchen am NMDA-Rezeptorkanal musste das Protokoll leicht abgewandelt werden, indem die Applikation des Agonisten zu Beginn einer Versuchsreihe noch einmal wiederholt wurde. Dieses Vorgehen war notwendig, weil die NMDA-Rezeptoren eine Reduktion der Ionenströme bei der zweiten NMDA-Applikation aufwiesen. Dieses Rezeptorverhalten ist während Messperioden im Sommer nicht aufgetreten und war daher ungewöhnlich. Ein Einfluss saisonaler Bedingungen (z.B. durch eine Änderung des Hormonstatus in den Fröschen) auf die Expression der Rezeptorproteine wurde von Sekigushi et al. (1990)

beschrieben. Ob das hier gesehene Verhalten der NMDA-Rezeptorkanäle darauf zurückzuführen ist, kann allerdings nicht beantwortet werden.

Für die Untersuchungen am metabotropen Glutamatrezeptoren war die Anwendung des Protokolls 3 zwingend erforderlich, da dieser Rezeptortyp ein starkes Desensitivierungsverhalten zeigte. Der Agonist Quisqualat wurde kontinuierlich appliziert und die Arsenlösung koappliziert. Dieses Verfahren eignet sich sehr gut zur Beurteilung einer Beeinflussung der Rezeptoren, weil ein direkter Vergleich von physiologisch induzierten Ionenströmen zu Ionenströmen unter Koapplikation der Arsenverbindung beobachtet werden kann. Auf Grund der charakteristischen Oszillationen der Ionenströme nach Rezeptoraktivierung wurden die Arsenapplikationen qualitativ ausgewertet.

Die Auswahlkriterien für die verwendeten Arsenverbindungen orientierten sich neben praktischen Aspekten, wie der Löslichkeit der Verbindungen, an einer hohen Umweltrelevanz der Substanzen für den Menschen. Des Weiteren war für die Auswahl ausschlaggebend, dass die untersuchten fünfwertigen Arsenmetaboliten Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure die häufigsten Stoffwechselprodukte im Urin von Arsen-kontaminierten Personen sind (z.B. Le et al., 2000; Aposhian et al., 2000; Foa et al., 1984; Lovell et al., 1985; Buchet und Lauwerys, 1994). Das in menschlichem Urin ausgeschiedene Arsen ist typischerweise zusammengesetzt aus 10-15 % anorganischem Arsen, 10-15 % Monomethylarsonsäure und 60-80 % Dimethylarsinsäure. Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure sind Zwischenprodukte bei der Methylierung von anorganischem Arsen (Challenger, 1951). Den von Challenger (1951) postulierten Ablauf der Biomethylierung zeigt Grafik 4.1. Dieser Methylierungsprozess läuft sehr wahrscheinlich auch im menschlichen Körper ab. Hinweise geben zahlreiche Studien, zum Beispiel beobachteten Yamauchi et al. (1992), dass nach Aufnahme einer definierten Menge eines Arsengemisches mehr Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure jedoch weniger anorganisches Arsen im Urin der Probanden ausgeschieden wurden als im zuvor aufgenommenen Arsengemisch enthalten war.

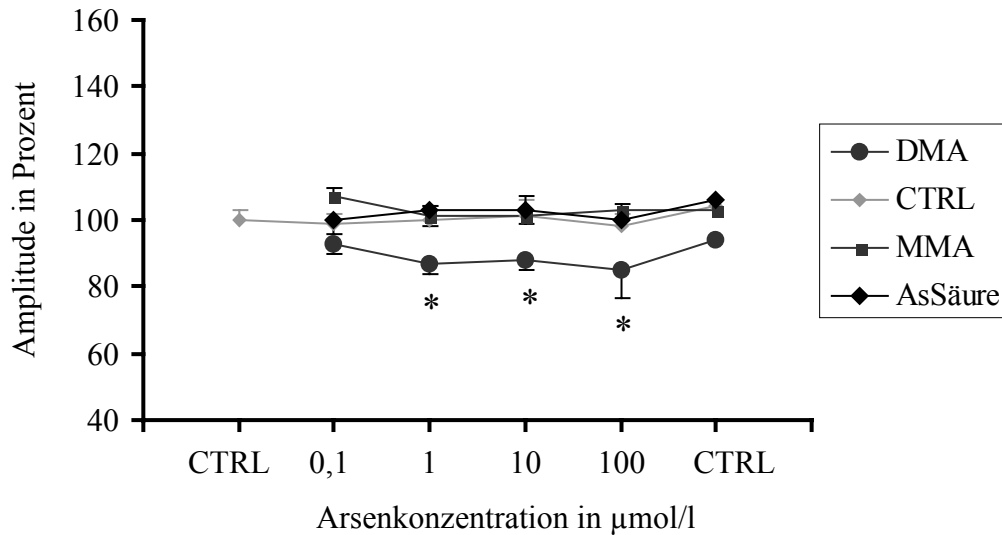


des NMDA-Rezeptors in unterschiedlicher Art verändern. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in den Diagrammen 4.2 A und B dargestellt. Die Ergebnisse lassen sich unter folgenden Gesichtspunkten interpretieren:

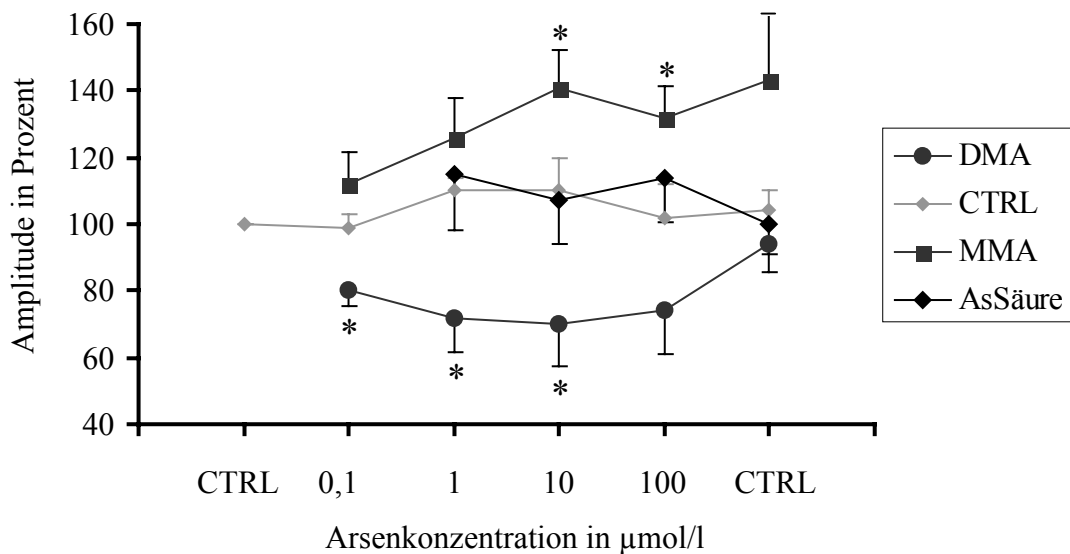
*1. Konzentrationsabhängigkeit:* Die Beeinflussung der NMDA- und AMPA-induzierten Ionenströme durch Monomethylarsonsäure und Dimethylarsinsäure war im getesteten Konzentrationsbereich konzentrationsunabhängig. Der Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander im t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung des Effekts. Eine Ausnahme könnte die Applikation von Dimethylarsinsäure auf den NMDA-Rezeptorkanal darstellen, bei welcher schon die niedrigste getestete Arsenkonzentration von  $0,1 \mu\text{mol/l}$  zu einer signifikanten Reduktion der Ionenströme führte (s. Diagramm). Für diese Applikationsreihe müsste der Konzentrationsbereich zu niedrigeren Konzentrationen hin erweitert werden, um eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit feststellen zu können.  $IC_{50}$  bzw.  $EC_{50}$  Werte werden auf Grund der obigen Ausführungen sinnvoller Weise nicht berechnet.

*2. Reversibilität der Effekte:* Die Erhöhung der NMDA-induzierten Ionenströme durch Monomethylarsonsäure war nach der statistischen Auswertung nicht reversibel. Betrachtet man allerdings die Einzelversuche, ist eine Persistenz des Effektes durchaus denkbar. Fünf von sieben Zellen, an denen NMDA abschließend appliziert werden konnte, zeigten erhöhte Ionenströme bis zu 200 % (s. Tab. 10, Kapitel 3.4.2.2).

Diese Messungen legen nahe, dass Monomethylarsonsäure die NMDA-Rezeptorkanäle dauerhaft verändert, vielleicht durch einen intrazellulär gelegenen Wirkort, der nicht auswaschbar ist, oder durch eine Wirkung der Monomethylarsonsäure an der Zellmembran in Umgebung des NMDA-Rezeptorkanals. Ob es sich um eine endgültige, irreversible Beeinflussung handelt, kann mit dem angewandten Versuchsprotokoll, das im Abstand von 20 Minuten durchgeführt wurde, nicht geklärt werden. Die Effekte von Dimethylarsinsäure auf Kainat-induzierte und NMDA-induzierte Ionenströme waren sowohl statistisch als auch in den Einzelversuchen nachvollziehbar reversibel.



**Diagramm 4.2 A:** Grafische Darstellung der Wirkung von Arsenverbindungen auf AMPA-Rezeptorkanäle. Beeinflussung des AMPA-Rezeptorkanals durch Arsenige Säure (AsSäure), Monomethylarsonsäure (MMA) und Dimethylarsinsäure (DMA). CTRL: Agonist-Applikation. \* : signifikanter Effekt



**Diagramm 4.2 B:** Grafische Darstellung der Wirkung von Arsenverbindungen auf NMDA-Rezeptorkanäle. Beeinflussung des NMDA-Rezeptorkanals durch Arsenige Säure (AsSäure), Monomethylarsonsäure (MMA) und Dimethylarsinsäure (DMA). CTRL : Agonist-Applikation. \* : signifikanter Effekt

3. *Reproduzierbarkeit der Effekte:* Die Reproduzierbarkeit von bestimmten Effekten unter Arsenapplikation war sehr unterschiedlich. Die Versuchsreihen mit Monomethylarsensäure und Dimethylarsinsäure waren sehr einheitlich und die Effekte gut reproduzierbar. Dagegen wies die Applikation von Arseniger Säure uneinheitliche Ergebnisse auf. Von den neun untersuchten Zellen führte bei vier Zellen arsenige Säure zu einer Reduktion, bei drei Zellen zu einer Steigerung und bei zwei Zellen zu keiner Beeinflussung der Kainat-induzierten Ionenströme (s. Tab. 4, Kapitel 3.4.1.1). Bei der Applikation von Arseniger Säure an NMDA-Rezeptorkanälen konnte ein ähnliches Muster beobachtet werden. Auch hier gab es Zellen, die unter Arseniger Säure mit reduzierten Ionenströmen reagierten, und andere, die eine Induktion der Ionenströme aufwiesen (s. Tab. 6, Kapitel 3.4.1.2). Die Oozyten dieser Versuchsreihe stammten von denselben Fröschen ab, wurden mit der gleichen mRNA-Charge injiziert, gleich gelagert und im selben Zeitraum mit der selben Arsenstammlösung gemessen. Möglicherweise hat die vorangegangene mechanische Defollikulierung aller dieser Zellen einen Einfluss auf die Arsenwirkung. Durch die mechanische Defollikulierung können in einigen der Zellen Mikroverletzungen aufgetreten sein, die vielleicht ein Eindringen der Arsenigen Säure bei manchen Oozyten möglich gemacht haben.

Das Arsen hätte dann intrazellulär wirken können und auf Grund dieses anderen Wirkorts wäre das Entstehen anderer Effekte erklärbar. Eine Rolle könnten auch die verschiedenen Untereinheiten, aus denen die Rezeptoren zusammengesetzt sind, spielen, auf deren Verteilung kein Einfluss genommen werden kann (s. oben). Gründe für die gegensinnigen Effekte bleiben aber letztlich unklar. Die statistische Auswertung lässt die Aussage zu, dass Arsenige Säure keinen Einfluss auf die analysierten Rezeptoren hat, die Einzelversuche geben jedoch Hinweise darauf, dass Arsenige Säure eine Wirkung haben könnte. In diesem Fall könnte die Statistik der Gesamtversuche fraglich bzw. irreführend sein.

4. *Selektivität und Graduierung der Arsenwirkung:* Die untersuchten Arsenverbindungen wiesen substanz- und rezeptorspezifisch unterschiedliche Effekte auf.

Während keine der drei analysierten Arsenverbindungen die Quisqualat-induzierten Ionenströme beeinflusste, veränderte Monomethylarsensäure die NMDA-induzierten Ionenströme und Dimethylarsensäure sowohl Kainat- als auch NMDA-Rezeptorkanäle. Dies spricht für eine relativ spezifische Wirkungsweise der beiden organischen Arsenverbindungen innerhalb der Glutamatrezeptorfamilie, wobei offenbar der metabotrope Glutamatrezeptor nicht beeinflusst wird. Die Ergebnisse können dabei nicht klären, ob die Arsensubstanzen ihre Wirkung ausschließlich am NMDA- bzw. Kainat-Rezeptorkanal ausüben, da es noch eine Reihe weiterer Rezeptoren in der Glutamatrezeptorfamilie gibt, die hier nicht untersucht wurden. Die gefundene Rezeptorspezifität von Arsen spricht für eine Beeinflussung des Arsens am Rezeptor selbst, und gegen eine allgemeinere Störung der Zellintegrität. Zudem zeigte eine parallele Untersuchung, dass spannungsabhängige Ionenkanäle für Natrium und Kalium nicht beeinflusst werden (Krüger et al. 2004).

Die gegensinnigen Effekte der beiden organischen Arsenverbindungen am NMDA-Rezeptorkanal sprechen dafür, dass die Hemmungsreaktion über andere Mechanismen verläuft als die Induktion von Ionenströmen. Aus den vorliegenden Untersuchungen können jedoch keine Rückschlüsse auf den genauen Wirkmechanismus gezogen werden.

Die Zielstrukturen am Rezeptorkanal können dabei grundsätzlich extra- oder intrazellulär gelegen sein, oder es können spezifische, die Rezeptoraktivität regulierende Proteine betroffen sein. Besonders für den NMDA-Rezeptorkanal liegen viele Studien über modulierende Regulatorproteine und Enzymsysteme vor. Zu einer Induktion der Ionenströme kommt es beispielsweise durch die Proteinkinase C, welche vermutlich über Phosphorylierung einer Untereinheit des Rezeptors wirkt (Tingley et al., 1997; Ehlers et al., 1995; Hall und Soderling, 1997). Ähnliche Beeinflussung ist auch für die Proteinkinase A nachgewiesen. Wahrscheinlich beeinflussen Antipsychotika wie Haloperidol über diesen Signalweg die NMDA-Aktivität (Leveque und Macias et al., 2000). Durch Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzte Arachidonsäure erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des



NMDA-Rezeptorkanals (Miller et al., 1992). Alle diese Modulationsprozesse kommen potenziell auch für den Wirkmechanismus der Arsensubstanzen in Frage. Um hier genauere Aussagen machen zu können, sind allerdings weitergehende Untersuchungen nötig.

*5. Die Rolle des organischen Substituenten:* Wie einleitend erwähnt, ist es u.a. Ziel dieser Arbeit, weiter zu klären, ob methylierte Arsenverbindungen wirklich entgiftete Metaboliten des anorganischen Arsens darstellen, oder aber aufgrund ihrer Lipophilie noch zytotoxischer wirken. So könnte zum Beispiel ein leichteres Eindringen in Zellen und fettreiches Gewebe wie das Gehirn möglich sein. Hinweise geben einige Fallstudien über Anreicherung von methylierten Arsenverbindungen in lipidreichen Organen bei Personen, die an Arsenintoxikation verstarben (Benrandame et al., 1999). Von anderen Schwermetallen ist dieser Zusammenhang schon beobachtet worden. So penetriert methyliertes Quecksilber die Blut-Hirnschranke und akkumuliert in Gehirn und Rückenmark (Gutknecht, 1981).

Monomethylarsensäure kann den NMDA-Rezeptorkanal signifikant beeinflussen. Dimethylarsinsäure besitzt einen organischen Substituenten mehr und hemmt signifikant die Aktivität von AMPA- und NMDA-Rezeptorkanälen. Diese gefundenen Beeinflussungen sind offensichtlich keinem rein additiven Effekt im Sinne einer stärkeren Hemmung oder Induktion der Ionenströme zuzuschreiben. Die zusätzliche CH<sub>3</sub>-Gruppe (s. auch Grafik 4.1) führt offenbar zu einem anderen Wirkmechanismus/Wirkort und damit zu einer anderen Modulation der Aktivität des Rezeptors. Besonders der gegenteilige Effekt von Monomethylarsensäure und Dimethylarsinsäure auf den NMDA-Rezeptorkanal ist im Hinblick auf die minimale Änderung des Arsenmoleküls überraschend.

Da der Wirkmechanismus aus den vorliegenden Versuchen nicht geklärt werden kann, ist nicht sicher, ob die organischen Substituenten entscheidend sind für die erhobenen Ergebnisse. Trotzdem können diese Beobachtungen weitere Hinweise darauf sein, dass methylierte Arsenverbindungen intensiver Einfluss auf biologische Systeme nehmen als anorganische Verbindung dies vermögen.

### **4.3 Neurotoxikologie der untersuchten Arsenverbindungen und Glutamat-Rezeptorkanäle als Angriffsort neurotoxischer Substanzen**

Dieses Kapitel erläutert den möglichen Einfluß der untersuchten Arsenverbindungen auf das Nervensystem (4.3.1) und wird die Bedeutung der Glutamat-Rezeptorkanäle als Angriffsort neurotoxisch wirkender metallorganischer Substanzen verdeutlichen (4.3.2).

#### *4.3.1 Neurotoxikologische Aspekte der untersuchten Arsenverbindungen*

Die aus Monomethylarsonsäure metabolisch entstandene Dimethylarsinsäure muss nicht die Endsubstanz des als Entgiftung angesehenen Methylierungsprozesses sein. Marafante et al. (1987) berichten, dass nach oraler Aufnahme von Dimethylarsinsäure 4 % der Dosis als Trimethylarsinoxid im Urin ausgeschieden wurde. Es ist also möglich, dass die eigentliche Detoxifikation erst nach weiteren Umbauschritten erfolgt, und die organischen Metabolite ebenfalls toxisch wirken. Umgekehrt wurde auch der Prozess der Demethylierung beobachtet. Bei einer Person, die in einem Labor mit Trimethylarsin kontaminiert wurde, stiegen u.a. die Konzentrationen von Dimethylarsinsäure, Monomethylarsonsäure und auch anorganischem Arsen im Urin im Vergleich zu Urinproben vor der Exposition (Goessler et al., 1997).

Eine erhöhte Toxizität methylierter Arsenverbindungen könnte dadurch gegeben sein, dass durch den Methylierungsprozess die Substanzen sowohl lipo- als auch hydrophile Eigenschaften haben und deshalb effizient durch Zellmembranen transportiert werden. Sie interagieren mit Enzymen, Proteinen und zerebralen Rezeptoren, welche in ihren Funktionen durch die methylierten Verbindungen blockiert werden können (z.B. Craig, 1986; Denny et al., 1993; Komulainen et al., 1995).

Bei Intoxikation mit anorganischem Arsen treten teilweise schwere Symptome auf, wobei es kaum zu entscheiden ist, von welcher der im Körper entstehenden Arsenverbindung die jeweilige klinische Erscheinung hervorgerufen wird, da der

Methylierungsprozess unmittelbar nach der Resorption des Arsens beginnt. Eine akute Arsenvergiftung ist zunächst gekennzeichnet durch gastrointestinale Symptome (ATSDR, 1990). Fast jedes Organ kann im weiteren Verlauf insuffizient werden: es wurde von einem Arsen-induzierten ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrom) berichtet, Störungen der Leberfunktion sind bekannt geworden, und es kann zu Nierenversagen kommen (Bolliger et al., 1992). Bei chronischer Exposition treten vor allem Haut- und Gefäßläsionen in den Vordergrund. Pigmentveränderungen, Hyperkeratosen und Hautkrebs werden oft gesehen (Mazumder et al., 1992; Hathaway et al., 1991), Störungen der Gefäße führen zu Fußgangränen (blackfoot disease) und einem Arsen-induzierten Raynaud-Phänomen (Morton et al., 1989). Affektionen des Nervensystems durch akute Arsenintoxikation manifestieren sich u.a. in peripheren Polyneuropathien und visuellen Störungen, Delirium, Enzephalopathie und Koma (ATSDR, 1990; Quatrehomme et al., 1992; Di Napoli et al., 1989). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse der durchgeführten Versuche könnten einige der klinischen Symptome erklären: eine Hemmung der Aktivität von AMPA- und NMDA-Rezeptorkanälen durch Dimethylarsinsäure könnte zu einer generellen Abnahme der neuronalen Aktivität führen, mit allen daraus resultierenden Konsequenzen für kognitive Prozesse. Monomethylarsonsäure führte zu einer Steigerung der Aktivität der NMDA-Rezeptorkanäle, wodurch es zu einer Anreicherung der betroffenen Nervenzellen mit Kalzium kommen kann. Zu dem Phänomen einer Glutamat-Überaktivität gibt es viele Studien. Man weiß, dass die daraus resultierende Kalziumlast in den Zellen eine Vielzahl von Kaskaden in Gang setzt und zum Zelltod führen kann. Aus diesem Grund spielt die Überaktivität des NMDA-Rezeptorkanals eine große Rolle bei der Pathogenese verschiedener Hirndysfunktionen wie Epilepsie oder Hirninfarkt, sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Huntington, Morbus Alzheimer und die HIV-assoziierte Demenz (Weahl und Thomson, 1991; Zorumski und Yang, 1988; Lipton und Rosenberg, 1994; Kaul et al., 2001; Lancelot und Beal, 1998). Solche neurologischen Symptome wurden auch bei

chronischer Arsenexposition festgestellt. Zum Beispiel kam es in China durch das Heizen mit Arsen-kontaminierter Kohle bei einem Teil der Bevölkerung zu Ausfällen im sensorischen Bereich mit Hörverlust und Verlust des Geschmacksinns und Sehstörungen sowie Parästhesien und Taubheit der Extremitäten (Liu et al., 2002). 1992 wurde der Fall eines 16-jährigen Mädchens aus Surinam veröffentlicht. Das Mädchen hatte zu Hause Kontakt mit offenen Pestizidsäcken, die Kupferacetatarzen enthielten. Sie litt an epileptischen Anfällen, Muskelschwäche in beiden Beinen und galt als mental retardiert. Klinische Untersuchungen ergaben u.a. eine diffus verlangsamte Hirnaktivität, eine verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit und eine Demyelinisierung peripherer Nerven. Nach Behandlung besserten sich alle Symptome und auch die durchgeführten IQ-Tests zeigten im Laufe der Behandlung bessere Ergebnisse (Brouwer et al., 1992). In anderen Fällen von Arsenintoxikation sind Enzephalopathie (Bolla-Wilson et al., 1987) und auch psychiatrische Erkrankungen wie Konzentrationsverlust, Agitiertheit, paranoide Episoden und emotionale Labilität bekannt geworden (Freeman et al., 1978). Einige der beobachteten klinischen Symptome nach Arsenintoxikation lassen sich, wie oben erwähnt, durch die gefundenen Funktionsänderungen an den Glutamat-Rezeptorkanälen erklären, z.B. Verlust von kognitiven Fähigkeiten, Störungen der Sensorik, epileptische Anfälle. Einen Beweis, dass diese Symptome durch die Interaktion des Arsens mit Glutamat-Rezeptorkanälen verursacht werden, können die Untersuchungen aber letztlich nicht erbringen. Weiterhin ist denkbar, dass Arsen auch über andere Angriffsorte neurotoxisch wirken kann, z.B. über Veränderungen an Gliazellen oder an verschiedenen anderen neuronalen und glialen Proteinen.

#### *4.3.2 Die Bedeutung der Glutamat-Rezeptorkanäle als Angriffsort neurotoxischer Substanzen*

Eine direkte Übertragung von Daten aus Oozyten-Experimenten auf Wirkungen in humanem Nervengewebe ist schwierig. Wenn es an Nervenzellen im Gehirn zu der gleichen Beeinflussung von AMPA- und NMDA-Rezeptorkanälen durch Monomethylarsensäure und Dimethylarsinsäure käme, würde dies eine ernste Interferenz mit der Generierung, Transmission und Prozessierung neuronaler Signale bedeuten.

Wie in der Einleitung beschrieben, besitzen die Glutamat-Rezeptorkanäle eine essenzielle Bedeutung für den Ablauf und die Aufrechterhaltung der Informationsverarbeitung im Gehirn. Eine veränderte Rezeptorkanalaktivität könnte daher einige neurologische Ausfälle nach Arsenexposition erklären. Für organische Arsenverbindungen gibt es in der Literatur kaum konkrete Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion von Arsenverbindungen mit Ionenkanälen. Für andere Schwermetalle sind Angriffe an Ionenkanälen im Gehirn dagegen genau erforscht und dokumentiert. So blockiert Methylquecksilber die über GABA-Rezeptoren vermittelten Ionenströme im Hippokampus und reduziert den Strom an spannungsgesteuerten Kalium- und Natriumkanälen (Yuan und Atchison, 1997; Büsselberg, 1995). Die Beeinflussung des NMDA-Rezeptorkanals durch Zink wird auf verschiedene Weise vermittelt, zum Beispiel über eine allosterische Hemmung einer Polyaminregulatorstelle am Rezeptor, die zu einer reduzierten Kanalöffnung führt (Berger et al., 1999). Die Aktivität des AMPA-Rezeptorkanals wird durch Zink hingegen gesteigert (Peters et al., 1987). Für Blei konnte eine Beeinflussung der Kainat-induzierten Ionenströme festgestellt werden, der Effekt war dosisabhängig und reversibel (Müßhoff et al., 1995). Außerdem hemmt Blei die Aktivität der NMDA-Rezeptorkanäle in Hippokampuszellen. Hierbei konnte sowohl eine schnelle, reversible, als auch eine langsame, irreversible Hemmungskomponente festgestellt werden. Die Hemmungen waren spannungsunabhängig. Der Wirkort des Bleis wird am

Rezeptor selbst vermutet (Alkondon et al., 1990; Ujihara und Albuquerque, 1992; Uteshev et al., 1993).

#### **4.4. Ausblick**

Die Biomethylierung von anorganischem Arsen, wird von vielen Autoren als ein Prozess der Entgiftung angesehen. In den letzten Jahren ist diese Erklärung der Biomethylierung häufig in Frage gestellt worden (Styblo et al., 2000; Vega et al., 2001), da gezeigt werden konnte, dass methylierte Arsenverbindungen ebenfalls toxisch wirken können (Lin et al., 2001; Maas et al., 2001). In einigen Untersuchungen konnte darüber hinaus ein höheres toxisches Potenzial der organischen Arsenverbindungen gegenüber den anorganischen Verbindungen festgestellt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass organische Arsenverbindungen ein neurotoxisches Potenzial besitzen, und dass die hier untersuchten methylierten Arsenverbindungen die Glutamatrezeptoren teilweise stärker beeinflussen, als die anorganische Arsenverbindung.

Konzentrationsangaben von Arsenverbindungen in den Organen und speziell im Gehirn von Kontaminierten wurden bisher kaum publiziert. Benrandame et al. (1999) ermittelten  $147 \text{ mg/kg}^{-1}$  Arsen in der Trockenmasse der Leber und  $26,6 \text{ mg/kg}^{-1}$  Arsen in der Trockenmasse der Nieren eines an Arsenintoxikation Verstorbenen. Der TRK-Wert (Technische Richtkonzentration) wird in Deutschland für alle Arsensubstanzen außer Arsenhydrid mit  $0,1 \text{ mg/m}^3$  angegeben (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1996). Wie hoch die Arsenkonzentration im Gehirn ist, hängt aber offenbar weniger mit der applizierten Menge, als mit der Dauer der Applikation zusammen. In Experimenten mit Ratten fand sich bei andauernder Exposition ein Anstieg der Arsenkonzentration im Mittelhirn und im Kortex (Rodriguez et al., 2001).

Für eine möglichst realistische Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung ist die Kenntnis solcher Konzentrationsverhältnisse wichtig. Des weiteren sollten Ver-

suche zur Permeabilität von Arsen durch die Hüllschichten der Oozyten durchgeführt werden.

Zur näheren Klärung des Wirkmechanismus der Arseneffekte könnte eine Injektion der Arsensubstanzen in die Zelle erfolgen. Es wäre auch möglich, mRNA, die nur für eine Rezeptoruntereinheit kodiert, der Oozyte zu injizieren, um eine genauere Lokalisation des Wirkortes zu bestimmen. Auch die Höhe des Membranpotenzials könnte im Sinne eines spannungsabhängigen Effektes der Arsensubstanzen eine Rolle spielen.

Eine Reihe von weiteren Möglichkeiten, wie Arsen neurotoxisch wirken könnte, kann mit einem Untersuchungsmodell allein nicht geklärt werden. Methylquecksilber wirkt u.a. neurotoxisch durch Freisetzung von Neurotransmittern (Atchison und Narahashi, 1982). Dies könnte durchaus auch für Arsen gelten. In diesem Fall wären Versuche mit intakten neuronalen Netzwerken von Bedeutung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass methylierte Arsenverbindungen in der Lage sind, Rezeptorkanäle in ihrer Funktion spezifisch zu verändern. Diese Fähigkeit macht sie zu Neurotoxinen, die in ihrer Potenz vielleicht den anorganischen Arsenverbindungen überlegen sind.

## Abkürzungen

<b>ACPD:</b>	1-Aminocyclopentan-1,3-Dicarboxylat
<b>AMPA:</b>	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat
<b>APV:</b>	DL-2-Amino-5-Phosphonovalerat
<b>CaCl<sub>2</sub>:</b>	Calciumchlorid
<b>Cl<sup>-</sup>:</b>	Chlorid
<b>CNQX:</b>	5-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
<b>DAG:</b>	Diacylglycerol
<b>DMA<sup>v</sup>:</b>	Pentavalente Dimethylarsinsäure
<b>EDTA:</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>HEPES:</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat
<b>iA<sup>III</sup>:</b>	Trivalente Arsenige Säure
<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositoltriphosphat
<b>IU:</b>	International Unit
<b>KCl:</b>	Kaliumchlorid
<b>MgSO<sub>4</sub>:</b>	Magnesiumsulfat
<b>MMM<sup>v</sup>:</b>	Pentavalente Monomethylarsonsäure
<b>mRNA:</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>Ms 222:</b>	3-Aminobenzoessäureethylester-Methansulfonsalz
<b>M<math>\Omega</math>:</b>	Mega Ohm
<b>NaCl:</b>	Natriumchlorid
<b>NMDA:</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>Oligo:</b>	Oligonukleotid
<b>PIP<sub>2</sub>:</b>	Phosphoinositoldiphosphat
<b>PLC:</b>	Phospholipase C
<b>Poly (A<sup>+</sup>):</b>	polyadenylated
<b>Quis:</b>	Quisqualat
<b>rRNA:</b>	ribosonale Ribonukleinsäure
<b>SDS:</b>	Sodium Dodezyl Sulfat
<b>Tris:</b>	Tris-[Hydroxymethyl]Aminomethan
<b>tRNA:</b>	transfer Ribonukleinsäure



## Literatur

- Adams, 2000: Principles of Neurology, 7<sup>th</sup> ed, p 1212
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1990: ATSDR Case Studies in Environmental Medicine, Atlanta
- Akaike N., Inoue M., Krishtal O.A., 1986: Concentration clamp study of  $\gamma$ -amino-butyric acid-induced chloride current kinetics in frog sensory neurones. *J Physiol (Lond)* 379: pp 171-85
- Alkondon M., Costa A.C.S., Radhakrishnan V., Aronstam R.S., Albuquerque E.X., 1990: Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS Lett* 261: pp 124-130
- Aposhian H.V., Zheng B., Aposhian M.M., Le X.C., Cebrian M.E., Cullen W., Zakharyan R.A., Ma M., Dart R.C., Cheng Z., Andrewes P., Yip L., O'Malley G.F., Maiorino R.M., Van Voorhies W., Healy S.M., and Titcomb A., 2000: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165: p 74
- Appel K.E., Böhme C., Platzek T., Schmidt E., Stinchcombe S., 2000: Organozinnverbindungen in verbrauchernahen Produkten und Lebensmitteln. *Umweltmed Forsch Prax* 5: pp 67-77
- Asztely F., Gustafsson B., 1996: Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* Feb; 12 (1): pp 1-11
- Atchison W.D., Narahashi T., 1982: Methylmercury-induced depression of neuromuscular transmission. *Neurotoxicology* 3: pp 37-50
- Barth L.G., Barth L.J.: Differentiation of cells of the rana pipiens gastrula in unconditioned medium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 7(1959) 210-222
- Bates M.N., Smith A.H., Hopenhayn Rich C., 1992: Arsenic ingestion and internal cancers: a review, *Am. J. Epidemiol.* 135: pp 462-476
- Benramdane L., Accominotti M., Fanton L., Malicier D. and Valon J.J., 1999: *Clin. Chem.*, 45: p 301
- Berger M.L., Rebernik P., 1999: Zinc and Ifenprodil allosterically inhibit two separate polyamine-sensitive sites at N-Methyl-D-Aspartate Receptor

complex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289: pp 1584-1591

Binding N., Altrup U., Said M.N., Speckemann E.-J., Witting, U., 1992: Testing lead neurotoxicity with an in vitro model. *Environmental Hygiene* 3: pp 33-36

Bolla-Wilson K., Bleecker M.L., 1987: Neuropsychological Impairment following inorganic arsenic exposure. *J Occup Med*, 29: pp 500-03

Bolliger C.T., van Zijl P., Louw J.A, 1992.: Multiple organ failure with the adult respiratory distress syndrome in homicidal arsenic poisoning. *Respiration* 59: p 57

Boulter J., Hollman M., O'Shea-Greenfield A., Hartly M., Deneris E., Maron C., Heinemann S., 1990: Molecular cloning and functional expression of glutamate-receptor subunit genes. *Science*, 249: pp 1033-1037

Boyle R.W., Jonasson I.R., 1973: The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element in geochemical prospecting. *J Geochem Explor*, 2: pp 251-297

Broome A.D.J. et al., 1988: The Production and Use of Arsenicals in Wood Preservation, in Reddy R.G., Hendrix J.L., Queneau P.B. (eds.): *Arsenic Metallurgy Fundamentals and Applications; The Metallurgical Society*, Warrendale, PA: pp 491-506

Brouwer O.F., Onkenhout W., Edelbroek P.M., de Kom J.F. M., de Wolff F.A., Peters A.C.B., 1992: Increased neurotoxicity of arsenic in methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 94 (1992) 307-310, Elsevier Science Publisher B.V. 0303-8467/92/S 05.00

Browne C.L., Wiley H.S., Dumont J.N., 1979: Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science* 203: pp 182-3

Buchet J.P. and Lauwerys R., 1944: *Appl. Organomet. Chem.*, 8: pp 191

Büsselberg D., Evans M.L., Rahmann H., Carpenter D.O., 1991: Lead and Zinc block a voltage-activated calcium channel of aplysia neurons. *J. Neurophysiology* 65: pp 786-795

Büsselberg D., 1995: Calcium channels as target sites of heavy metals. *Toxicol Lett* 82: pp 255-261

- Capco D.G., Jeffrey W.R., 1982: Transient localizations of messenger RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* 89: pp 1-12
- Cathala G., Savouret J.F., Mendez B., West B.L., Karin M., Martial J.A., Baxter J.D., 1983: Laboratory Methods: A method for Isolation of intact, translationally active ribonuclein acid DNA 2: pp 329-35
- Challenger, F., 1945: *Chem. Rev.*, 36: p 315
- Challenger F., 1951: *Adv. Enzymology*, 12: p 429
- Chattopadhyay S., Bhaumik S., Chaudhury A.N., Das Gupta S., 2002: Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue cultures. *Toxicol Lett* 128: pp 73-84
- Chen C.J., Chen C.W., Wu M.M., Kuo T.L., 1992: Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br J Cancer* 66: 888-892
- Cheung M.K., Verity M.A., 1985: Experimental methyl mercury neurotoxicity: locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis in vivo and in vitro. *J Neurochem* 44:1799-808
- Choi S.-C., Bartha R., 1993: Cobolamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desuifuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 59: 290-295
- Collins R.C., Olney J.T.W., 1982: Focal cortical seizures cause distant thalamic lesions. *Science*. 1982 Oct 8 ; 218 (4568): pp 177-9
- Craig P.J. (ed), 1986: General comments on the toxicities of organometallic compounds. In: *Organometallic compounds in the environment*. Longmans Group, Harlow
- Craig P.J., Jenkins R.O., Dewick R., Miller D.P., 1999: Trimethylantimony generation by *Scopulariopsis brevicaulis* during aerobic growth. *Sci Total Environ* 299: pp 83-88
- Dascal N., 1987: The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Critical Rev Biochem* 22: pp 317-387
- Denny M.F., Hare M.F., Atchison W.D., 1993: Methylmercury alters intrasynaptosomal concentrations of endogeneous polyvalent cations. *Toxicol Appl Pharmacol* 122: pp 222-232

- Deutsche Forschungsgemeinschaft (eds.), 1996: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK). VCH Verlagsgesellsch, Weinheim
- Di Napoli J., Hall A.H., Drake R., Rumack B.H., 1989: Cyanide and arsenic poisoning by intravenous injection. *Am J Emerg Med* 18: p 308
- Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F., 1999: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: pp 7-61
- Dumont J.N., 1972: Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morph* 136: pp 153-180
- Dumont J.N., Brummet A.R., 1978: Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationship between oocytes and their investing follicular tissues. *J Morph* 155: pp 73-98
- Ehlers M.D., Tingley W.G., Huganir R.L., 1995: Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 269: pp 1734-1737
- Feldmann R.G., White R.F., Eriator II, 1993: Trimethyltin encephalopathy. *Arch Neurol* 50: pp 1320-1324
- Feldmann J., Hirner A.V., 1995: *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 60: p 339
- Fennell J.S., Stacy W.K., 1981: Electrocardiographic changes in acute arsenic poisoning. *Irish journal of medical science*, 150: pp 338-339
- Fischer A.B., Buchet J.P. and Lauwerys R.R., 1985: Arsenic uptake, cytotoxicity and detoxification studied in mammalian cells in culture. *Arch. Toxicol.*, 57: pp 168-172
- Foa V., Colombi A., Maroni M., Buratti M., and Calzaferri G., 1984: *Sci. Total Environ.*, 34: p 241
- Francesconi K.A., Edmonds J.S., 1997: *Adv. Inorg. Chem.*, 44: p 147
- Fraser A.D., 1996: New drugs for the treatment of epilepsy. *Clin Biochem* 29: 97-110
- Freeman J.W., Couch J.R., 1978: Prolonged encephalopathy with arsenic poisoning. *Neurology*, 28: pp 853-55

- Goessler W., Schlagenhaufen C., Kuehnelt D., Greschonig H., and Irgolic K.J., 1997: *Appl Organomet. Chem.*, 11: p 327
- Goyer R.A., 1996: Toxic effects of metals. In Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons (C.D. Klaassen, Ed.), pp 696-697. McGraw-Hill, New York
- Greenpeace Deutschland: Schadstoffbelastung in Sachsen, Analyse der Bodenproben vom 16.8.2002
- Krüger K., Gruner J., Binding N., Madeja M., Musshoff U., 2004: Effects of organometal(loid) compounds on neuronal ion channels: possible sites for neurotoxicity. In: Hirner AV, Emons H (eds.) *Organic metal and metalloid species in the environment*. Springer Verlag: pp 283-315
- Gundersen C.B., Miledi R. und Parker I., 1983: Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond.* 219: pp 103-109
- Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R., Marbaix G., 1971: Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: pp 177-181
- Gutknecht J., 1981: Inorganic mercury transport through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* 61: pp 61-66
- Hall R.A., Soderling T.R., 1997: Differential surface expression and phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2 in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 272: pp 4135-4140
- Harada K., Nagatsugu Y., Ito H., Shingai R., 1991: Intracellular cAMP regulates the response to NMDA in hippocampal neurons. *NeuroReport* 2: pp 673-676
- Hargreaves E.L., Cain D.P., 1992: Hyperactivity, hyper-reactivity, and sensorimotoric deficits induced by low doses of the N-methyl-D-aspartate non-competitive channel blocker MK-801. *Behav Brain Res* 47: 23-33
- Hathaway G.J., Proctor N.H., Hughes J.P., Fischman M.L., 1991: Arsenic and Arsine. In Proctor and Hughes' *Chemical Hazards of the Workplaces*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, van Nostrand Reinhold Co.: pp 92-96

- Hindmarsh J.T., McCurdy R.F: Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity. CRC critical reviews in clinical laboratory sciences, 1986, 23:315-347
- Hirner A.V., Feldmann J., Goguel R., Rapsomanikis S., Fischer R., Andreae O., 1994: Volatile metal and metalloid species in gases from municipal waste deposits. Appl Organomet Chem 8: pp 65-69
- Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B., 1949: Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid Arch Sci Physiol 3: pp 129-50
- Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B., 1952: Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. J Physiol (Lond) 116: pp 424-448
- Hollman M., Heinemann S., 1994: Cloned glutamate receptors. Ann Rev Neurosci , 17: pp 31-108
- Hopenhayn-Rich C., Smith A.H., Goeden H.M., 1993: Human studies do not support the methylation threshold hypothesis for the toxicity of inorganic arsenic. EnvironRes. Feb, 60 (2): pp 161-77
- Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Smith A.H., Kalman D.A., Moore L.E., 1996: Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. Environ Health Perspect 104: pp 620-628
- Houmed K.M., Kuijper J.L., Gilber T.L., Haldeman B.A., O'Hara P.J., Mulvihill E.R., Almers W., Hagen F.S., 1991: Cloning, expression, and gene structure of a G-protein-coupled glutamate receptor from rat brain. Science 252: pp 1318-1321
- Johnson J.W., Ascher P., 1987: Glycine potentiates the NMDA responses in cultured mouse brain neurons. Nature 325: pp 529-31
- Jonas P., Knopf M., Koh D.S., Kues W., Ruppersberg J.P, Vogel W., 1992: Molecular basis of the diversity of voltage-dependent channels in the peripheral and central nervous System. Pflügers Arch 420, Suppl 1: R30
- Kaul M. et al., 2001: Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. Nature 410, 988-994
- Keinänen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Vandoorn T.A., Sakmann B., Seeburg P.H.: A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science 1990; 249:556-560

- Kelso, S.R., Leonard, J.P., 1991: Expression of Exogenous NMDA receptors in *Xenopus* oocytes
- Klumpp D.W., Peterson P.J., 1981: Chemical characteristics of arsenic in a marine food chain. *Mar Biol*, 62: p 297
- Komulainen H., Keränen A., Saano V., 1995: Methylmercury modulates GABA<sub>A</sub> receptor complex differentially in rat cortical and cerebellar membranes in vitro. *Neurochem Res* 10: pp 659-662
- Kuroiwa T., Ohki A., Naka K., Maeda S. 1994: *Appl. Organomet. Chem.*, 8: p 325
- Kuznetsov D.A., Richter V., 1987: Modulation of messenger RNA metabolism in experimental methyl mercury neurotoxicity. *Int J Neurosci* 34: pp 1-17
- Lancelot E., Beal M.F., 1998: Glutamate toxicity in chronic neurodegenerative disease. *Prog. Brain Res.* 116, pp 331-347
- Larkman A.U., Jack J.J.B., 1995: Synaptic plasticity: hippocampal LTP. *Curr Opin Neurobiol* 5: pp 324-334
- Le X.C., Lu X., Ma M., Cullen W.R., Aposhian H.V., and Zheng B.: *Anal. Chem.*, 2000,72, 5172
- Leveque J.-C., Macias W., Rajadhyaksha A., Carlson R.R., Barczak A., Kang S., Li X.-M., Coyle J.T., Haganir R. L., Heckers S., Konradi C., 2000: Intracellular Modulation of NMDA Receptor Function by Antipsychotic Drugs. *Journal of Neuroscience*, 20(11): pp 4011-4020
- Lin S., Cullen W.R., Thomas D.J., 2001: Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductases. *Chem. Res. Toxicol.* 14: pp 305-311
- Lipton S.A., Rosenberg P.A, 1994: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330: pp 613-621
- Liu J., Zheng B., Aposhian H.V., Zhou Y., Chen M.-L., Zhang A., Waalkes M.P., 2002: Chronic arsenic poisoning from burning high-arsenic-containing coal in Guizhou, China. *Environ Health Perspect* 110: pp 119-122
- Löscher W., Hönack D., 1991: Anticonvulsant and behavioural effects of two novel competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, CGP37849

and CGP 39551, in the kindling model of epilepsy. Comparison with MK-801 and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 256: pp 432-440

Lovell M.A., Farmer J.G., 1985: *Human Toxicol.*, 4: p 203

Luo J., Wangr Y., Yasuda J.L.P., Dunah A.W., Wolfe B. B, 1997: The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol. Pharmacol.* 51: pp 79-86

Luong K.V.Q., Nguyen L.T.H., 1999: Organic arsenic intoxication from bird's nest soup. *Am J Med Sci* 317: pp 269-271

Maas M.J., Tennant A., Roop B.C., Cullen W.R., Styblo M., Thomas D.J., Kligerman A.D., 2001: *Chem. Res. Toxicol.*, 14: p 355

Madeja M., Mußhoff U., Speckmann E.-J., 1991: A concentration-clamp system allowing two-electrode voltage-clamp investigations in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Neurosci Methods* 38: pp 267-69

Madeja M., Mußhoff U., 1992: Die Eizellen des Krallenfrosches als Modell in der Neurophysiologie. *EEG-Labor*, 14: pp 25-37

Madeja M., Mußhoff U., Speckmann E.-J., 1995a: Improvement and testing of a concentration-clamp System for oocytes of *Xenopus laevis*. *J Neurosci Meth* 63: pp 211-213

Madeja M., Binding N., Mußhoff U., Pongs O., Witting U., Speckmann E.-J., 1995b: Effects of lead on cloned neuronal voltage-operated potassium channels. *Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 351: pp 320-327

Madeja M., Mußhoff U., Speckmann E.-J., 1997: Follicular tissues reduce drug effects on ion channels in oocytes of *Xenopus leavis*. *Eur J Neurosci* 9: pp 599-604

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., 1982: *Molekular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, 188: p 468

Marafante E., Vahter M., Norin H., Envall J., Sandstroem M., Christakopoulos A., Ryhage R., 1987: *J Appl. Toxicol*, 7: p 111



- Maren S., Baudry M., 1995: Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* Jan, 63(1): pp 1-18
- Mayer M.A., Westbrook G.L., 1987: The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous System. *Prog Neurobiol*, 28: pp 197-276
- Mazumder D.N., Das Gupta J., Chakraborty A.K. et al, 1992: Environmental pollution and chronic arsenicosis in south Calcutta, *Bull World Health Organ*, 70: pp 481,1992
- Mc Bride B.C., Wolfe R.S., 1971: *Biochemistry*, 10: p 4312
- Michaelis E.K., 1998: Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, Vol. 54: pp 370-373
- Miledi R., Parker L., 1984: Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)*, 357: pp 173-83
- Miller B., Sarantis M., Traynelis S.F., Attwell D., 1992: Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid *Nature*, 355: pp 722-725
- 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: pp 529-540
- Morton W.E., Caron G.A., 1989: Encephalopathy: An uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning. *Am J Ind Med*, 15: p 1
- Mozier N.M., Hoffman J.L., 1990: *FASEB J.*, 4: pp 3329-3333
- Murphy M.J., Lyon L.W., Taylor J.W., 1981: Subacute arsenic neuropathy: clinical and electrophysiological observations. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*, 44: pp 896-900
- Mußhoff U., Madeja M., Bloms P., Speckmann E.-J., 1992: Time course of glutamate receptor expression in individual oocytes of *Xenopus laevis* after injection of rat brain RNA. *Comp. Biochem. Physiol.* 103: pp 189-193
- Mußhoff U., Binding N., Madeja M., Witting U., Speckmann E.-J., 1995: Actions of lead on non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 429 [Suppl 6]: R31

- Nadakavukaren J.J. et al., 1984: Seasonal variation of arsenic concentration in well water in Lane County, Oregon. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 33: pp 264-269
- Namgung U., Xia Z., 2000: Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 20: pp 6442-6451
- Needleman H.L., Gunnoe C., Leviton A., Reed R., Peresie H., Maher C., Barrett P., 1979: Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med*, 300: pp 689-695
- Needleman H.L. und Bellinger D., 1991: The health effects of low level exposure to lead. *Annu Rev Public Health* 12: pp 111-140
- Nicoletti F., Wroblewski J.T., Novelli A., Guidotti A., Costa E., 1986: Excitatory amino acid signal transduction in cerebellar cell cultures *Funct Neurol*. Oct-Dec; 1(4): pp 345-9
- Nicoll R.A., Malenka R.C., Kauer J.A., 1990: Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous System. *Physiol. Rev.*, 70: pp 513-565
- Nieuwkoop P.D., 1977: Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. *Curr Top Dev Biol*, 11: pp 115-32
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A., 1984: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307: pp 462-465
- Pardo L.A., Heinemann S.H., Terlau H., Ludwig U., Lorra C., Pongs O., Stürmer W., 1992: Extracellular  $K^+$  specifically modulates a rat brain  $K^+$  channel. *Proc Natl Acad Sei USA*, 89: pp 2466-2470
- Peters S., Koh J., Choi D.W., 1987: Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, 236: pp 589-593
- Petrick J.S., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E., Aposhian H.V., 2000: Monomethylarsonous acid (MMA) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxi Appl Pharmacol*, 163: pp 203-207
- Pocock S.J., Smith M., Baghurst P., 1994: Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence. *BMJ*, 309: pp 1189-1197

- Pongratz R. und Heumann K.G., 1998: Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae – a significant source for atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere* 36: pp 1935-1946
- Quatrehomme G., Ricq O., Lapalus P., 1992: Acute arsenic intoxication: Forensic and toxicologic aspects (an observation). *J Forensic Sci*, 37: p 1163
- Raman I.M., Tong G., Jahr C.E., 1996: Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron*, 16: pp 415-421
- Randle J.C.R., Vernier P., Garrigues A.-M. und Brault E, 1988.: Properties of kainate channels in rat brain mRNA injected *Xenopus* oocytes: Ionic selectivity and blockade. *Mol. Cell. Biochem.*, 80: pp 121-132
- Robinson K.R., 1979: Electrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sei U S A*, 76: pp 837-41
- Rodriguez V.M., Carrizales L., Jimenez-Capdeville M.E., Dufour L., Giordano M., 2001: The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat *Brain Res Bull*. May 15, 55(2): pp 301-8
- Rogawski M.A., 1992: The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy. A Status report. *Drugs*. Sep, 44(3): pp 279-92
- Schoepp D.D., Conn P.J., 1993: Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacol. Sei.*, 14: pp 13-20
- Sekigushi M., Okamoto K., Sakai Y., 1990: Glycine-insensitive NMDA-sensitive receptors expressed in *Xenopus* oocytes by guinea pig cerebellar mRNA. *J. Neurosci.*, 10: pp 2148-2155
- Shiomi K., 1992: Chemical form, toxicity and metabolism of arsenic contained in marine organisms. *J Food Hyg Soc Jpn*, 33: pp 1-10
- Siegel E., 1987: Properties of single sodium channels translated by *xenopus* oocytes after injection with messenger ribonucleid acid. *J. Physiol.*, 386: pp 73-90
- Sladeczek F., Pin J.-P., Recasens M., Bockaert J., Weiss S., 1985: Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature*, 317: pp 717-719

- Smith A.H., Goycolea M., Haque R., Biggs M.L., 1998: Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol*, 147: pp 660-669
- Smith A.H., Lingas E.O., Rahman M., 2000: Contamination of drinking-water by arsenic in Banaladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, 78 (9) Ref. No. 00-0751
- Snutch T. P., 1988: The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci.*, 11: pp 250-256
- Speckmann, E.-J., 1983: Einführung in die Neurophysiologie I. EEG-Labor 5, pp 114-131 und Einführung in die Neurophysiologie II. EEG-Labor 5, pp 154-168
- Styblo M., del Razo L.M., Vega L., Germolec D.R., LeCluyse E.L., Hamilton G.A., Reed W., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J., 2000: Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol*, 74: pp 289-299
- Sumikawa K., Houghton M., Emtage J.S., Richards B.M., Barnard E.A., 1981: Active multi-subunit acetylcholine receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 292: pp 862-864
- Takeuchi T., 1968: Pathology of Minamata disease. In: Minamata disease (Kustuma M., ed), study group of Minamata disease, Kumamoto University, Japan: pp 141-228
- Takeuchi T., 1982: Pathology of Minamata disease. *Acta Pathol Jpn*, 32: pp 73-99
- Thayer J.S., 1995: Environmental chemistry of the heavy elements: hydrido and organo compounds. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp 29-41
- Tingley W.G., Ehlers M.D., Kameyama K., Doherty C., Ptak J.B., Riley C.T., Haganir R.L., 1997: Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 iubunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem*, 272: pp 5157-5166
- Tsai G., Goff D.C., Chang R.W., Flood J., Baer L., Coyle J.T., 1998: Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry*. Sep(9): pp 1207-13

- Tseng W.P., 1997: Effects and dose-response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic, *Environ. Health Perspect*, 19: pp 109-119
- Turpeinen R., Pansar-Kallio M., Häggblom M., Kairesalo T., 1999: Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Sci Total Environ*, 238: pp 173-180
- U.S. Environmental Protection Agency, 1988: Special report on inorganic arsenic: skin cancer, nutritional essentiality. EPA 625/3-87/013. U.S. Environmental Protection Agency. Risk Assessment Forum, Washington. DC
- Ujihara H., Albuquerque E.X., 1992: Developmental change of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 263: pp 868-875
- Ullmann, 5<sup>th</sup> ed., vol. A3, pp. 113-141
- Umwelt Forschungszentrum Pressemitteilung vom 6.9.2002
- Uteshev V., Büsselberg D., Hass H.L., 1993: Pb<sup>2+</sup> modulates the NMDA-receptor-channel complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 347: pp 209-213
- Vahter M., 1981: *Environ Res*, 25: p 286
- Vahter M. and Marafante E., 1983: Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem.-Biol. Interact.*, 47: pp 29-44
- Vahter M., Marafante E., 1993: *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 29: Biological Properties of Metal Alkyl Derivates* (Sigel H., and Sigel A., eds.), Dekker, New York: pp 161-184
- Vahter M., 1999: Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci Prog.*, 82: pp 69-88
- Vega L., Styblo M., Patterson R., Cullen W., Wang C., Germolec D., 2001: Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 172: pp 225-232
- Watkins J.C., Olverman H.J., 1987: Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors, *Trends Neurosci. (Band 10)*: pp 265-272

- Weahl T., Thomson A.M. (eds), 1991: Excitatory Amino acids and synaptic transmission. Academic Press, London
- Wesbey G., Kunis A., 1981: Arsenical neuropathy. Illinois medical journal, 150: pp 396-398
- Wischnitzer S., 1966: The ultrastructure of the cytoplasm of the developing amphibian egg. Adv Morphog, 5: pp 131-79
- Witting U., Binding N., Neidt U., Madeja M., Mußhoff U., Altrup., Speckmann E.-J., 1997: Neue Möglichkeiten zur Beurteilung neurotoxischer Gefahrstoffe. In: Gefährdung des Menschen in der heutigen Arbeitswelt. Hrsg.: F.W. Schmahl, U. Brehme, H. Hanke, H. Krueger, A.W. Rettenmeier; Erich Schmidt Verlag, Berlin: pp 37-53
- World Health Organization, 1981: Environmental Health Arsenic. Geneva, Criteria, No. 18
- Yamauchi H., Takahashi K., Mashiko M., Saitoh J. and Yamamura Y., 1992: Appl Organomet. Chem., 6: p 383
- Yang X.C, Karschin A., Labarca C., Elroy-Stein O., Moss B., Davidson N., Lester H.A., 1991: Expression of ion channels and receptors in Xenopus oocytes using vaccinia virus. FASEB J. May, 5(8): pp 2209-16
- Yuan Y.K., Atchison W.D., 1997: Action of methylmercury on GABA(A) receptor-mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory synaptic transmission. J Pharmacol Exp Ther, 282: pp 64-73
- Zorumski C.F., Yang J., 1988: AMPA, kainate, and quisqualate activate a common receptorchannel complex on embryonic chick motoneurons. J Neurosci, 8: pp 4277-4286

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Janina Melanie Gruner  
geb. am 25.10.1978 in Bielefeld

### **Schulbildung**

1985 Einschulung in die Städt. Grundschule Hoberge-Uerentrup (Bielefeld)

1988 Besuch der Fritz-Gansberg-Schule in Wiesbaden

1989 Abschluß des 2. Halbjahres der 4. Klasse in der Grundschule  
Hoberge-Uerentrup in Bielefeld

1989-1998 Gymnasium am Waldhof in Bielefeld

### **Studium**

15.04.1999 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

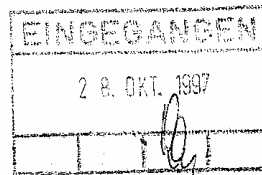
13.03.2001 Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung

20.03.2002 Ablegung des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

29.03.2004 Ablegung des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

18.04.2004-18.04.2005 Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Bielefeld Mitte

25.04.2005 Ablegung des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Institut für Physiologie und  
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung  
Herrn Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Robert-Koch-Str. 27 a

Dienstgebäude  
Alter Steinweg 22-24  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: G 106  
Frau Möllers

Aktenzeichen  
23.0835.1.0 (G 32/97)

48149 Münster

23 . Oktober 1997

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 08.08.1997

### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Neufassung vom 17.  
Februar 1993 (BGBI. I S. 254) in geltender Fassung wird Ihnen  
die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens  
erteilt:

#### **Experimentelle Epilepsieforschung.**

Leiter des Versuchsvorhabens ist:

Herr Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann  
Institut für Physiologie und  
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung  
der Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Telex 892870 rpms . Telefax (0251) 411-2525

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 10 . 12 . 14 bis Domplatz



Stellvertretende Leiter des Versuchsvorhabens sind:

1. Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Heidrun Straub  
Institut für Physiologie  
der Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
  
48149 Münster
2. Herr Prof. Dr. med. Ulrich Altrup  
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung  
der Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
  
48149 Münster
3. Herr Priv.-Doz. Dr. med. Michael Madeja  
Institut für Physiologie  
der Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
  
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 31. 10. 2000.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere -  
pro Jahr - verwendet werden:

50 Mäuse  
440 Ratten  
250 Meerschweinchen  
4 Kaninchen  
30 Frösche  
750 Landschnecken.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

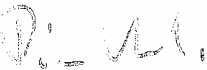
Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

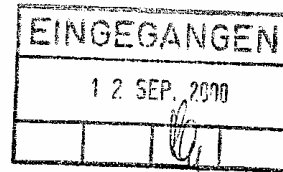
Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag



( Dr. Piontkowski )



Bezirksregierung Münster



Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Herrn  
Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Institut für Physiologie der  
Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
  
48149 Münster

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
  
Aktenzeichen  
23.0835.1.0 ( G 32/97 )

7 . September 2000

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren  
Verlängerung des Tierversuchs G 32/97:  
" Experimentelle Epilepsieforschung "

Bezug: Antrag vom 24.08.2000  
Mein Genehmigungsbescheid vom 23.10.1997 - Az.: w. o. -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekannt-  
machung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren  
Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a.  
Versuchsvorhabens bis zum 31.10.2001.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn  
Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Institut für Physiologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Robert-Koch-Straße 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Telefax: 2115  
Raum: 431  
Auskunft erteilt:  
Frau Möllers  
E-Mail:  
irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 32/97)

14. 08.2001


Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren  
2. Verlängerung des Tierversuchs G 32/97:  
„Experimentelle Epilepsieforschung“  
Bezug: Antrag vom 25.07.2001  
Mein Genehmigungsbescheid vom 23. Oktober 1997  
- Az. 23.0835.1.0 (G 32/97) -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf den o. a. Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o. a. Versuchsvorhabens bis zum **31.10.2002**,

Für den im o. a. Genehmigungsbescheid unter Ziffer 3 aufgeführten stellvertretenden Leiter des Versuchsvorhabens habe ich an Stelle von Herrn Dr. Michael Madeja jetzt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff, Institut für Physiologie, Robert-Koch-Straße 27 a, 48149 Münster, eingesetzt.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

  
Dr. Piontkowski

### Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

E-Mail: [poststelle@bezreg-muenster.nrw.de](mailto:poststelle@bezreg-muenster.nrw.de) • Internet: [www.bezreg-muenster.nrw.de](http://www.bezreg-muenster.nrw.de) • zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf. Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz (Häuser A, B, C, H),

Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W), Linie 15 bis Haltestelle Inselbogen (Haus F), Linie 1 • 9 bis Haltestelle Königsweg (Haus D).

Die Häuser S und T sind fußläufig 5 Min. vom Hbf in Richtung Innenstadt erreichbar.