

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

**Wirkungen von Trimethylantimondichlorid auf neuronale Glutamat-
und GABA-gesteuerte Rezeptorkanäle**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Rösner, Dennis

aus Unna

-2008-

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Mußhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Binding

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.08

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

Zusammenfassung

Wirkungen von Trimethylantimon-dichlorid auf neuronale Glutamat- und GABA-gesteuerte Rezeptorkanäle

Dennis Rösner

Die vorliegende Untersuchung hatte das Ziel, die Auswirkungen von Trimethylantimon-dichlorid auf Glutamat- und GABA-gesteuerte-Rezeptorkanäle zu überprüfen. Dabei wurden die Glutamat-Subrezeptoren vom AMPA- und NMDA-Typ sowie der GABA_A-Rezeptortyp untersucht.

Mittels Injektion von Rattenhirn-mRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* wurden die glutamatergen und GABAergen Ionenkanäle exprimiert. In der Voltage-clamp-Konfiguration wurden rezeptorvermittelte Ionenströme unter Einfluss der Konzentration von Antimon registriert.

Bei einer Konzentration von 0,1 µmol/l Antimon sank die Amplitude des Ioneneinstroms auf $90\% \pm 1\%$ (n=4) des Ausgangswertes bei AMPA-Rezeptoraktivierung und bei NMDA-Rezeptoraktivierung auf $89\% \pm 2,4\%$ (n=5). Mit einer Konzentration von 1 µmol/l Antimon ergab sich am AMPA-Rezeptor eine Hemmung auf $96\% \pm 2,8\%$ (n=10) und am NMDA-Rezeptor eine Hemmung auf $87\% \pm 8,7\%$ (n=10) der Ausgangswerte. Mit 10 µmol/l Antimon sank die Amplitude auf $89\% \pm 3,5\%$ (n=11) bei AMPA-Rezeptorkanälen, während bei NMDA-Rezeptorkanälen eine Hemmung auf $86\% \pm 8,3\%$ (n=15) zu beobachten war. Mit der höchsten Konzentration von 100 µmol/l Antimon stellten sich Hemmungen von $88\% \pm 2,6\%$ (n=13) bei AMPA-Rezeptorkanälen, $85\% \pm 5,3\%$ (n=15) bei NMDA-Rezeptorkanälen und $84\% \pm 5\%$ (n=8) bei GABA_A-Rezeptorkanälen ein.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Trimethylantimon einen Einfluss auf Glutamat- und GABA-Rezeptorkanäle ausübt und das Krankheitsbild von neuronalen Intoxikationen bewirken kann.

Die tierexperimentelle Arbeit wurde vom Regierungspräsidenten Münster mit Schreiben vom 19.12.2002 genehmigt (Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 79/2002)).

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.08

Inhaltsverzeichnis

	Kapitel	Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Neurotoxizität	1
1.2	Neurotoxizität von Schwermetallen	1
1.3	Entstehung von Antimonverbindungen	3
1.4	Vorkommen und Umweltrelevanz von organischen Antimonverbindungen	4
1.5	Toxikologie von (an)organischen Antimonverbindungen	5
1.6	Störungen der Funktion von Ionenkanälen als Ursache neurotoxischer Prozesse	6
1.7	Fragestellung	9
2.	Methodik und Materialien	10
2.1	Das Expressionssystem der Xenopus Oozyten	10
2.2	Oozyten des Xenopus laevis	11
2.3	Präparation der Oozyten von Xenopus laevis	12
2.4	RNA-Extraktion und Kultivierung der Oozyten von Xenopus laevis	13
2.5	Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung	16
2.6	Elektrophysiologische Untersuchungstechnik	17
2.7	Substanzapplikation	19
2.8	Versuchsprotokoll	20
2.9	Auswertung und statistische Beurteilung	22
3.	Ergebnisse	23
3.1	Charakterisierung der AMPA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme	23
3.1.1.	Repetitive Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle durch den synthetischen Agonisten Kainat	25
3.2	Charakterisierung der NMDA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme	27
3.2.1.	Repetitive Aktivierung der NMDA-Rezeptorkanäle durch den Agonisten NMDA	28

3.3	Charakterisierung der GABA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme	31
3.3.1	Repetitive Aktivierung der GABA _A -Rezeptorkanäle durch GABA	32
3.4	Wirkungen von Trimethylantimon-dichlorid auf die bioelektrische Membraneigenschaften von <i>Xenopus laevis</i> – Oozyten	34
3.4.1	Wirkung von Trimethylantimon-dichlorid auf AMPA-Rezeptorkanäle	35
3.4.2	Wirkung von Trimethylantimon-dichlorid auf NMDA-Rezeptorkanäle	40
3.4.3	Wirkung von Trimethylantimon-dichlorid auf GABA _A -Rezeptorkanäle	45
4.	Diskussion	48
4.1	Diskussion des methodischen Vorgehens	48
4.1.1	Perspektiven und Grenzen des Expressionssystems der <i>Xenopus</i> Oozyten	48
4.1.2	Vor- und Nachteile des Versuchsprotokolls	51
4.2	Interpretation der erhobenen Ergebnisse	52
4.2.1	Konzentrationsabhängigkeit der Effekte durch Trimethylantimon-dichlorid	54
4.2.2	Abhängigkeit der Effekte von Trimethylantimon-dichlorid von der Follikelschicht	55
4.2.3	Abhängigkeit der Effekte von Trimethylantimon-dichlorid vom Rezeptorkanaltyp	56
4.3	Bedeutung der gefundenen Antimoneffekte bezüglich des Nervensystems	56
5.	Literaturverzeichnis	60
	Danksagung	66
	Lebenslauf	67
	Anhang	68

1. Einleitung

1.1 Neurotoxizität

Schädigungen von Nervengewebe können u. a. durch chemische Stoffe, so genannte Neurotoxine, entstehen. Durch diese neurotoxischen Wirkungen kommt es zu Beeinträchtigungen der komplex vernetzten Nerven- und Gliazellverbände, die in der Folge Störungen in peripheren oder zentralen Teilbereichen des Nervensystems hervorrufen können. Eine direkte Neurotoxizität kann durch unmittelbare Schädigung der Nervenzellen hervorgerufen werden, während indirekte neurotoxische Prozesse durch Schädigung von Gliazellen oder durch Veränderung der Extrazellularflüssigkeit hervorgerufen werden. Neurotoxine können die Nervenzelle einerseits funktionell stören, etwa durch die Beeinflussung von Ionenkanälen, oder strukturell, wie beispielsweise durch die Veränderung des Zellmetabolismus. Sowohl funktionelle als auch strukturelle Schädigungen können die Aktivität und Vitalität der Zelle derart beeinträchtigen, dass sie letztlich zum Zelltod führen können.

Bei den Neurotoxinen unterscheidet man zwischen endogenen und exogenen Stoffen. Endogene Toxine sind körpereigene Substanzen, die durch Abbau-, Umbau- oder Eliminationsprozesse im Organismus entstehen können. Zu den zahlreich in der Umwelt vorkommenden exogenen Neurotoxinen zählen u. a. Dioxin, Chlorphenole und Schwermetalle.

1.2 Neurotoxizität von Schwermetallen

Bei vielen Schwermetallen ist das neurotoxische Potential bereits erkannt. Blei führt beispielsweise zu einer Verzögerung der Nervenleitgeschwindigkeit peripherer Nerven

bis zur Unterbrechung der Nervenleitung mit ihren entsprechenden Ausfallerscheinungen.

Des Weiteren treten Enzephalopathien und Demenz bei bleiexponierten Erwachsenen sowie Entwicklungsverzögerungen bei Kindern mit chronischer Bleivergiftung auf (Needleman et al., 1979; Needleman und Bellinger, 1991; Pocock et al., 1994). Das neurotoxische Metall Arsen führt zu sensorischen Störungen wie schmerzhaften Parästhesien und Taubheitsgefühlen in den Extremitäten (Mazumder et al., 1992; Luong und Nguyen, 1999). Der zu diesen Erscheinungen führende Pathomechanismus ist vielfach noch unbekannt. Bei einigen neurotoxischen Metallsubstanzen konnte inzwischen ein direkter Angriff an verschiedenen Ionenkanälen und Rezeptoren nachgewiesen werden. So reduziert zum Beispiel Blei den Kalium-Strom über spannungsabhängige K^+ -Kanäle (Madeja et al., 1995) und blockiert die AMPA-Rezeptorkanäle (Mußhoff et al., 1995).

Ein bekanntes Beispiel für eine Schädigung des Nervensystems infolge einer Vergiftung mit einer metall(oid)organischen Verbindung ist die epidemische Methylquecksilbervergiftung durch kontaminierten Fisch in Japan Ende der 50er Jahre (Minamata-Krankheit, z.B. Takeuchi, 1982). Metall(oid)organische Substanzen sind toxischer einzustufen als ihre entsprechenden anorganischen Verbindungen, was wahrscheinlich auf ihre erhöhte Lipophilie zurückzuführen ist (z.B. Craig, 1986). Arsen bildet nach bisherigem Kenntnisstand dabei eine Ausnahme. Alkylgruppen sind hierbei im Allgemeinen toxischer als Arylgruppen, was besonders für Methyl- Ethyl- und Propylgruppen gilt. Bei Trialkylzinnverbindungen weisen Methyl- und Ethylgruppen eine höhere Toxizität für Säugetiere aus. Höhere Alkylgruppen sind dabei toxischer für Bakterien, Wirbellose und Fische, aber geringer für Säugetiere (Craig, 2003).

Metall(oid)organische Verbindungen können über Hautkontakt, über die Lunge und den Intestinaltrakt in den menschlichen Organismus gelangen. Außerdem können Mikroorganismen, die sich im Intestinaltrakt befinden, in Anwesenheit von Methan anorganische Metall(oid)e methylieren (humane Biogenese).

Ein weiteres Neurotoxin ist Antimon, das in seiner Wirkung mit entsprechenden Arsenverbindungen zu vergleichen ist. In niedrigen Dosen können Antimonverbindungen wachstumsfördernd wirken, wohingegen sie in höheren Dosen toxischer sein können als Blei- oder Arsenverbindungen. Organischen Antimonverbindungen sind aufgrund ihrer lipophilen Gruppen membrangängig und können somit durch Zellwände diffundieren und im Fettgewebe gelöst und transportiert werden. Somit erklärt sich die bereits erwähnte höhere Toxizität.

Der hydrophile anorganische Anteil bewirkt die Löslichkeit in Wasser und Körperflüssigkeiten. Nach der Resorption erfolgt meist die Abspaltung einer Methylgruppe, sodass die Verbindung eine erhöhte Elektrophilie zu basischen Gruppen aufweist. Seine Wirkung im Organismus entfaltet das Antimon z. B. durch die Anheftung an Enzymen als Substratbindungshemmer (Craig, 2003) und kann durch die Störung des Reparaturmechanismus die DNA schädigen und somit zu klastogenen Effekten führen (Gebel, 1997).

1.3 Entstehung von Antimonverbindungen

In der stabilen Modifikation ist Antimon ein silberglänzendes und sprödes Halbmetall. Antimonverbindungen können drei- und fünfwertig vorkommen (Mok und Wai, 1990; Bertine und Lee, 1983; Middleburg et al., 1988), wobei die fünfwertige Form des Antimons toxischer als die dreiwertige Form zu sein scheint (Takayanagi, 2001). Bei der in

dieser Arbeit untersuchten Substanz handelt es sich um Trimethylantimonchlorid: $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$.

Diese Verbindung kann entweder anthropogenen oder biogenen Ursprungs sein. Beim Letzteren handelt es sich um das Produkt einer Biotransformation.

Hierbei können Mikroorganismen Metalle und Metalloide durch Oxidation, Reduktion, Alkylierung und Dealkylierung modifizieren (z. B. Choi und Barta, 1993; Thayer, 1995; Pongratz und Heumann, 1998; Turpeinen et al., 1999; Craig et al., 1999, 2003). Es kommt dabei zur Veränderung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Elemente. Antimonorganische Verbindungen entstehen durch Bioalkylierung, wobei fast ausschließlich Mikroorganismen eine direkte Verbindung von Alkylgruppen zu einem Antimonatom bewirken können.

Die Methylgruppe ist die dabei am häufigsten anzutreffende Alkylgruppe, so dass der Entstehungsprozess auch als Biomethylierung bezeichnet wird. Verantwortlich für die Biomethylierung sind verschiedene aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien, Pilze und niedere Algen (Gates et al., 1997; Gürleyük et al., 1997; Jenkins et al., 1998). Höhere Lebewesen, einschließlich des Menschen, scheinen nur bei Arsen, Selen und Tellur zur Biomethylierung befähigt zu sein (Craig, 2003).

1.4 Vorkommen und Umweltrelevanz von organischen Antimonverbindungen

In der Umwelt konnten metall(oid)organische Verbindungen anthropogenen oder biogenen Ursprungs für folgende Metall(oid)e nachgewiesen werden: Blei, Quecksilber, Cadmium, Zinn, Arsen, Phosphor, Antimon, Bismuth, Germanium, Jod, Thallium (z. B. Hirner et al., 1994; Thayer, 1995; Feldmann und Hirner, 1995; Hirner et al., 1998; Gebel et al., 1995; Li et al., 1993).

Organische Antimonverbindungen entstehen durch Biomethylierung und kommen in der Umwelt gehäuft an Stellen vor, an denen sich Bakterien und andere Mikroorganismen aufhalten, beispielsweise auf Mülldeponien (Hirner et al., 1994; Feldmann und Hirner, 1995) und Sedimenten von Flüssen und Häfen (Thayer, 1995).

Dabei findet man Antimonverbindungen häufig zusammen mit entsprechenden Arsen- oder Bleiverbindungen (Elinder und Friberg, 1986), daher auch der griechische Name *anti* und *monos* = nicht allein. Ein sehr großer Anteil ist jedoch anthropogenen Ursprungs. Antimonverbindungen werden seit über 2000 Jahren in kosmetischen und pharmazeutischen Präparaten verwendet. Die Weltproduktion von mineralischem Antimon wie Antimonit lag 2000 bei etwa 100.000 Tonnen pro Jahr. Es findet Verwendung in Akkumulatorbatterien und Bremsscheiben zur Erhöhung der Härte von Legierungen. Bedeutsam ist ebenfalls die Verwendung von Antimonverbindungen als Flammschutzmittel, wie beispielsweise in PVC-Schutzböden (Carson et al., 1986; Stokinger, 1981). Des Weiteren wurden Anreicherungen von Antimon bei einigen Pflanzenarten sowie in Säugetierorganen, z.B. nach einer chemotherapeutischen Behandlung festgestellt. Ein weiterer Eintrag in die Umwelt ist das Verbrennen von fossilen Brennstoffen wie Öl und Kohle sowie Industrieabfällen aus Stahlwerken (Nriagu und Pacyna, 1988).

1.5 Toxikologie von (an)organischen Antimonverbindungen

Durch Antimonverbindungen werden unterschiedliche Vergiftungsformen verursacht. Vergiftungen durch Antimon allein sind allerdings selten, da die Vergiftung durch mitwirkende Arsen- oder Bleiverbindungen überwiegt. Außerdem können Antimonsalze die Wand des Intestinaltraktes nur schwer durchwandern. Akute Vergiftungen durch Antimon sind charakterisiert durch Schmerzen im Abdominalbereich, Diarrhoe und

Emesis. Chronische Vergiftungsformen zeigen sich u. a. durch eine orange bis gelbbraune Verfärbung der Zähne. Die Vergiftung kann sich in verschiedenen Organen manifestieren und beispielsweise zur Lebernekrose, Nephritis, Pankreatitis führen (De Wolff, 1995; Stemmer, 1976).

Auch wurden Wirkungen auf das Kreislaufsystem beobachtet (Silverman und Stern, 1994; Winship, 1987). Hierbei sinkt die Kontraktionskraft des Herzens bedingt durch eine Hyperkaliämie und ist begleitet von Bradykardie, Synkope und Hypotonie (Honey, 1960; Hepburn et al., 1994). Außerdem können sich durch das Inhalieren von antimonhaltigen Stäuben oder Gasen Formen von Dermatitis, Keratitis oder Nasenscheidewandvereiterungen manifestieren oder zum Krankheitsbild der Staublung führen (Brieger et al., 1954). Der MAK-Wert für Antimon beträgt $0,5 \text{ mg/m}^3$.

1.6 Störungen der Funktion von Ionenkanälen als Ursache neurotoxischer Prozesse

Die Funktion der beteiligten Nervenzellen beeinflusst die Weitergabe von neuronalen Informationen im Nervenzellverband, wobei die membrangebundenen Ionenkanäle der Nervenzellen ein grundlegendes Element in der Informationsverarbeitung des Nervensystems darstellen (z. B. Speckmann, 1983). Diese Ionenkanäle sind in der Zellmembran eingelagerte Tunnelproteine, durch die verschiedene Ionen zwischen Extra- und Intrazellularraum permeieren können, je nach ihren entsprechenden Konzentrationsunterschieden. Es entsteht somit schon in der Ruhephase ein Konzentrationsunterschied, der sich zu einer messbaren elektrischen Spannung aufbaut. Diese Spannung nennt man Membranpotential oder Ruhemembranpotential (RMP). Bei einer Aktivierung der Ionenkanäle treten zusätzliche transmembranöse Ionenströme auf, die eine Änderung des Konzentrationsunterschiedes bewirken und somit das Membranpotential ändern. Solche

Schwankungen des Membranpotentials können u. a. als neuronale Erregung in Form von Aktionspotentialen auftreten. Sie werden von spannungsgesteuerten Ionenkanälen erzeugt und dienen der Weiterleitung einer Erregung entlang der Nervenzelle. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen sich bei einer Verringerung des Membranpotentials (Aktivierung durch Depolarisation) und sind selektiv permeabel für Natrium-, Kalium- oder Kalziumionen.

Es gibt neben spannungsabhängigen Ionenkanälen, welche für die Bildung und Weiterleitung von Aktionspotentialen verantwortlich sind, auch die transmitter- oder ligandengesteuerten Ionenkanäle, die für die Weitergabe der Informationen von Nervenzelle zu Nervenzelle, den Synapsen, zuständig sind. Sie bewirken die Weitergabe der Informationen im Zellverband.

Bei Verschiebung des Membranpotentials in der präsynaptischen Struktur wird ein chemischer Botenstoff, ein Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt zwischen zwei Nervenzellen ausgeschüttet.

Der Neurotransmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) wird von hemmenden Neuronen ausgeschüttet. Er bewirkt eine Aktivierung von GABA-sensitiven Rezeptoren an der postsynaptischen Membran, die durch Permeabilitätserhöhung für Chlorid- und Kaliumionen eine Hyperpolarisation erreichen und somit ein inhibierendes postsynaptisches Potential (IPSP) zur Folge haben. Bei einem erregenden postsynaptischen Potential (EPSP) werden die neuronalen Signale in der nachgeschalteten Nervenzelle umcodiert. EPSPs werden durch erregende Synapsen verursacht, die an der postsynaptischen Membran Glutamat-Rezeptoren enthalten und somit auf den erregenden Neurotransmitter Glutamat reagieren. Glutamat bewirkt somit eine Depolarisation in der nachfolgenden Nervenzelle. Glutamat-Rezeptoren lassen sich in vier Subtypen unterteilen. Sie

werden jeweils durch ihren pharmakologisch-spezifischen Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), Kainat, α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat (AMPA) und tACPD aktiviert (Nicoll et al., 1990; Henneberry, 1992).

Bei den drei erstgenannten Subtypen treten die Agonisten in Wechselwirkung mit ihrer spezifischen Bindungsstelle und bewirken eine Konformationsänderung des Komplexes, der wiederum einen Ioneneinstrom durch seine zugeordnete Ionophore ermöglicht (ionotrope Rezeptorkanäle).

Die Leitfähigkeitszunahme von Natriumionen, welche die schnelle Komponente des EPSP darstellen, wird durch die Aktivierung der AMPA-sensitiven Rezeptorkanäle ermöglicht. Die durch AMPA-Rezeptoren vermittelte Depolarisation hebt die durch Mg^{2+} -Ionen bedingte Blockade bei den NMDA-Rezeptorkanälen aufgrund der Potentialverschiebung auf. Infolgedessen wird der liganden- und spannungsgesteuerte NMDA-Rezeptorkanal aktiviert. Er erlaubt den Einstrom von Natrium- und Kalziumionen in die Nervenzelle und ist die langsame Komponente der erregenden postsynaptischen Übertragung.

Wenig ist bisher bekannt über die genaue synaptische Lokalisation und physiologische Bedeutung der Kainat-Rezeptorkanäle. Sie sind permeabel für Natriumionen. Der mGlu-Rezeptor, der durch tACPD aktiviert wird, löst eine Stoffwechselkaskade aus, die u. a. über Inositolphosphate in eine intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen mündet.

Neurotoxische Prozesse können als Ursache eine Störung der beschriebenen spannungs- und transmittergesteuerten Ionenkanäle haben. Dabei sind Störungen der Glutamat-sensitiven Rezeptorkanäle bedeutsam, da insbesondere eine erhöhte Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen NMDA-Rezeptoren zu einer „Erregungstoxizität“ führt. Ein solcher

übermäßiger Kalziumionen-Einstrom in die Zelle, der bis zum Zelltod führen kann, ist charakteristisch für die Erregungstoxizität. Ursache dafür kann eine Überaktivierung der AMPA-Rezeptoren mit der dadurch ausgelösten gesteigerten NMDA-Rezeptorkanal-Aktivität sein. Eine übermäßige Glutamatausschüttung kann als Folge von epileptischer Aktivität oder einem Schädelhirntrauma auftreten. Umgekehrt können Blockaden von Glutamat-Rezeptoren zu verzögerten und gestörten Verarbeitungsprozessen führen.

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Auswirkungen von organischen Antimonverbindungen auf das elektrophysiologische Verhalten von Glutamat- und GABA-Rezeptorkanäle zu untersuchen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob organische Antimonverbindungen Rezeptorkanäle in ihrer Funktion beeinträchtigen, die für erregende postsynaptische Übertragungen zuständig sind. Die für diese neurotoxischen Untersuchungen untersuchten liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanäle wurden dafür in Testzellen heterolog exprimiert. Als Grundlage diente hierbei das Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten.

2. Methodik und Materialien

2.1 Das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* stellen ein geeignetes Untersuchungsmodell dar, um Dosis-Wirkungsbeziehungen potentiell neurotoxischer Substanzen durchzuführen. Ausgehend von den Experimenten von Sumikawa et al., (1981) in denen die funktionelle Expression des nikotinischen Acetylcholinrezeptors aus dem elektrischen Organ des *Torpedo marmorata* (Marmelzitterrochen) gelang, gewannen die Oozyten eine rasche Akzeptanz als neurobiologisches Expressionsmodell.

Später konnten eine Vielzahl weiterer liganden- und spannungsgesteuerter Ionenkanäle in Oozyten exprimiert und an ihnen Reaktionen hervorgerufen werden, welche in nativen, unbehandelten Oozyten fehlen (Dascal, 1987; Sigel, 1990; Snutch, 1988; Yellen, 1984). Diese von den Oozyten exprimierten Ionenkanäle entsprechen denen des Ursprungsgewebes in ihren physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften und können mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden. Dies gelingt leichter und auch weitgehender als im Nervensystem, da Anzahl und Art der Ionenkanäle gesteuert werden können. Das Verfahren zur Expression neuronaler Ionenkanäle in Oozyten ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

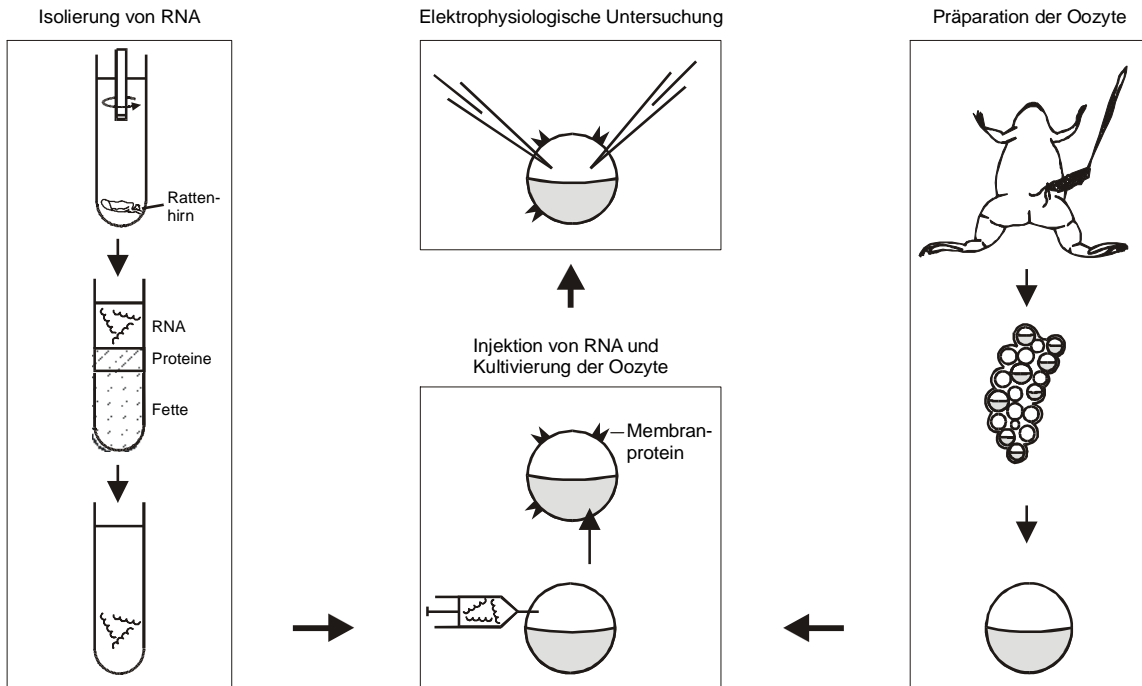


Abb.2.1 Schematisierte Darstellung zum methodischen Vorgehen zur Expression von Rezeptorkanälen in den Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (nach Madeja und Mußhoff, 1992).

2.2 Oozyten des *Xenopus laevis*

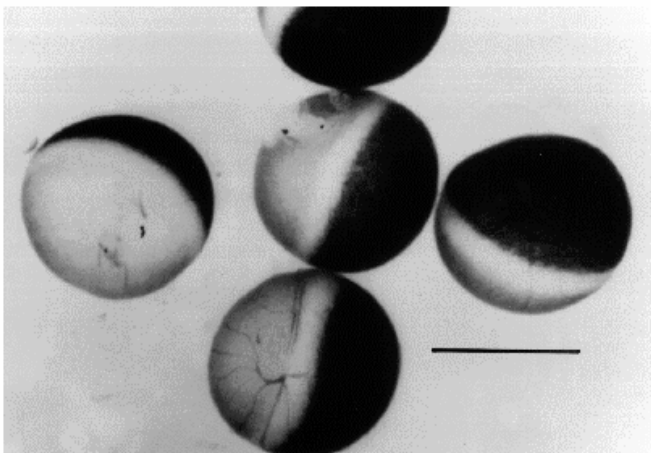


Abb.2.2 Isolierte Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* im Reifestadium VI (Dumont, 1972). Der Balken entspricht einer Länge von 1 mm (nach Madeja, 1992).

Die Oozyten lassen sich in Reifestadien I – VI (Dumont, 1972) unterteilen. Für die Versuche wurden Zellen im Stadium V und VI benutzt. In diesem Stadium wiesen die Zellen mit einer Größe von 1 – 1,3 mm eine dunkle, pigmentierte und eine helle, nicht-pigmentierte Hälfte auf (siehe Abb.2.2).

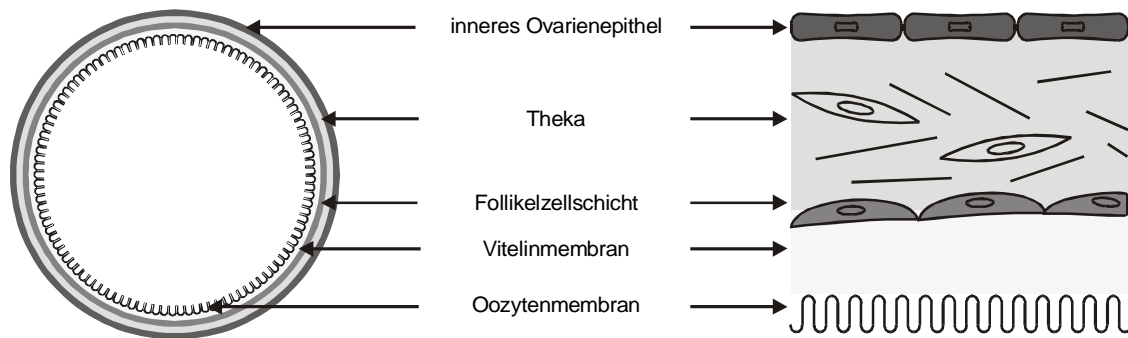


Abb.2.3 Schematisierte Darstellung einer Oozyte im Reifestadium VI mit deren Hüllschichten

Die Oozyten sind im Ovar von bindegewebigen Hüllschichten umgeben, die sich wie folgt zusammensetzen (siehe Abb.2.3): Die innere Schicht ist die Zellmembran, welche von der azellulären, fibrösen Vitellinschicht umgeben ist. Nun folgt die Follikelschicht, die der Oozyte viele Fortsätze durch die Vitellinschicht entgegenstreckt. Dies alles umgibt die Theka, eine bindegewebige, von Gefäßen, Nerven und glatten Muskelzellen durchsetzte Schicht. Als letzte Hülle umgibt das ovariale Plattenepithel die Oozyte.

2.3 Präparation der Oozyten von *Xenopus laevis*

Ein kleiner Teil der Ovarien wurde in einem chirurgischen Eingriff weiblichen Krallenfröschen entnommen, nachdem sie zuvor in einem Narkose-Tauchbad mit 3-Amino-

benzoesäureethylester (MS222) (5 $\mu\text{mol/l}$, Sandoz) und Methansulfonatsalz narkotisiert wurden. Das Narkotikum drang dabei über die Froschschleimhaut ein und entfaltete seine Wirkung nach etwa 15 Minuten. Die mit einem ca. 1 cm langen Schnitt eröffnete Körperhöhle wurde mit selbstauflösenden Nähten wieder verschlossen.

Aufgrund guter Regenerationsfähigkeit des Ovars der Frösche konnte dieser Eingriff bis zu vier- bis fünfmal an einem Tier in einem Abstand von ca. 2 Monaten durchgeführt werden. Es folgte die Isolierung der Oozyte aus dem Gewebeverband des Ovarteils mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten. Für einige Kontrollversuche wurde das Follikelepithel (siehe Kapitel 2.2) mit Hilfe von Pinzetten manuell entfernt.

2.4 RNA-Extraktion und Kultivierung der Oozyten von *Xenopus laevis*

Für die RNA-Extraktion wurde das Verfahren nach Cathala (1983) angewendet. Die Ratten mit einem Gewicht von 250 – 300 Gramm (etwa 10. Lebenswoche) wurden mit Halothan narkotisiert und das lumbale Rückenmark entnommen. Das frisch präparierte Gewebe mit einem Gesamtgewicht von einem Gramm wurde im Ultrathurax für 30 Sekunden homogenisiert. Hierfür wurden 11 ml Lysispuffer verwendet. Mit der siebenfachen Menge an Lithiumchloridlösung (77 ml) folgte innerhalb der nächsten 12 Stunden die selektive RNA-Fällung. Nach einer Pelletierung durch Zentrifugation bei 8000g erfolgte die Resuspension des u. a. mit denaturierten Proteinen verunreinigten Pellets in 20 ml des Lösungspuffers SDS-TA durch 45 minütiges Rühren. Es folgte eine weitere Reinigung durch eine Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion. Dies geschah durch Zugabe von je 20 ml Phenollösung und Chloroform-Isoamylalkohol und jeweils 10 minütigen Rühren. Für die Phasentrennung wurde 10 Minuten bei 8000g zentrifugiert. Nach Abpipettieren der wässrigen Oberphase erfolgte eine weitere Reinigung der

Oberphase durch erneute Zugabe von 20 ml Chloroform-Isoamylalkohol und erneutem 10 minütigen Rühren und Zentrifugieren mit 8000g. Anschließend erfolgte nach dem Zufügen von 2 ml Natriumacetatlösung und 44 ml Ethanol und einer 12 stündigen Lagerung die Fällung und Lufttrocknung des RNA-Pellets.

Nach der Lösung des Pellets in Aqua bidest. bis zu einer Konzentration von ca. 1 - 2 µg/µl und der Reinheitskontrolle (Kap 2.5) erfolgte schließlich die Portionierung in Eppendorfgefäße und Lagerung bei -70° C.

Für die RNA-Extraktion nach Cathala wurden die folgenden Lösungen verwendet:

Name	Zusammensetzung	Konz.(mol/l)
Lysispuffer	Guandininmonothio- cyanat EDTA Tris pH 7,4 β-Mercaptoethanol 8% (v/v)	5,00 0,10 0,50
Lithiumchloridlösung		4,00
Lösungspuffer	EDTA Tris (pH 7,4) SDS	0,01 0,10 0,1% (w/v)
Phenol	mit Tris gesättigt (pH 7,4)	
Chloroform-Isoamyl- Alkohollösung		25:1 (v/v)
Natriumacetatlösung		3,00
Ethanol		absolut

Für die Anreicherung von polyadenylierter RNA, der bei der späteren RNA-Injektion die eigentliche Aufgabe für die Kanalexpression zukommt, wurde bei einem Teil der RNA-Fractionen als vorletzter Arbeitsschritt eine oligo(dT)-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die polyadenylierte RNA hat an der eukaryontischen Gesamt-RNA nur einen Anteil von 1 - 5% (Maniatis et al., 1982).

Grundlage dieser Chromatographie ist eine vorübergehende Basenpaarung zwischen den poly (A)⁺-Resten der mRNA und den fixierten oligo(dT)-Resten der Trägermatrix in der Säule. Bei einer hohen Salzkonzentration bleibt die RNA-Fraktion bei der Passage der Säule mit ihren poly (A)⁺-Resten reversibel gebunden. Die übrige RNA hingegen wird mit der Spülflüssigkeit hindurchgeschwemmt und verworfen. Später kann die Basenpaarung durch Spülflüssigkeiten mit niedriger Salzkonzentration gelöst und so die reine mRNA gewonnen werden. Für die hier gezeigten Versuche wurde das *mRNA-Purifikation Kit* der Firma Pharmacia Biotech benutzt und nach dem vorgegebenen Standardverfahren eingesetzt.

Die mRNA-Fractionen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und bis zur Injektion bei -70 °C aufbewahrt. Zur Injektion wurden Mikrogaskapillaren mit einer Öffnung von acht bis zwölf Mikrometer benutzt, die mittels eines Elektronenziehgerätes hergestellt wurden. Es wurde pro Oozyte 50 nL RNA-Lösung durch Druck injiziert. Anschließend wurden die injizierten Oozyten paarweise in Glaspetrischalen gegeben, die mit einem Kulturmedium (Oozyten-Ringer-Lösung) gefüllt waren.

Die Kulturlösung zur Aufbewahrung der Oozyten setzte sich wie folgt zusammen:

**Zusammensetzung Konzentration
in mmol/l**

Na ⁺	90,00
K ⁺	1,00
Cl ⁻	92,00
Ca ⁺⁺	1,50
Mg ⁺⁺	0,80
HCO ₃ ⁻	2,40
SO ₃ ⁻⁻	0,80
HEPES	5,00

Als Zusätze wurden Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) hinzu gegeben. Die Lagerung erfolgte bei 20 °C in Dunkelheit. Somit konnte eine problemlose Kultivierung der Oozyten von ca. einer Woche erreicht werden; bei 4 °C war eine Kultivierung der Oozyten bis zu zwei Wochen möglich.

2.5 Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe eines photometrischen Verfahrens (Maniatis et al., 1982) konnte die Konzentration und Reinheit der gewonnenen poly(A)+RNA bestimmt werden. Hierzu wurde 1 µl der RNA-Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:300 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge ermittelt. Aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge konnte die Konzentration bestimmt werden, wobei gilt: 1 OD₂₆₀ = 40 µg RNA / ml.

Der Reinheitsgrad der RNA wurde aus dem Quotienten der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmt, welcher zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Ein stärker abweichender Quotient wies auf Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol hin. Die Lagerung bis zur Injektion erfolgte bei -70 °C in Portionen von 2,5 µg bzw. 5 µg RNA.

2.6 Elektrophysiologische Untersuchungstechnik

Als elektrophysiologische Untersuchungsmethode bot sich die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme („Voltage-Clamp“, Hodgkin et al., 1949, 1952; Binding, 1996; Madaja und Mußhoff, 1992; Mußhoff et al., 1995) an. Sie ermöglichte die Messung von transmembranösen Ionenströmen bei konstantem, vorgegebenem Membranpotential. Dies geschah durch einen „Klemmstrom“ der die durch die aktivierten Ionenkanäle fließenden transmembranösen Ionenströme mittels eines Verteilers ausglich. Für die Messungen wurden Filament-Borosilikatglasmikroelektroden mit einem Spitzendurchmesser von ca. 1 μM durch ein Elektrodenziehgerät hergestellt. Der Widerstand sollte bei Füllung der Elektrode mit 2 molarer KCl-Lösung zwischen 1 und 2 $\text{M}\Omega$ liegen.

Die Verdrahtung zu den Messgeräten erfolgte über Silber- /Silberchloriddrähte (siehe Abb.2.4). Frühestens 72 Stunden nach der RNA-Injektion wurde die Oozyte mittels Unterdruck an die Spitze einer Glaskapillare gesaugt und somit in der Messapparatur fixiert (siehe Abb.2.5).

Unter mikroskopischer Sicht wurden die Oozyten mit den Mikrokapillaren beidseitig penetriert, wobei eine der beiden Elektroden als Spannungselektrode (U-EL), die andere als Stromelektrode (I-EL) diente. Die Spannungselektrode registrierte das Membranpotential (MP) der Zelle gegen eine extrazellulär angebrachte Referenzelektrode (Ref), die ebenfalls mit zwei molarer KCl-Lösung gefüllt war. Nach Penetration der Zellen mit beiden Elektroden durch die Membran brauchten die Oozyten eine ca. 10 - 20 minütige Ruhepause um ein stabiles Membranpotential zu erreichen. Das Membranruhepotential lag dann meistens zwischen -22 mV und -40 mV.

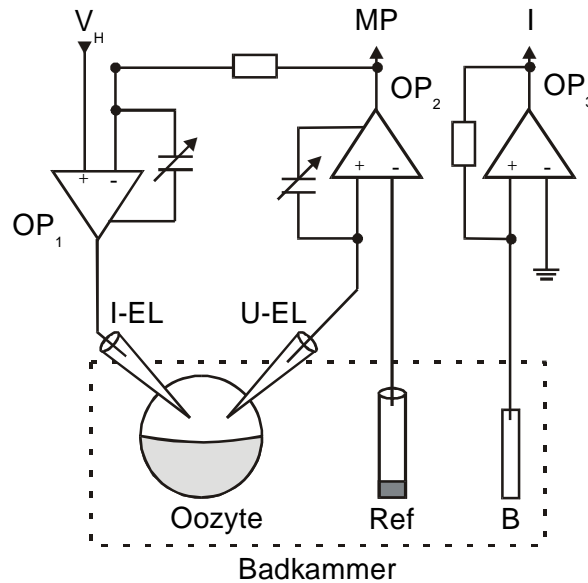


Abb.2.4 Blockschaltplan des elektrophysiologischen Versuchaufbaus zur Registrierung transmembranöser Ionenströme mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. I-EL = Stromelektrode; U-EL = Spannungselektrode; Ref. = extrazelluläre Referenzelektrode; B = virtuelle Baderde; OP₁ = Operationsverstärker zur Einstellung des Haltepotentials (V_H) über Injektion eines „Klemmstroms“ (I); OP₂ = Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials (MP); OP₃ = Operationsverstärker zur Strom-Spannungsumwandlung und zur Messung des „Klemmstromes“.

Das Membranpotential wurde über den Operationsverstärker OP₁ registriert und mittels permanent mitlaufenden Tintenschreiber und Speicheroszilloskop aufgezeichnet.

Der Rückkopplungsverstärker OP₂ diente zur Injektion des Klemmstroms, der das aktuelle Membranpotential an das gewählte Haltepotential (V_H) anpasste. Der Klemmstrom floss über eine virtuelle Baderde (B) ab, wurde dann durch eine Stromspannungswandlung in ein Spannungssignal umgewandelt und mit einem Operationsverstärker (OP₃) verstärkt. Auch der Klemmstrom wurde registriert und aufgezeichnet.

Die Versuche wurden bei -70mV durchgeführt. Bei niedrigem Membranwiderstand der Oozyte ($0,3 - 0,5 \text{ M}\Omega$) wurde gelegentlich auch bei -50 mV gemessen. Durch Verschieben des Haltepotentials um 10 mV und des daraus resultierenden Klemmstroms wurde der Widerstand mittels Ohmsches Gesetz ermittelt. Der Membranwiderstand der

Zellen lag dabei in der Regel zwischen 0,2 und 2 M Ω . Oozyten mit einem Membranwiderstand unter 0,3 M Ω wurden nicht für die Messung eingesetzt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

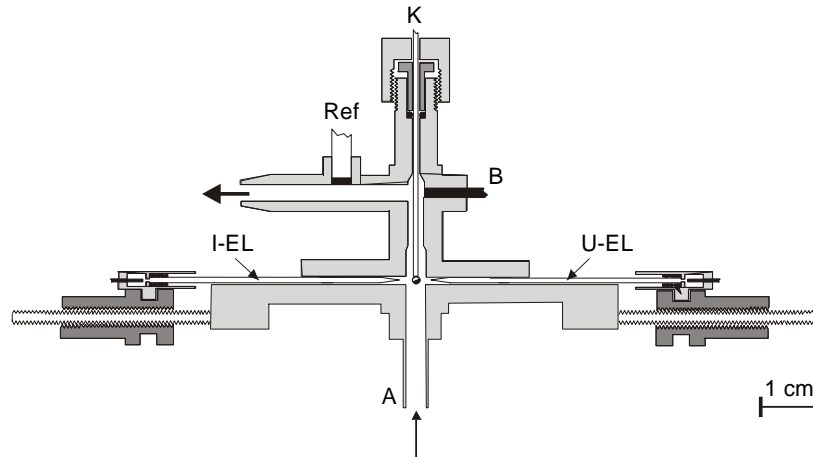


Abb.2.5 Schematische Darstellung der Konzentrationsklemme zur Substanzapplikation. A = Ansaugstutzen; I-EL = Stromelektrode; U-EL = Spannungselektrode; Ref. = extrazelluläre Referenzelektrode; B = virtuelle Baderde; K = Kapillare zur Fixierung der Oozyte; Pfeile geben die Flüssigkeitsströmung im System bei Substanzapplikation an (Madeja, 1991).

2.7 Substanzapplikation

Die Trimethylantimonchlorid-Lösung wurde mit einer sogenannten Konzentrationsklemme (Madeja et al., 1991) appliziert. Sie ermöglicht einen raschen Flüssigkeitsaustausch und ist daher ideal für die Untersuchung von Einflüssen extrazellulärer Substanzen auf Membranrezeptorkanälen geeignet (siehe Abb.2.5). Kreuzförmig angeordnete Plexiglasröhren bildeten an ihrem Kreuzungspunkt den Messraum, in dessen Mitte die Oozyte mittels einer in ihrer Höhe verstellbaren Glaskapillare angebracht war. Horizontal waren einerseits Stromelektrode und andererseits Spannungselektrode angebracht, die mit einer Klammer an Stellschrauben fixiert waren.

Somit war ein exaktes Penetrieren der Oozyte unter mikroskopischer Sicht gewährleistet. Die Messkammer wurde mit Oozyten-Ringer-Lösung (siehe oben) umspült.

Die Probenschälchen befanden sich auf einem Karusselltisch, der von einem kleinen Mikromotor angetrieben wurde. Mit Hilfe eines Computerprogramms konnte das Vorschieben der Schälchen und das Ansaugen der Flüssigkeiten gesteuert werden. Dadurch setzte der Flüssigkeitsaustausch im Messkreuz etwa 100 ms nach Ventilöffnung ein, während nach weiteren 10 ms bereits 90% der Lösung im System ausgetauscht waren (Madeja et al., 1991, 1995).

2.8 Versuchsprotokoll

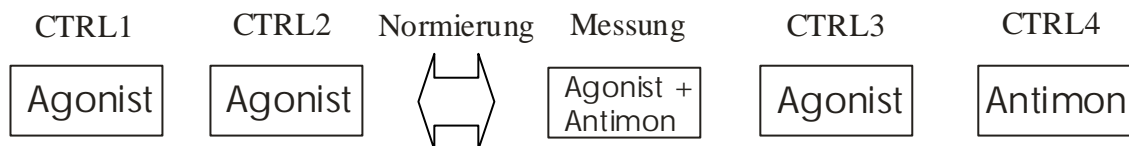


Abb.2.6 Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

Im Versuchsprotokoll wurden zunächst zwei Durchgänge mit der Transmittersubstanz allein durchgeführt. In Abhängigkeit von der Transmittersubstanz erfolgte zwischen allen Durchgängen eine Pause von 10 - 15 Minuten, um desensitivierende Einflüsse auf die Rezeptoraktivierung auszuschließen. Es folgte als dritter Durchgang die Messung mit der Antimonsubstanz in jeweils verschiedenen Konzentrationen zusammen mit der Transmittersubstanz. Nach der Substanzmessung erfolgte eine weitere Kontrollmessung mit Transmittersubstanz um die Reversibilität bzw. Irreversibilität des Effektes zu analysieren. Als fünfte und letzte Messung erfolgte die Messung mit der reinen Antimonverbindung, also ohne Beigabe von Transmittersubstanz, um mögliche Effekte der Antimonverbindung auf Membraneigenschaften der Oozyte zu bestimmen.

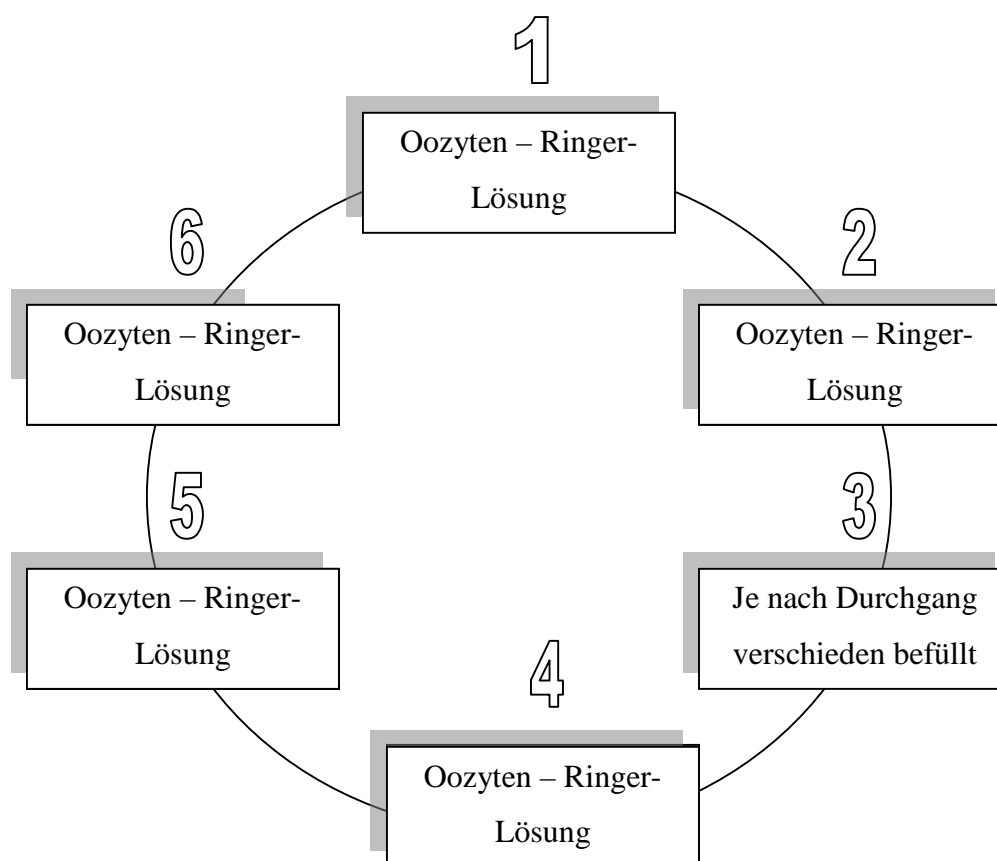


Abb.2.7 Schematische Darstellung des Applikationsschemas pro Durchgang

Für jeden Durchgang wurden sechs Probenschälchen auf den Karusselltisch so aufgestellt, dass die Oozyte zuerst mit Oozyten-Ringer-Lösung aus den ersten zwei Schälchen umspült wurde (siehe Abb.2.7). Das dritte Schälchen enthielt je nach Durchgang Transmittersubstanz, Antimonsubstanz mit Transmitter, oder nur Antimonsubstanz und umspülte für 60 Sekunden die Oozyte. Schließlich folgten wieder drei Schälchen mit Oozyten-Ringer-Lösung.

Bei der untersuchten Antimonsubstanz handelte es sich wie bereits oben genannt um Trimethylantimondichlorid. Sie wurde speziell für die Versuchsreihe im Institut für Umweltanalytik der Universität Essen – Duisburg hergestellt und musste, wie auch die

Transmittersubstanzlösungen, zwischen den Arbeiten gekühlt und abgedunkelt gelagert werden.

Die mögliche Toxizität der Antimonverbindung verlangte besondere Sorgfalt bei den Experimenten. Das Tragen einer Schutzbekleidung sowie Schutzhandschuhen war obligatorisch. Zudem wurden die Arbeiten unter einer Luftabzugsvorrichtung durchgeführt. Für die Versuchsreihe wurde Trimethylantimontrichlorid in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ untersucht. Die Transmittersubstanzen wurden je nach Effektgröße im ersten Kontrolldurchgang in Konzentrationen von 10, 25, 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

2.9 Auswertung und statistische Beurteilung

Die einzelnen Versuchdaten wurden mittels eines Speicheroszilloskopes auf einen Computer gespeichert und zur Auswertung ausgedruckt. Kurz vor Auswaschen der Substanz aus der Messapparatur mit Oozyten-Ringer-Lösung wurde die Stärke des benötigten Klemmstroms gemessen. Als Standardwert für den Transmittereffekt auf die Rezeptorkanäle wurde hierbei stets die zweite Kontrollmessung mit der Transmittersubstanz herangezogen. Die Stärke des Klemmstroms, die nun für die Konstanthaltung des Membranpotentials bei Zugabe der Antimonlösung nötig war, wurde mit dem Standardwert ins Verhältnis gesetzt. Die bei Applikation der reinen Antimonlösung ohne Transmittersubstanz registrierten Einflüsse auf die Rezeptorkanäle wurden gemittelt und mussten von der Rezeptorkanalantwort des dritten Durchgangs abgerechnet werden. Die Auswertung der gesamten Ergebnisse pro Substanz und Konzentration erfolgte mit dem Paired-t-test bzw. dem Wilcoxon Signed Rank Test. Werte mit $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 94 Oozyten, davon 50 defollikulierte Oozyten, untersucht. Sie stammten aus insgesamt 14 Fröschen. Die Messungen erfolgten vom 3. bis zum 14. Tag nach der Injektion von mRNA. Während dieser Zeit wiesen die durch die applizierten Liganden und Transmitter ausgelösten Ionenströme eine Größe von 2 bis 162 nA auf. Der Membranwiderstand der untersuchten Oozyten lag zwischen 0,3 und 2,5 M Ω . Für die Versuchsreihe wurden insgesamt 4 verschiedene mRNA-Fraktionen verwendet.

3.1 Charakterisierung der AMPA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme

Drei Tage nach der mRNA-Injektion in die Oozyten konnten durch Applikation des synthetischen Agonisten Kainat transmembranöse Ionenströme durch AMPA-Rezeptorkanäle induziert werden. Dabei wurden Konzentrationen von 10, 25, 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

Die Dauer der Applikation betrug dabei jeweils eine Minute. Sobald die Rezeptorkanäle durch Kainat aktiviert wurden, erfolgte ein Ioneneinwärtsstrom, der während der Applikation langsam zunahm. Dieser transmembranöse Ionenstrom wurde von Natriumionen getragen, die durch die AMPA-Rezeptorkanäle in die Oozyten gelangten (Watkins und Olverman, 1987). Zu einer sofortigen Verminderung bis zur Grundlinie kam es beim Auswaschen des Kainats durch die Ringerlösung. Die Abbildung 3.1 zeigt eine typische Originalregistrierung des beschriebenen Ionenstroms.

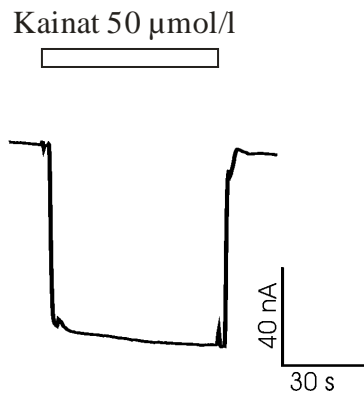


Abb.3.1 Originalregistrierung eines Ioneneinwärtsstrom nach Aktivierung mit 50 μmol/l Kainat. Das Haltepotential betrug dabei -70 mV. Der Balken über der Kurve zeigt die Dauer der Substanzapplikation an. Der Ionenstrom ist typisch für folliculierte und defolliculierte Oozyten nach mRNA-Injektion.

Da Kainat als Ligand sowohl an AMPA-Rezeptorkanäle als auch an Kainat-Rezeptorkanäle bindet, konnte der Ionenstrom auch durch Kainat-Rezeptorkanäle vermittelt sein. Bei Vorversuchen mittels Koapplikation von Kainat und dem spezifischen AMPA-Rezeptorkanalantagonisten CNQX (6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion; Hollmann und Heinemann, 1994) waren jedoch keine transmembranösen Ionenströme nachweisbar, die auf eine Expression von spezifischen Kainat-Rezeptorkanälen hätten schließen können. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die dargestellten Ionenströme ausschließlich über die Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle vermittelt werden.

3.1.1 Repetitive Aktivierung der AMPA-Rezeptorkanäle durch den synthetischen Agonisten Kainat

Um das Verhalten der AMPA-Rezeptorkanäle bei wiederholter Applikation zu testen, wurden zunächst Kontrollversuche mit repetitiven Applikationen durchgeführt. Hierbei wurden mittels Applikation von Kainat im Abstand von jeweils 10 Minuten die Rezeptorkanäle zehnmal nacheinander aktiviert.

Bei Anwendung dieses Versuchsprotokolls war die Amplitude und Kinetik der Ionenströme weitgehend reproduzierbar. In Abbildung 3.2 ist eine Originalregistrierung eines solchen Kontrollversuchs dargestellt. Diese seriellen Aktivierungen wurden an insgesamt 15 Zellen durchgeführt. Dabei wurde Kainat in Konzentrationen von jeweils 50 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Zur Auswertung wurde die Amplitude der zweiten Aktivierung einer solchen Serie gleich 100 Prozent gesetzt und die Amplituden der darauf folgenden Aktivierungen darauf bezogen. Die Messwerte der jeweils ersten Applikationen wurden verworfen, da sie im Vergleich zu den folgenden Applikationen eine höhere Amplitude aufwiesen.

Die relativen Amplituden der folgenden Messungen wurden gemittelt und es wurde der Standardfehler (SEM = Standard Error of the Mean) berechnet. Auf diese Weise wurde mit allen folgenden Applikationsserien verfahren. Die Mittelwerte schwanken, wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich, nur um einen engen Bereich um 100 Prozent, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich durch Kainat induzierte Ionenströme auch nach wiederholtem Aktivieren der AMPA-Rezeptorkanäle nicht ändern.

Kainat 50 $\mu\text{mol/l}$

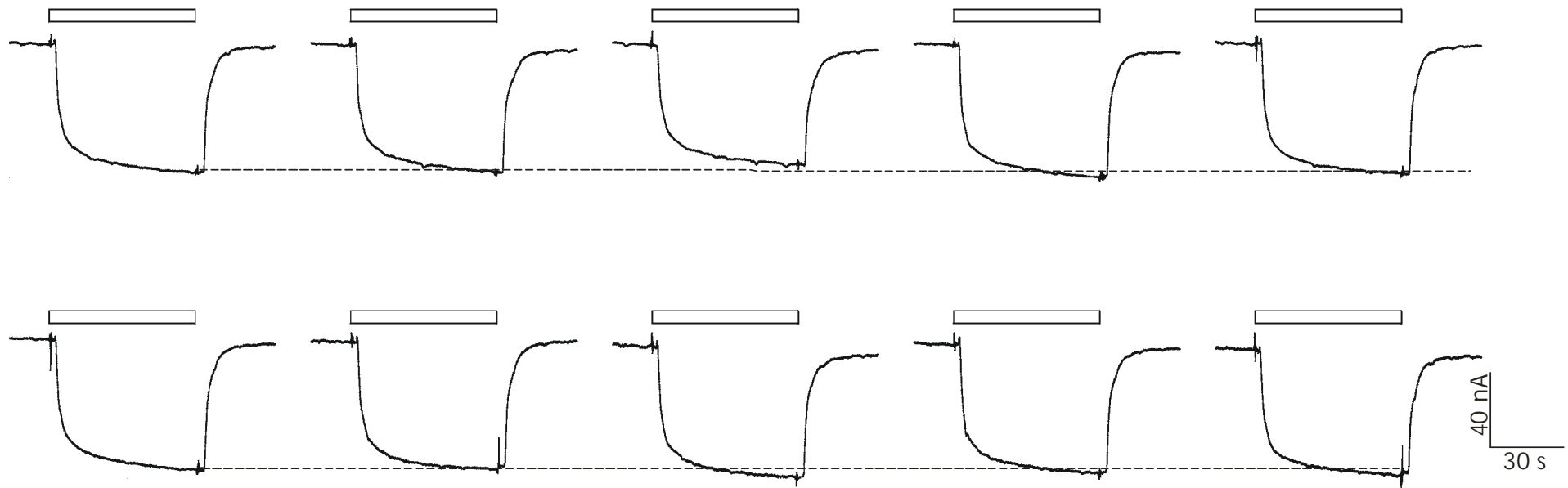


Abb.3.2 Originalregistrierung eines Kontrollversuchs mit Kainat als Ligand. Die Applikation erfolgte an einer mit mRNA injizierten Xenopus-Oozyte im Abstand von 10 Minuten. Die Applikationsdauer betrug jeweils eine Minute. Der maximale Ausschlag der ersten Amplitude wurde auf 100% gesetzt und ist mit einer waagerechten gestrichelten Linie markiert. Das Haltepotential betrug dabei immer -70mV. Die weißen Balken über den Kurven geben die Dauer der Applikation an. Der Ausschlag nach unten bedeutete einen Ioneneinwärtsstrom. In der Regel wurden bis zu zehn Aktivierungen durchgeführt (siehe Tabelle 3.1).

Applikation Nummer	Anzahl der Zellen	Mittelwerte (%)	SEM (\pm)
2	15	100	3
3	15	99	3
4	10	100	4
5	9	97	5
6	9	104	4
7	7	98	4

Tab.3.1 Statistische Auswertung der repetitiven Aktivierungen mit Kainat. Es wurden die relativen Amplituden von allen 3. bis 7. Aktivierungen mit Normierung auf die 2. Aktivierung gemittelt und die zugehörigen Standardfehler berechnet. SEM = Standard Error of the Mean, Standardfehler

3.2 Charakterisierung der NMDA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme

Der Agonist NMDA bewirkte durch seine Applikation einen transmembranösen Ionenstrom, wie er in Abb.3.3 dargestellt ist. Die Versuchsreihe mit NMDA begann fünf bis sechs Tage nach mRNA-Injektion, da erst nach dieser Zeitspanne deutlich größere NMDA-Ionenströme registriert werden konnten. Die Konzentration des Agonisten NMDA betrug bei den Versuchen 10, 25, 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$.

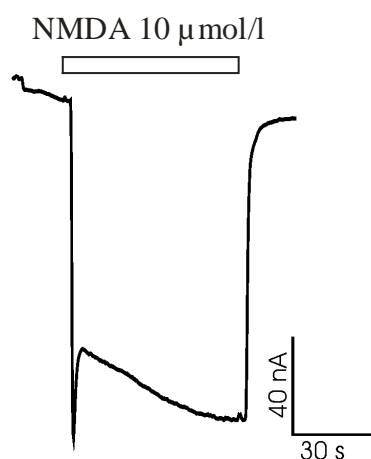


Abb.3.3 Originalregistrierung eines Ioneneinwärtsstrom nach Aktivierung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ NMDA. Das Haltepotential betrug dabei -70 mV. Der Balken über der Kurve zeigt die Dauer der Substanzapplikation an. Der Ionenstrom ist typisch für follikulierte und defollikulierte Oozyten nach mRNA-Injektion.

Erkennbar ist ein Ioneneinwärtsstrom, der unmittelbar bei Applikation des Transmitters eine maximale Spitze in der Amplitude verursachte und sich dann wieder der Grundlinie näherte um schließlich nach etwa zwanzig Sekunden wieder zuzunehmen.

Nach der Applikationszeit von einer Minute und Auswaschen des Transmitters mit Ringlösung sank der Einwärtsstrom auf das Ausgangsniveau bis zur Grundlinie. Der NMDA-Rezeptorkanal ist für den Einstrom von Natrium- und Kalziumionen in die Zelle verantwortlich. Die initiale Spitze wird ausströmenden Chloridionen zugeschrieben, verursacht durch Kalziumionen, die nach Einstrom in die Zelle einen endogenen kalziumabhängigen Chloridionenkanal aktivieren. Sie ist allerdings nicht immer, wie in der Beispielkurve gezeigt, ausgebildet, wie auch die Kontrollversuche in Abb.3.4 zeigen.

Der Chloridionen-Ausstrom überschreitet bald sein Maximum und es überwiegt nun der Natriumionen-Einstrom, der den typischen Verlauf der Kurve kennzeichnet (vergl. Mayer und Westbrook, 1984).

3.2.1 Repetitive Aktivierung der NMDA-Rezeptorkanäle durch den Agonisten NMDA

Die Kontrollversuche für die Testung des Verhaltens der NMDA-Rezeptorkanäle bei wiederholter Applikation sind ähnlich derjenigen der AMPA-Ionenkanäle. Es wurde an Oozyten in einem fünfzehnminütigen Abstand zehnmal NMDA in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ appliziert (siehe Abb.3.4).

Die Versuchsreihe wurde an insgesamt 18 Oozyten mit jeweils sieben nacheinander ausgelösten Applikationen wiederholt. Zur Auswertung wurden die Messwerte der jeweils ersten Applikationen verworfen, da sich herausstellte, dass die zweite Aktivierung und die folgenden Aktivierungen mit NMDA um etwa 20 bis 25 Prozent in der Amplitude geringer ausfiel.

Stattdessen wurde die Amplitude der zweiten Applikation auf 100 Prozent gesetzt und die Amplituden der darauf folgenden Applikationen gemittelt. Schließlich wurde der Standardfehler berechnet (siehe Tabelle 3.2). Erkennbar ist die minimale Schwankung um 100 Prozent und der geringe Standardfehler. Der komplette Ablauf einer Versuchsreihe ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Auch bei der mehrmaligen Applikation von NMDA kann also davon ausgegangen werden, dass sich die Antwort nicht signifikant ändert.

Applikation Nummer	Anzahl der Zellen	Mittelwerte (%)	SEM (±)
2	18	100	0
3	18	98	4
4	12	106	9
5	11	106	10
6	8	96	8
7	8	98	7
8	7	105	6

Tab.3.2 Statistische Auswertung der repetitiven Aktivierungen mit NMDA. Es wurden die relativen Amplituden von allen 3. bis 8. Aktivierungen mit Normierung auf die 2. Aktivierung gemittelt und die zugehörigen Standardfehler berechnet. SEM = Standard Error of the Mean, Standardfehler.

NMDA 100 $\mu\text{mol/l}$

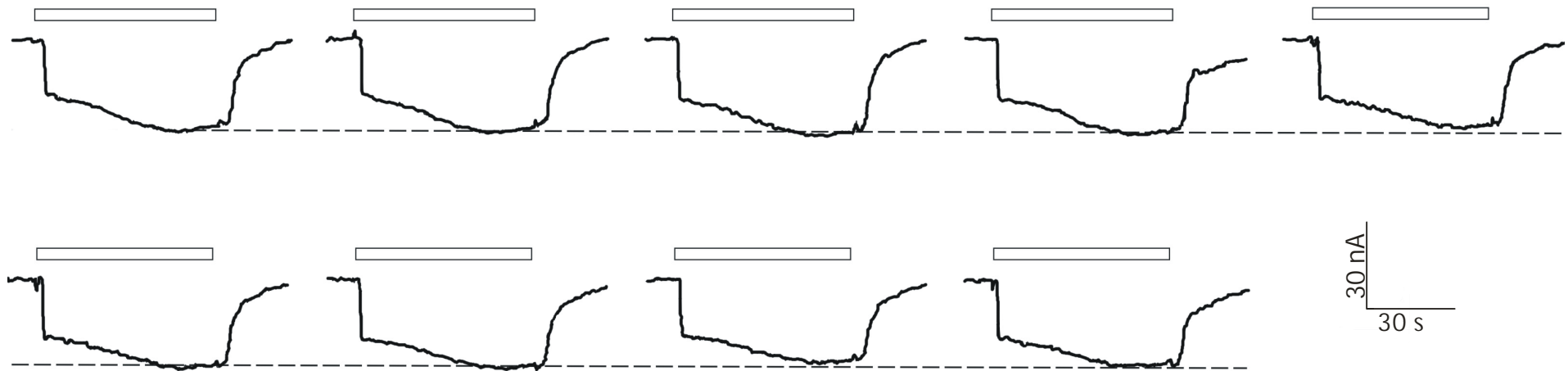


Abb.3.4 Originalregistrierung eines Kontrollversuchs mit NMDA als Transmitter. Die Applikation erfolgte an einer mit mRNA injizierten Xenopus-Oozyte im Abstand von 15 Minuten. Die Applikationsdauer betrug jeweils eine Minute. Der maximale Ausschlag der zweiten Amplitude wurde auf 100% gesetzt und ist mit einer waagerechten gestrichelten Linie markiert. Die erste Aktivierung wurde verworfen. Das Haltepotential betrug dabei immer -70mV. Die weißen Balken über den Kurven geben die Dauer der Applikation an. Der Ausschlag nach unten bedeutete einen Ioneneinwärtsstrom.

3.3 Charakterisierung der GABA-Rezeptorkanal-induzierten Ionenströme

Die Versuche mit dem Transmitter GABA wurden ab dem dritten Tag nach der mRNA Injektion unternommen. In dieser Zeitspanne konnten genug GABA_A-Rezeptorkanäle von der Oozyte gebildet werden, um einen deutlich messbaren transmembranösen Ionenstrom bei Applikation von GABA nachzuweisen.

Die Konzentration des Transmitters betrug zwischen 25 und 100 $\mu\text{mol/l}$ bei einer Applikationsdauer von einer Minute. In Abbildung 3.5 ist der typische Verlauf einer Messkurve bei Applikation von GABA dargestellt. Erkennbar ist der unmittelbare hohe Ionenstrom, der durch die Erhöhung der Permeabilität der Ionenkanäle für Chloridionen bedingt ist. Es folgt eine stetige Reduktion des Ionenstroms, so dass nach einer Minute etwa die Hälfte des ursprünglichen Niveaus erreicht ist. Nach dem Auswaschen des Transmitters durch Ringerlösung verminderte sich der Ausschlag wieder auf die Grundlinie.

Auch die Versuchsreihe mit GABA zeigte, dass manche Oozyten eine nur geringe Ausprägung der typischen Merkmale aufwiesen.

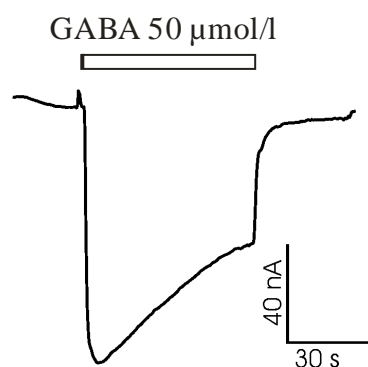


Abb.3.5 Originalregistrierung eines Ioneneinwärtsstroms nach Aktivierung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ GABA. Das Haltepotential betrug dabei -70 mV. Der Balken über der Kurve zeigt die Dauer der Substanzapplikation an. Der Ionenstrom ist typisch für follikulierte und defollikulierte Oozyten nach mRNA-Injektion.

3.3.1 Repetitive Aktivierung der GABA_A-Rezeptorkanäle durch GABA

Auch bezüglich der repetitiven Aktivierung der GABA_A-Rezeptorkanäle wurden im Vorfeld Kontrollversuche durchgeführt. Hierbei wurde in einem Abstand von zehn Minuten bis zu neunmal der Transmitter GABA zur Aktivierung appliziert. Die Abbildung 3.6 zeigt eine Originalregistrierung eines Versuchsdurchgangs und die Reproduzierbarkeit der Amplitude und Kinetik der durch GABA induzierten Ionenströme.

Der Transmitter GABA wurde in einer Konzentration von 100 µmol/l verwendet und das Versuchsprotokoll an insgesamt 23 Oozyten wiederholt. Bei diesen Kontrollversuchen wurde die Amplitude der zweiten Messung auf 100 Prozent gesetzt, da sie, ähnlich wie bei den NMDA-Versuchen dargestellt, eine höhere Konstanz aufwies als die Amplitude der ersten Messung.

Die nachfolgenden Amplituden der durch GABA induzierten Ionenströme wurden darauf bezogen. Für die Berechnung des Standardfehlers wurden die relativen Amplituden der zweiten Aktivierungen der GABA-Applikationsserien gemittelt.

Ein Überblick über die Repetition der GABA-Applikationen ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Sie zeigt, dass die Mittelwerte aller repetitiven Aktivierungen bezogen auf den zweiten durch GABA induzierten Ionenstrom um den Wert 98% schwanken. Somit kann auch bei den durch GABA induzierten Ionenströmen davon ausgegangen werden, dass auch nach wiederholter Aktivierung keine maßgebliche Veränderung und signifikanter Unterschied vorliegt.

GABA 100 $\mu\text{mol/l}$

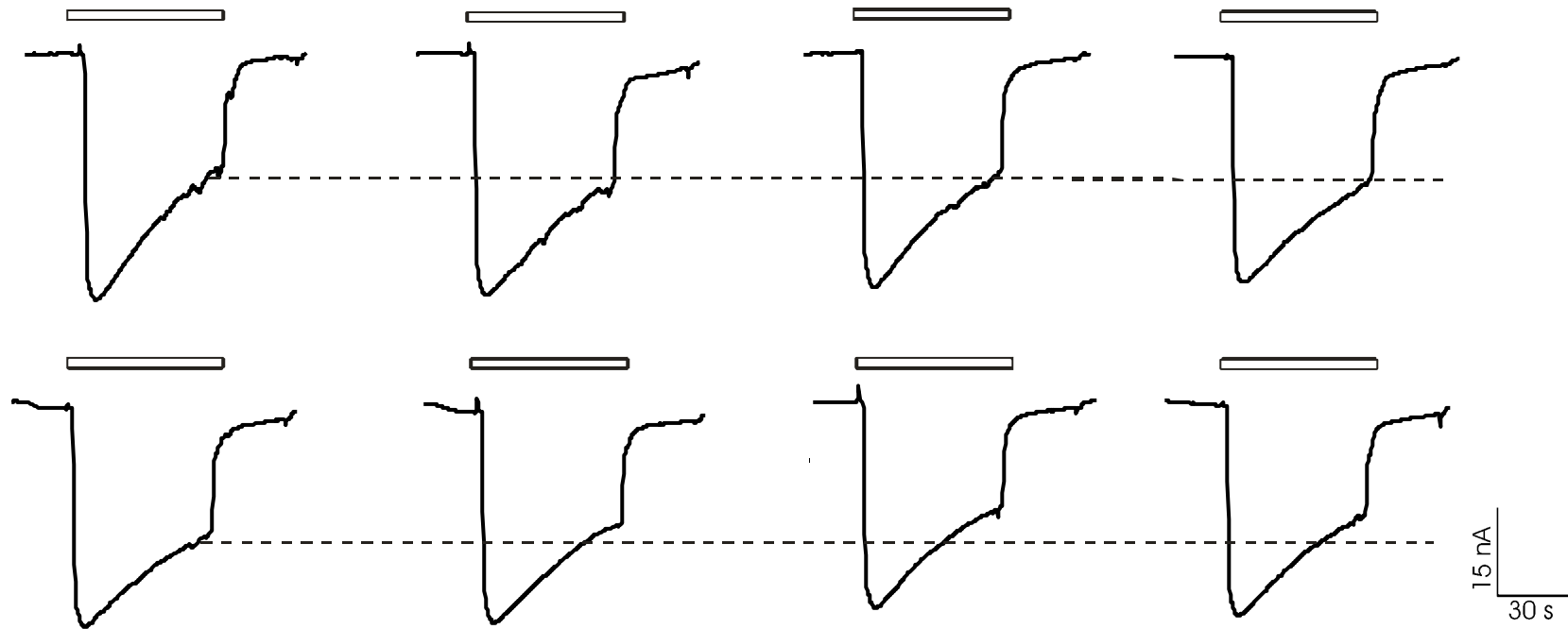


Abb.3.6 Originalregistrierung eines Kontrollversuchs mit GABA als Transmitter. Die Applikation erfolgte an einer mit mRNA injizierten Xenopus-Oozyte im Abstand von 10 Minuten. Die Applikationsdauer betrug jeweils eine Minute. Der maximale Ausschlag der zweiten Amplitude wurde auf 100% gesetzt und ist mit einer waagerechten gestrichelten Linie markiert. Die erste Aktivierung wurde verworfen. Das Haltepotential betrug dabei immer -70mV. Die weißen Balken über den Kurven geben die Dauer der Applikation an. Der Ausschlag nach unten bedeutet einen Ioneneinwärtsstrom.

Applikation Nummer	Anzahl der Zellen	Mittelwerte (%)	SEM (\pm)
2	8	100	0
3	8	104	3
4	8	98	5
5	8	95	7
6	6	96	7

Tab.3.3 Statistische Auswertung der repetitiven Aktivierungen mit GABA. Es wurden die relativen Amplituden von allen 2. bis 6. Aktivierungen mit Normierung auf die 2. Aktivierung gemittelt und die zugehörigen Standardfehler berechnet. SEM = Standard Error of the Mean, Standardfehler.

3.4 Wirkungen von Trimethylantimondichlorid auf die bioelektrischen Membraneigenschaften von *Xenopus laevis* – Oozyten

Zur Analyse der Wirkungen von Trimethylantimondichlorid auf die bioelektrischen Membraneigenschaften der mRNA-injizierten Oozyten wurde die Substanz im Anschluss an die Koapplikation mit einem Neurotransmitter allein appliziert. Die Verbindung wurde dabei für jeweils 60 Sekunden in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ sowohl an folliculierten als auch an defolliculierten Oozyten appliziert.

Bei diesen Versuchsansätzen traten nur geringe Änderungen des Grundlinienniveaus (=Haltstrom) auf. Die Änderungen des Haltstroms sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 zusammengefasst dargestellt. Es wurden ausschließlich Einwärtsströme in die Zelle registriert. Die Messergebnisse, die zur Analyse der Wirkung von Trimethylantimondichlorid auf NMDA-, GABA_A- und AMPA-Rezeptorkanäle dienen, wurden schließlich um diese gemittelten „reinen“ Substanzeffekte kompensiert.

defollikulierte Oozyten	0,1 µmol/l	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
Mittelwert	1,1 nA	2 nA	1,3 nA	2,9 nA
max. Amplitude Einwärtsstrom	3,6 nA	9,1 nA	5,2 nA	9,1 nA
Zellen ohne Effekt	5	7	4	5
Anzahl der Zellen insgesamt	9	9	6	17

Tab.3.4 Übersicht der Messergebnisse bei reiner Antimonapplikation mit defollikulierten Oozyten.

follikulierte Oozyten	0,1 µmol/l	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
max. Amplitude Einwärtsstrom	n.g	0 nA	5,7 nA	1,4 nA
Zellen ohne Effekt	n.g	3	1	0
Anzahl der Zellen insgesamt	n.g	3	2	1

Tab.3.5 Übersicht der Messergebnisse bei reiner Antimonapplikation mit follikulierten Oozyten. Der Mittelwert wurde aufgrund der geringen Anzahl an Versuchen nicht bestimmt. Für die Antimonkonzentration 0,1 µmol/l liegen keine Messergebnisse vor. n.g = nicht getestet.

3.4.1 Wirkung von Trimethylantimondichlorid auf AMPA-Rezeptorkanäle

In den Messreihen zur Untersuchung der Effekte auf AMPA-Rezeptorkanäle wurde folgendes, wie schon in Kapitel 2.8 beschriebenes Messprotokoll verwendet:

1. Kontrollversuch mit Kainat
2. Kontrollversuch mit Kainat
3. Kainat + Antimon
4. Kontrolle mit Kainat
5. Kontrolle mit Antimon

Zwischen den jeweiligen Messungen wurde eine Pause von 10 Minuten eingehalten. Die folgenden Abbildungen (Abb.3.7 und 3.8) zeigen Originalregistrierungen in den verschiedenen Konzentrationen mit follikulierten und defollikulierten Oozyten. Die Konzentration von Kainat betrug 10, 15, 25, 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$, bei 21 von 41 Versuchsreihen betrug die Konzentration 25 $\mu\text{mol/l}$.

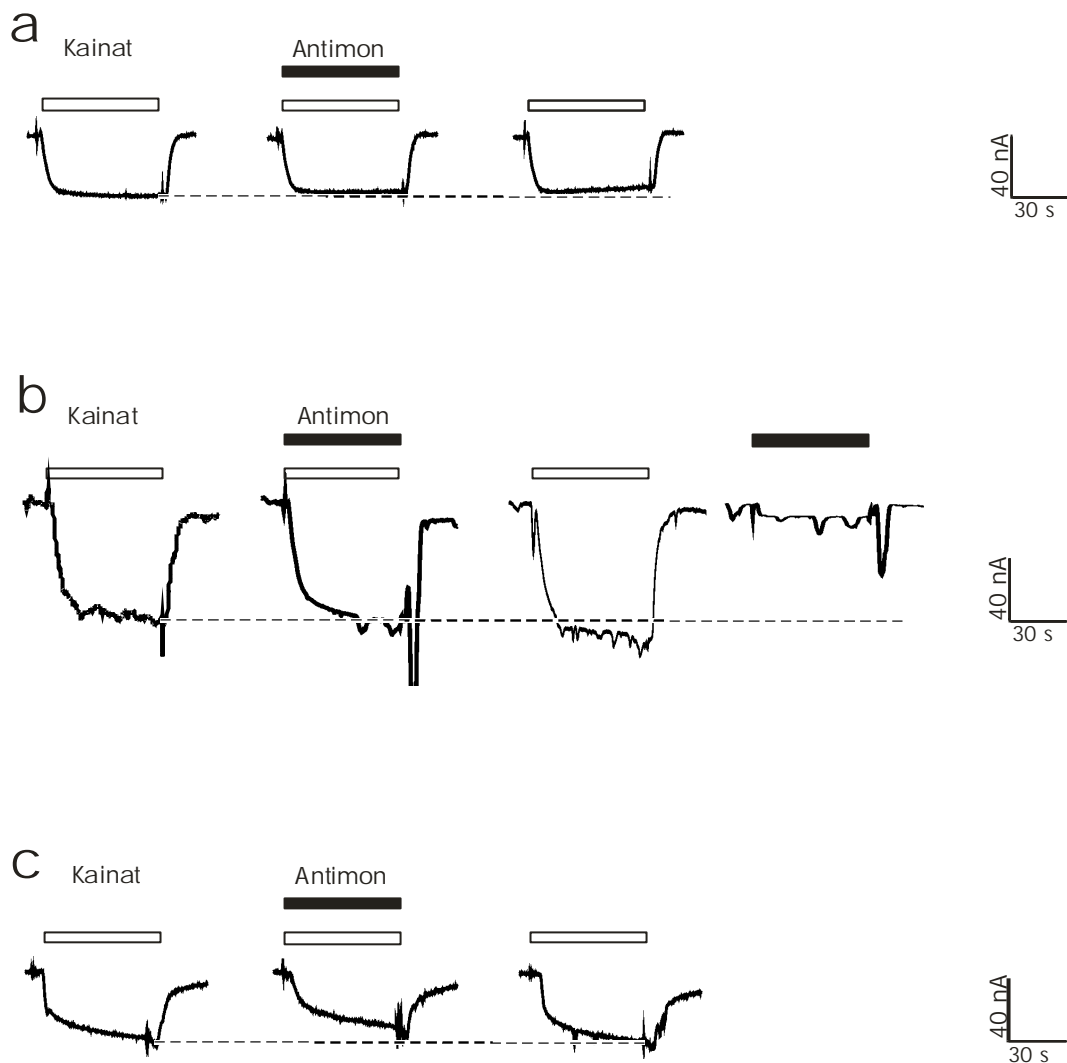


Abb.3.7 Messreihen an mRNA-injizierten follikulierten *Xenopus*-Oozyten mit 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon. Die waagerechte gestrichelte Linie markiert den Bezugswert von 100% aus dem 2. Kontrollversuch. Die Balken über den Kurven zeigen die Dauer der Applikation. Die Kontrollen mit alleiniger Applikation von 1 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon wurden nicht durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 ersichtlich.

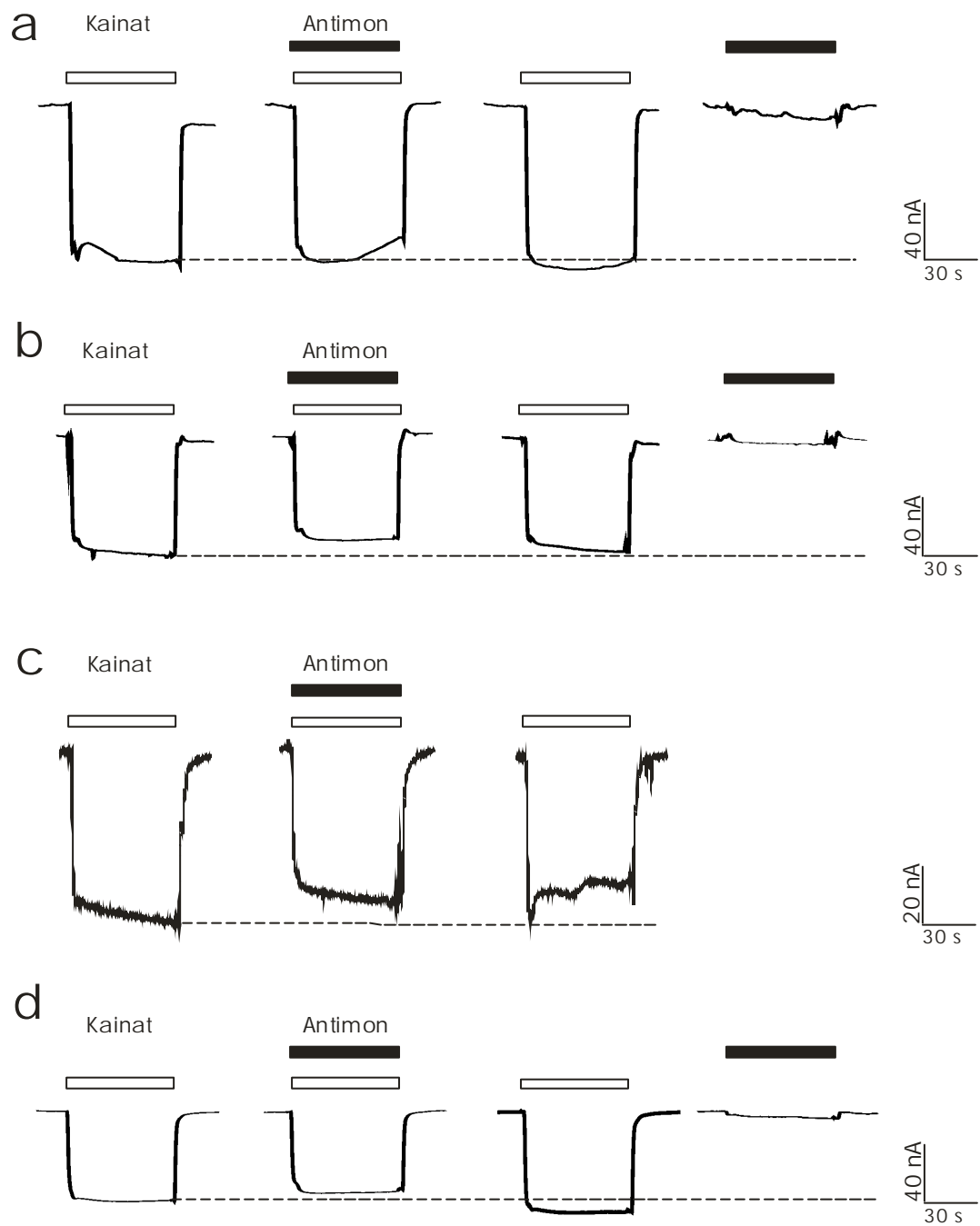


Abb.3.8 Messreihen an mRNA-injizierten defollikulierten *Xenopus*-Oozyten mit 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon. Die waagerechte gestrichelte Linie markiert den Bezugswert von 100% aus dem 2. Kontrollversuch. Die Balken über den Kurven zeigen die Dauer der Applikation. Die Kontrolle mit alleiniger Applikation von 10 $\mu\text{mol/l}$ Antimon wurde nicht durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 ersichtlich.

folikulierte Oozyten	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
1	87%	84%	73%
2	97%	104%	87%
3	88%	99%	89%
4	95%	95%	77%
5	113%	91%	95%
6			97%
MW	96%	95%	86%
SEM	4,7%	3,3%	3,8%
p	0,632	0,718	0,049

Tab.3.6 Relative Effekte von Antimon auf AMPA-Rezeptorkanäle von follikulierten Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist.

defolikulierte Oozyten	0,1 µmol/l	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
1	88%	91%	80%	93%
2	89%	84%	80%	95%
3	93%	105%	64%	101%
4	89%	102%	98%	80%
5		96%	75%	100%
6			94%	76%
7				78%
MW	90%	96%	82%	89%
SEM	1,0%	3,7%	5,0%	3,8%
p	0,01	0,345	0,05	0,022

Tab.3.7 Relative Effekte von Antimon auf AMPA-Rezeptorkanäle von defolikulierten Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist.

fol. + defoll. Oozyten	1 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	100 $\mu\text{mol/l}$
MW	96%	89%	88%
SEM	2,8%	3,5%	2,6%
p	0,29	0,052	0,001
n	10	11	13

Tab.3.8 Zusammenfassung der relativen Effekte von Antimon auf AMPA-Rezeptorkanäle mit folliculierten und defolliculierten Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist. n = Anzahl der Oozyten.

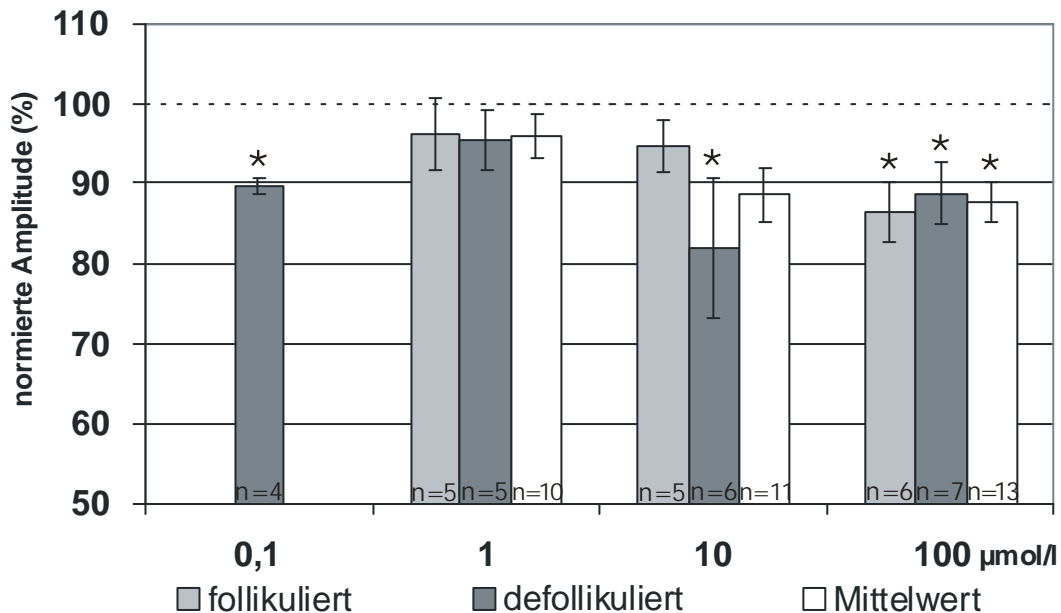


Abb.3.9 Vergleich der Effekte an AMPA-Rezeptoren zwischen folliculierten und defolliculierten Oozyten. Signifikante Messergebnisse sind mit einem Sternchen markiert. Die senkrechten Striche zeigen den Standardfehler (SEM). Die Anzahl der Versuche ist in den Säulen ablesbar. Die Versuchsreihe mit einer Antimonkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ wurde nur an defolliculierten Oozyten bestimmt.

Die eingesetzte Transmitterkonzentration richtete sich nach Erfahrungswerten vorhergehender Versuchsreihen, die zu gut auswertbaren Stromamplituden führten. Die Amplituden bei Koapplikation mit Transmitter und Antimon zeigten dabei mitunter überraschend hohe Schwankungen, manchmal war auch gar kein Effekt messbar. Der größte Effekt wurde mit einer defollikulierten Oozyte bei einer Antimonkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ beobachtet. Die relative Amplitude sank dabei auf 64,3% des Ausgangswertes.

Eine Vergrößerung der Amplitude in Bezug auf den Ausgangswert wurde seltener beobachtet, die größte Amplitude war bei einem Versuch 113,1% mit einer Antimonkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ und 25 $\mu\text{mol/l}$ Kainat. Insgesamt wurden Vergrößerungen der Amplituden bei 6 von 38 Versuchen beobachtet. Meistens bewegten sich die Amplituden um 85 bis 95 Prozent des Ausgangswertes und wiesen nur geringe Schwankungen auf (siehe Tab.3.6 und Tab 3.7).

Der Mittelwert sinkt mit steigender Antimonkonzentration, eine Signifikanz zeigt sich bei 100 $\mu\text{mol/l}$ (siehe Tab.3.8). Die Ergebnisse der Messreihen sind in Abbildung 3.9 ersichtlich.

3.4.2 Wirkung von Trimethylantimondichlorid auf NMDA-Rezeptorkanäle

In diesen Messreihen wurde das gleiche Messprotokoll wie zur Untersuchung der AMPA-Rezeptorkanäle verwendet, jedoch wurde zwischen den einzelnen Messungen eine Pause von mindestens 15 Minuten eingehalten, um Effekte einer Rezeptordesensitivierung ausschließen zu können. Der synthetische Agonist NMDA wurde in den Konzentrationen 10, 25, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt, wobei auch hier 25 $\mu\text{mol/l}$ die meistverwendete Konzentration (17 von 46) war.

Die Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen Originalregistrierungen als Beispiel für die durchgeführten Messungen. Die Amplituden wiesen teilweise hohe Schwankungen auf, insbesondere bei defollikulierten Oozyten, wie der teilweise hohe Fehlerindikator zeigt. So wies die geringste Amplitude einen Wert von 31,4% auf, die größte jedoch lag bei 183,5%. In sechs Messreihen überstiegen die Amplituden den Bezugswert von 100%. Unterschiede gab es bezüglich der Größenordnung in dem sich die Effekte bewegten. So sanken die Stromamplituden bei Applikation der verschiedenen Antimonkonzentrationen bei follikulierten Zellen meistens nicht unter 90%. Bei der Antimonapplikation an defollikulierten Oozyten sank die Amplitude bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ auf 88,5%, mit den Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ weiter auf 67% und stieg dann wieder bei 100 $\mu\text{mol/l}$ auf 77%. Die Tabellen 3.9, 3.10 und 3.11 zeigen die weiteren Ergebnisse.

Fasst man die Versuchsreihen an follikulierten und defollikulierten Oozyten zusammen, so ergibt sich aber ein recht stabiles Niveau der Amplituden bei circa 85% des Bezugswertes. Das Diagramm in Abb.3.12 zeigt einen Überblick über die Messergebnisse. Es zeigten sich signifikant verringerte Stromamplituden bei Versuchen mit defollikulierten Oozyten bei Antimonkonzentrationen von 0,1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$. Des Weiteren zeigt sich eine Signifikanz bei den Mittelwerten mit 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon (Tab 3.11).

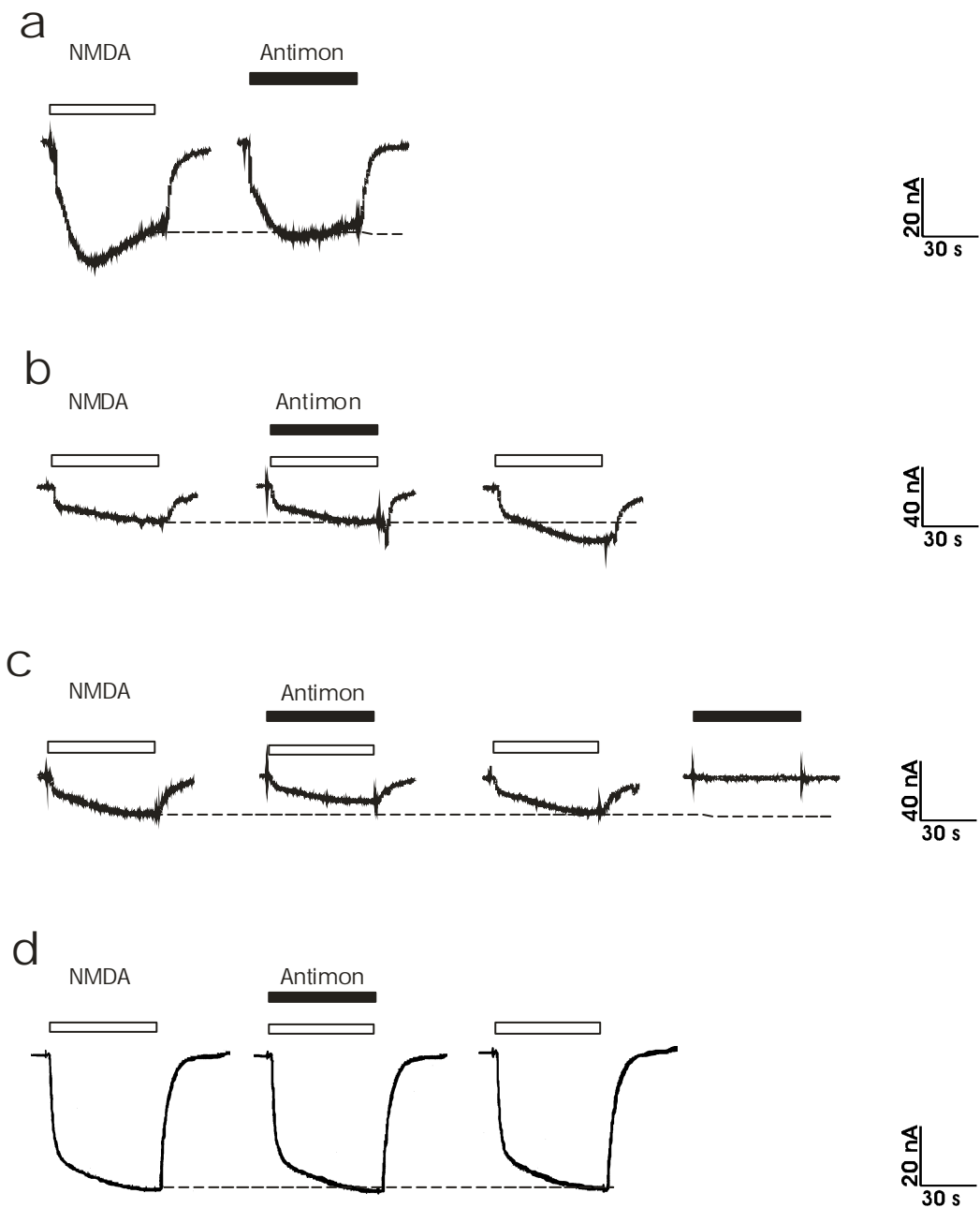


Abb.3.10 Messreihen an mRNA-injizierten folliculierten Xenopus-Oozyten mit 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon. Die waagerechte gestrichelte Linie markiert den Bezugswert von 100% aus dem 2. Kontrollversuch. Die Balken über den Kurven zeigen die Dauer der Applikation. Die Kontrolle mit alleiniger Applikation von Antimon wurde nur mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Die Kontrolle mit alleiniger Applikation von NMDA wurde in der Konzentration nicht durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 ersichtlich.

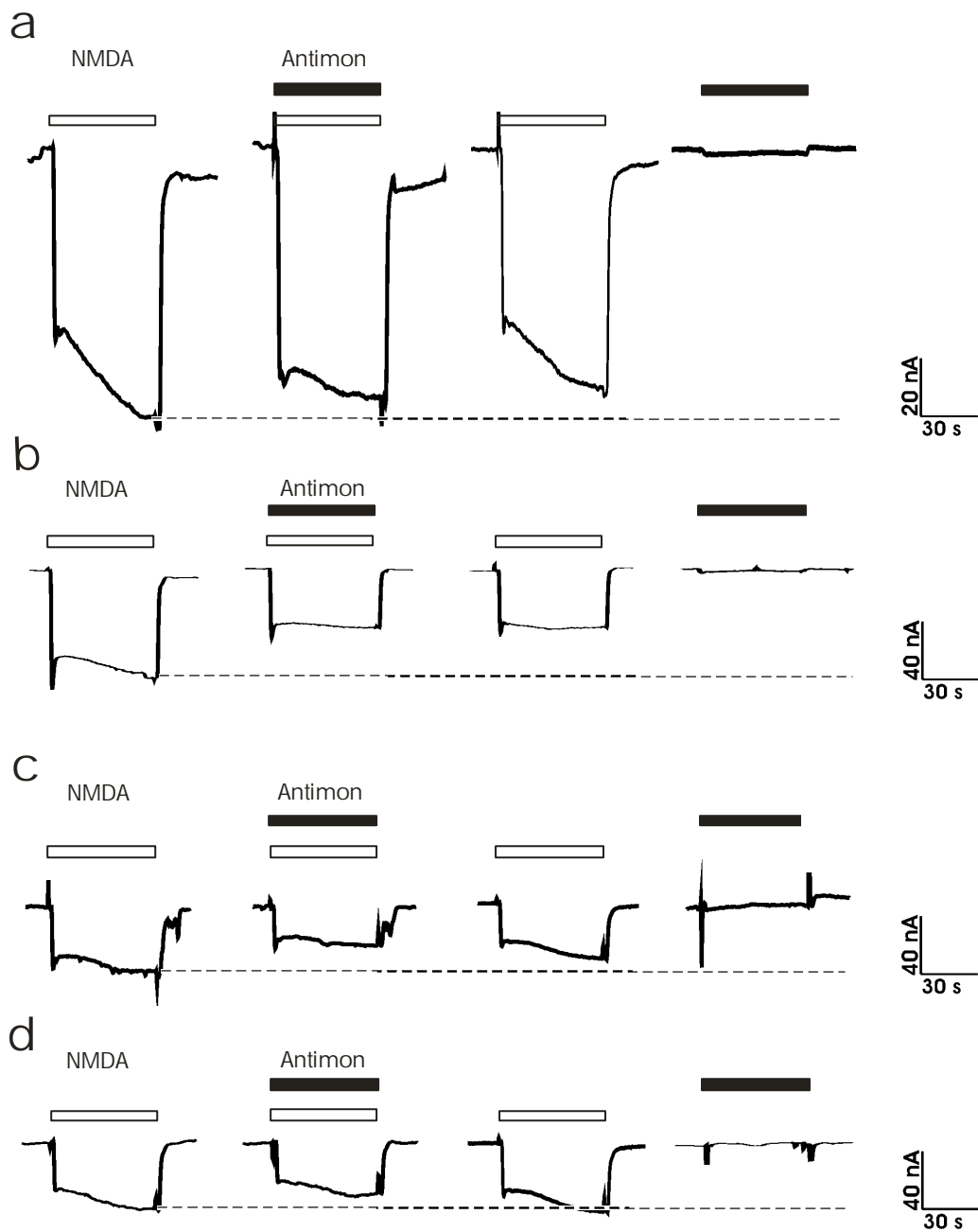


Abb.3.11 Messreihen an mRNA-injizierten defollikulierten Xenopus-Oozyten mit 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon. Die waagerechte gestrichelte Linie markiert den Bezugswert von 100% aus dem 2. Kontrollversuch. Die Balken über den Kurven zeigen die Dauer der Applikation. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 ersichtlich.

follikulierte Oozyten	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
1	106%	89%	90%
2	97%	64%	131%
3	87%	98%	99%
4	91%	86%	88%
5	115%	101%	88%
6	103%	93%	92%
7		80%	69%
8		184%	72%
9		74%	
10		83%	
MW	100 %	95%	91%
SEM	4,3%	10,4%	6,8%
p	0,577	0,205	0,406

Tab.3.9 Relative Effekte von Antimon auf NMDA-Rezeptorkanäle von follikulierten Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist.

defollikulierte Oozyten	0,1 µmol/l	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
1	87%	66%	54%	113%
2	86%	31%	97%	50%
3	96%	117%	61%	59%
4	92%	56%	39%	73%
5	82%		84%	74%
6				91%
7				79%
MW	89%	68%	67%	77%
SEM	2,4%	18,1%	10,3%	7,8%
p	0,015	0,135	0,014	0,022

Tab.3.10 Relative Effekte von Antimon auf NMDA-Rezeptorkanäle von defollikulierten Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist.

fol. + defoll. Oozyten	1 µmol/l	10 µmol/l	100 µmol/l
MW	87%	86%	85%
SEM	8,7%	8,3%	5,3%
p	0,108	0,011	0,017
n	10	15	15

Tab.3.11 Zusammenfassung der relativen Effekte von Antimon auf NMDA-Rezeptorkanäle mit folliculierten und defolliculierten Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist. n = Anzahl der Oozyten.

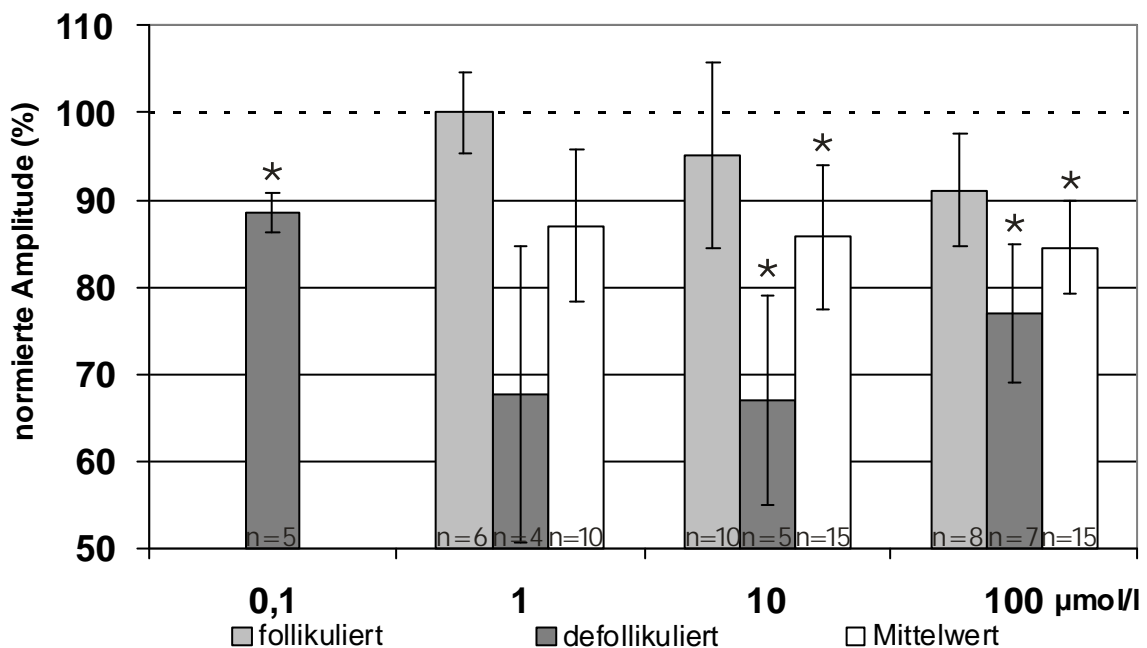


Abb.3.12 Vergleich der Effekte an NMDA-Rezeptoren zwischen folliculierten und defolliculierten Oozyten. Signifikante Messergebnisse sind mit einem Sternchen markiert. Die senkrechten Striche zeigen den Standardfehler (SEM). Die Anzahl der Versuche ist in den Säulen ablesbar. Die Versuchsreihe mit einer Antimonkonzentration von 0,1 µmol/l wurde nur an defolliculierten Oozyten bestimmt.

3.4.3 Wirkung von Trimethylantimondichlorid auf GABA-Rezeptorkanäle

Für die Untersuchung von Trimethylantimondichlorid auf GABA-Rezeptorkanäle wurde ebenfalls das bekannte Messprotokoll eingesetzt. Die Pause zwischen den einzelnen

Messungen betrug auch hier etwa 10 Minuten. In der Abbildung 3.13 ist eine typische Originalregistrierung zu sehen.

Mit dem Transmitter GABA konnten nur zehn Versuche durchgeführt werden, da die Oozyten zum Zeitpunkt der elektrophysikalischen Experimente ein geringes und instabiles Membranpotential ausbildeten. Von den zehn Versuchen entfielen sieben auf follikulierte und drei auf defollikulierte Oozyten. Die Konzentration des Transmitters betrug 10, 25, 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$. Die Konzentration 50 $\mu\text{mol/l}$ kam in sieben Versuchen am häufigsten zum Einsatz.

Die Amplituden schwankten in einem engen Bereich um 80% des Bezugswertes. Der Wert sank jedoch bei einem Versuch mit einer Antimonkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ auf 52,4%, während mit einer anderen Oozyte und einer Antimonkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ der Wert auf 118,5% stieg. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.12 aufgelistet.

Das Diagramm 3.14 zeigt eine Übersicht der Amplituden unter Beachtung der geringen Versuchsanzahl. Die Messreihen mit follikulierten Oozyten, sowie die Zusammenfassung der Werte aus follikulierten und defollikulierten Oozyten ($84\% \pm 5\%$; $p = 0,039$) führten zu signifikanten Ergebnissen.

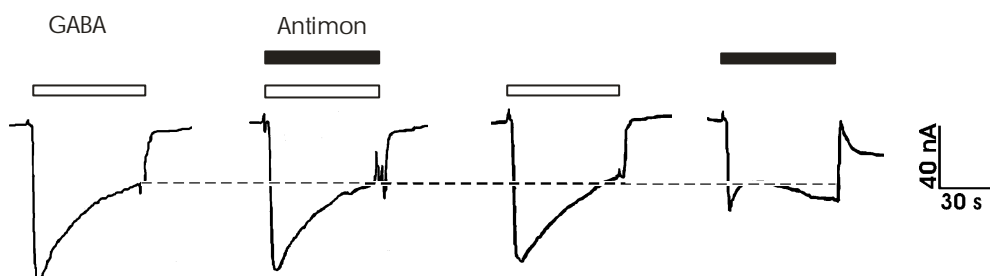


Abb.3.13 Messreihe an einer mRNA-injizierten follikulierten Xenopus-Oozyte mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon. Die gestrichelte Linie markiert den Bezugswert von 100% aus dem 2. Kontrollversuch. Die Balken über den Kurven zeigen die Dauer der Applikation. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 ersichtlich.

follikulierte Oozyten	100 µmol/l		defollikulierte Oozyten	100 µmol/l
	10 µmol/l	100 µmol/l		
1	84%	80%	1	100%
2	119%	88%	2	83%
3		82%	3	91%
4		52%		
5		92%		
MW	101%	79%	MW	92%
SEM	17,5%	6,9%	SEM	4,8%
p	0,6	0,02	p	0,225

Tab.3.12 Relative Effekte von Antimon auf GABA-Rezeptorkanäle. In der linken Tabelle handelt es sich um follikulierte Oozyten, in der rechten um defollikulierte Oozyten. MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler. p = Wahrscheinlichkeit, dass die Differenz aufgrund zufälliger Schwankungen auftrat (bestimmt durch Wilcoxon Signed Rank Test). Ist $p \leq 0,05$, so ist diese Wahrscheinlichkeit so gering, dass die ermittelte Differenz signifikant ist.

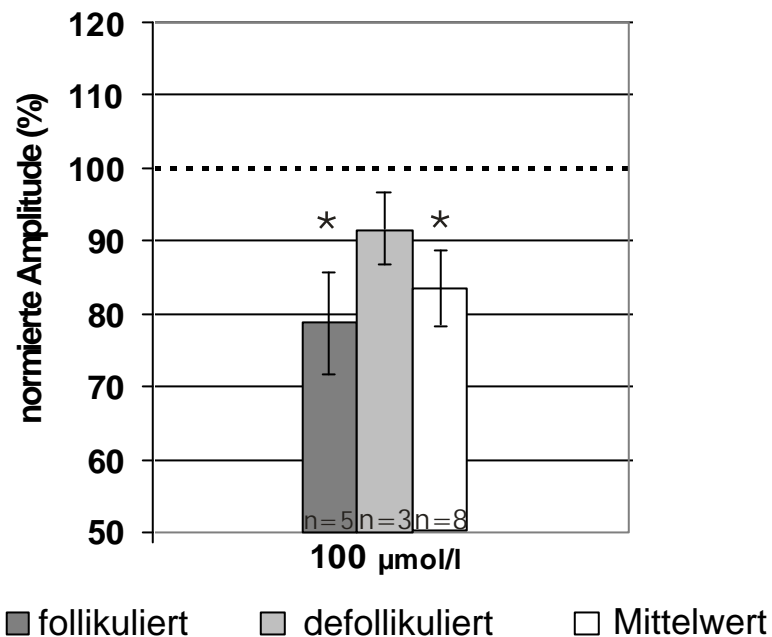


Abb.3.14 Vergleich der Effekte an GABA-Rezeptoren zwischen follikulierten und defollikulierten Oozyten. Die Antimonkonzentration betrug 100 µmol/l. Signifikante Messergebnisse sind mit einem Sternchen markiert. Die senkrechten Striche zeigen den Standardfehler (SEM); n = Anzahl der Versuche.

4. Diskussion

Die industrielle Nutzung von organischen Antimonverbindungen sowie die Biomethylierung von anorganischen Antimonverbindungen durch Mikroorganismen führen zu einer weitreichenden Kontamination von Wasser, Luft und Sedimenten und stellen somit eine wichtige Gruppe potenziell umweltgiftiger Substanzen dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob es eine neurotoxikologische Wirkung von organischen Antimonverbindungen durch Beeinflussung von neuronalen Glutamat- und GABA-gesteuerten Rezeptorkanälen gibt.

4.1 Diskussion des methodischen Vorgehens

4.1.1 Perspektiven und Grenzen des Expressionssystems der *Xenopus* Oozyten

Eine notwendige Voraussetzung für die Übertragung des physiologischen Modells von neuronalen Rezeptorkanälen auf die Verhältnisse im Nervensystem ist das weitgehende Entsprechen von Rezeptorkanälen der mRNA-injizierten Oozyten (heterologe Ionenkanäle) in Aufbau und Funktion mit den nativen Ionenkanälen der Nervenzellen. Die registrierten Ionenströme nach Injektion von neuronaler mRNA aus Rattenhirn und Applikation von Neurotransmittern müssen eindeutig durch de novo synthetisierte, ratten-spezifische Ionenkanäle verursacht sein. Diese Voraussetzungen sind in zahlreichen Studien für das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte überprüft worden (Sigel, 1987, Randle et al., 1988; Mußhoff et al., 1992). Außerdem konnte für die Glutamat-Rezeptorkanäle eine funktionstüchtige Integration in die Oozytenmembran durch einen komplexen Translationsprozess der Oozyte nachgewiesen werden (Mußhoff et al., 1992).

Weiterhin besitzen die exprimierten Rezeptorkanäle sämtliche pharmakologischen Eigenschaften, die für Glutamat-Rezeptorkanäle beschrieben werden (Nicoll et al., 1990). Auch bezüglich der Kinetik der transmembranösen Ionenströme nach Aktivierung des Rezeptors zeigt sich eine große Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien (z.B. Randle, 1988, Kelso und Leonard, 1991).

Jedoch kann trotz der Übereinstimmung von heterologen und nativen Rezeptorkanälen keine völlige Gleichsetzung vom Modell zur natürlichen Nervenzelle erreicht werden, da beispielsweise beim metabotropen Glutamat-Rezeptor beachtet werden muss, dass der Rezeptor in verschiedenen Neuronen an unterschiedliche Reaktionskaskaden gekoppelt ist, welche möglicherweise nicht alle in der betreffenden Oozyte vorhanden sind (Schoepp und Conn, 1993). Einige Glutamat-Rezeptorkanäle wie zum Beispiel der NMDA-Rezeptorkanal sind zudem heteromer aus mehreren Untereinheiten aufgebaut (Luo et al., 1997).

Monyer et al. konnten 1994 nachweisen, dass in den Hirnregionen eine zellspezifische Zusammensetzung der Rezeptorkanaluntereinheiten stattfindet. Die Untereinheiten sind unter anderen für die Kinetik und Desensitivierungsverhalten der Rezeptoren bedeutsam. Beispielsweise werden verschiedene Untereinheiten in unterschiedlichem Maße durch Enzyme, wie z.B. die Proteinkinase A, beeinflusst. Tingley et al. (1997) wiesen dies im Hinblick auf Rezeptoraktivität nach. Im verwendeten Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten kann auf die Verteilung nach ihrer intrazellulären Expression kein Einfluss genommen werden, weil die Verteilung und der Einbau der Untereinheiten in den Rezeptorkomplex wahrscheinlich zufallsabhängig erfolgt. Dies stellt einen möglichen Nachteil in der Beurteilung des Ausmaßes sowie Angriffspunkt der Wirkung der Trimethylantimonverbindung dar.

Ein zusätzlicher Nachteil des Oozyten-Modells gegenüber Säugetierzellen ist die reduzierte pharmakologische Sensitivität einiger Substanzen. So kann dies an den Hüllschichten der Oozyte liegen (siehe auch Abb.2.3). Demgemäß konnte ein reduzierter Substanzeffekt an spannungsabhängigen Kaliumkanälen für kleine Moleküle (Tetraethylammonium), einzelne Ionen (Blei) und Peptide (α -Dendrotoxin) an follikulierten Oozyten nachgewiesen werden (Madeja et al., 1997). Der qualitative Effekt der einzelnen Substanzen war bei Oozyten mit und ohne Follikelschicht gleich, lediglich das Ausmaß der Beeinflussung war bei Oozyten ohne Hüllschichten größer. Hingegen wurde für andere Substanzen wie beispielsweise für Melatonin (Blumenau et al., 2001) und 2-Phenoxyethanol (Mußhoff et al., 1999) kein Unterschied zwischen Oozyten mit und ohne Follikelschichten gefunden (vergleiche auch Gunderson et al., 1983). Grundsätzlich können aber die Hüllschichten der Zelle ein Diffusionshindernis darstellen. Dies zeigen u. a. auch die Versuchsergebnisse dieser Arbeit.

Das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte ist allerdings für die Beurteilung der Funktionsweise der Rezeptorkanäle bzw. der Beeinflussung ihrer Funktion durch die verwendeten Substanzen gut geeignet, da die Substanzen direkt an den gewünschten Rezeptorkanälen ohne Fremdeinfluss anderer Ionenkanäle wirken. Außerdem wird eine Verfälschung der Untersuchung durch Aufnahme der Antimonverbindung in benachbarte Zellen oder Transmitterfreisetzung aus benachbarten Zellverbänden sowie eine Veränderung des extrazellulären Milieus, beispielsweise durch Zelluntergänge, vermieden, da es sich um Einzelversuche handelt.

Im Vergleich zu Nervenzellen sind die Oozyten in ihrer experimentellen Handhabung recht unempfindlich, so dass für die Dauer des Versuchsprotokolls Untersuchungen

möglich waren. Dies zeigen unter anderen auch die länger andauernden Vorversuche bezüglich der Repetition der Rezeptorkanalaktivierungen.

Das Oozytensystem bietet außerdem eine selbst regulierende Qualitätssicherung, da die Zelle nur lebensfähig ist, wenn ihre Membran, also der Ort der Rezeptorexprimierung, regelgerecht aufgebaut ist.

Ein Großteil der in dieser Arbeit untersuchten transmembranösen Ionenströme wurde an defolikulierten Oozyten gemessen, jedoch wirkte sich die fehlende Follikelschicht negativ auf die Membranstabilität aus, sodass einige Zellen nicht die vollständige Dauer des Versuchsprotokolls überstanden. Die oben benannten Vorversuche fanden an follikulierten Oozyten statt.

4.1.2 Vor- und Nachteile des Versuchsprotokolls

Die Applikation von Trimethylantimon erfolgte nach dem im Kapitel 2.8 beschriebenen Versuchsprotokoll. Entsprechend wurde an einer Oozyte der Transmitter zweimal hintereinander appliziert und darauf folgend mittels Koapplikation von Transmitter und Antimonsubstanz die Bezugsantwort ermittelt, die zum Ausschluss desensitivierender Effekte auf die Kontrollantwort der zweiten Applikation bezogen wurde. Die erste Kontrollantwort wurde verworfen (siehe auch Kap. 3.11, 3.21 und 3.31). Dabei wurde jeweils eine Pause von 10 Minuten bei Versuchen mit Kainat und GABA als Liganden, bzw. 15 Minuten bei NMDA als Ligand, eingehalten.

Die Kontrollantwort der Transmitterapplikation nach der Koapplikation mit der Antimonverbindung diente der Kontrolle der regelgerechten Funktion der Rezeptorkanäle. Somit konnte eine eventuelle irreversible Schädigung der Rezeptorkanäle durch die Substanz ausgeschlossen werden. Zuletzt wurde getestet, ob eine alleinige Applikation

des Trimethylantimons ohne Transmitterzusatz schon einen Effekt auf die bioelektrischen Eigenschaften der Oozytenmembran hat (vergl. Kap. 2.8 und 3.4).

Die Substanz bewirkte, wie in den Tabellen 3.4 ersichtlich, einen geringen Eigeneffekt, der erst gemittelt und dann rechnerisch von den Effekten der Testantworten abgezogen wurde. Da die Oozyten recht unterschiedlich auf die alleinige Antimonapplikation reagierten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Rezeptorkanaleffekt um einen relativ spezifischen Effekt zu handeln scheint, möglicherweise bedingt durch die stochastische Verteilung und Einbau der Untereinheiten in den Rezeptorkomplex.

Wie bereits oben erwähnt, bewirkte die fehlende Follikelschicht eine Schwächung der Stabilität der Oozytenmembran. Zusätzlich ist es wahrscheinlich, dass die Antimonverbindung ebenfalls zu einer Destabilisierung der Membran bzw. Schädigung der Zellen insgesamt beiträgt, da eine längere Versuchsdauer ohne Antimonapplikation in der Regel von den Zellen toleriert wurde.

Ein weiterer Vorteil des verwendeten Versuchsprotokolls ist somit seine zeitlich eng zusammenliegende Bezugs- und Testantwort. Innerhalb von 10 bzw. 20 Minuten ist also kaum davon auszugehen, dass eine Veränderung der Amplitude der Testantwort bezogen auf die Bezugsamplitude durch den Zeitfaktor bewirkt sein könnte. Dadurch werden insgesamt Verfälschungen der Ergebnisse minimiert.

4.2 Interpretation der erhobenen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Trimethylantimondichlorid auf Glutamat- und GABA-Rezeptorkanäle untersucht, um das neurotoxische Potential dieser organischen Antimonverbindung einzuschätzen. Die Diagramme in den Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen die Zusammenfassung der Ergebnisse.

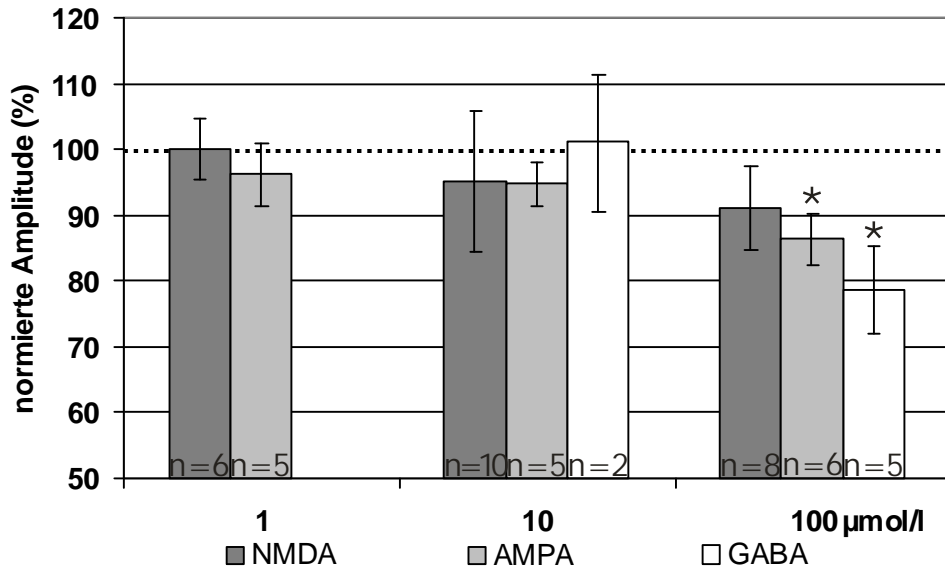


Abb.4.1 Übersicht der Messergebnisse mit folliculierten Oozyten bei Applikation von Antimon in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µmol/l. Der Transmitter GABA wurde in der Konzentration 1 µmol/l nicht appliziert. Zu sehen sind außerdem die Standardfehler als senkrechte Striche sowie mit einem Sternchen markierte signifikante Messergebnisse; n = Anzahl der Versuche.

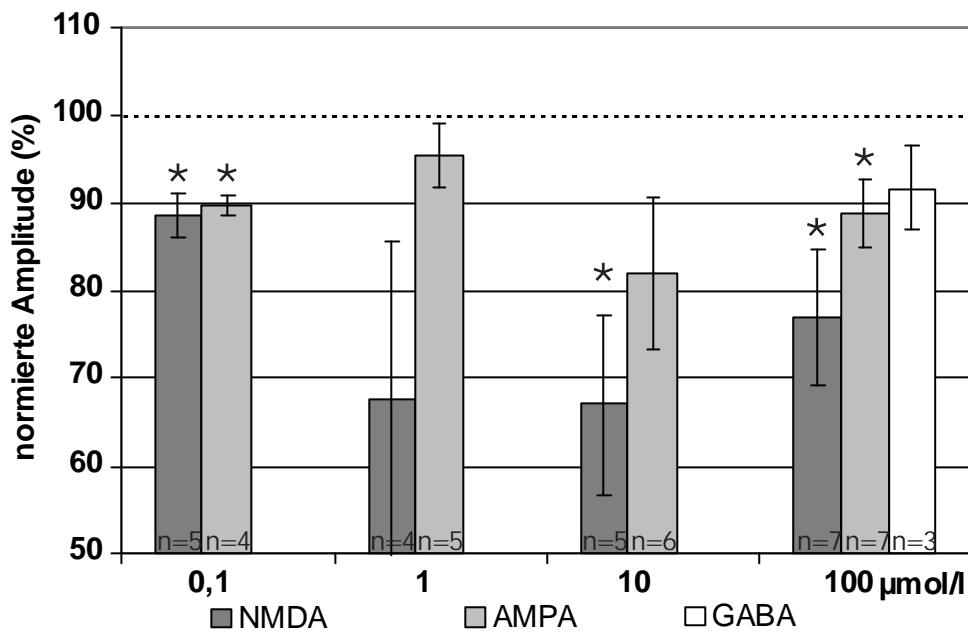


Abb.4.2 Übersicht der Messergebnisse mit defolliculierten Oozyten bei Applikation von Antimon in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 µmol/l. Der Transmitter GABA wurde nur mit der Konzentration von 100 µmol/l appliziert. Zu sehen sind außerdem die Standardfehler als senkrechte Striche sowie mit einem Sternchen markierte signifikante Messergebnisse; n = Anzahl der Versuche.

4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Effekte durch Trimethylantimontrichlorid

Trimethylantimontrichlorid zeigte im getesteten Konzentrationsbereich von 0,1 bis 100 $\mu\text{mol/l}$ teilweise signifikant hemmende Effekte (siehe auch Abb.4.1 und 4.2). Schon bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Antimonsubstanz wurden signifikante Ergebnisse an AMPA- und NMDA-Rezeptorkanälen registriert. So sank die Stromamplitude auf ca. $90\% \pm 1\%$ bei Applikation von AMPA und $88,5\% \pm 2,4\%$ bei NMDA-Applikation an defollikulierten Oozyten herab.

Bei den Untersuchungen mit einer Antimonkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ reichte der Einfluss auf follikulierte Oozyten kaum aus, um messbare Potentialänderungen zu erzielen, jedoch fiel die Amplitude des Ioneneinwärtsstroms bei Rezeptorkanalaktivierung bei den defollikulierten Oozyten je nach Rezeptorkanaltyp auf $68\% \pm 18\%$ mit NMDA als Transmitter und $96\% \pm 3,7\%$ mit Kainat.

Ein ähnliches Bild zeigten die Ergebnisse bei einer Konzentration mit 10 $\mu\text{mol/l}$. Die Amplituden des Ioneneinwärtsstroms sanken zwar ebenfalls, signifikante Ergebnisse kamen jedoch nur mit defollikulierten Oozyten zustande. So bewirkte hier der Effekt eine Hemmung auf $67\% \pm 10,3\%$ bei NMDA-Rezeptorkanälen bzw. $82\% \pm 5\%$ bei AMPA-Rezeptorkanälen. Eine gleichmäßigere Verteilung, jedoch ohne Signifikanzen, zeigen die Ergebnisse mit follikulierten Oozyten, die sich bei ca. 96% bzw. 101% einstellten. In der Konzentration mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Antimon und GABA als Transmitter war dies das einzige Ergebnis, das eine größere Amplitude als der Ausgangswert zeigte. Dieses Ergebnis ist jedoch unter Beachtung der geringen Anzahl der Versuche nicht sehr aussagekräftig.

Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimonsubstanz wurden für alle Rezeptorkanaltypen signifikante Ergebnisse erzielt. Die Stromamplituden betragen bei follikulierten und defollikulierten

Oozyten je nach Transmittersubstanz zwischen 91% und 79% des Ausgangswertes. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann also davon ausgegangen werden, dass die Konzentration von Trimethylantimontrichlorid einen Einfluss auf das neurotoxische Potential besitzt (siehe Abb.4.1).

Die in Abbildung 4.2 gezeigten Ergebnisse geben ein eher uneinheitliches Bild, jedoch ist dies wahrscheinlich auf die höhere Empfindlichkeit der Oozyten nach Defollikulation zurückzuführen, da auch die Standardfehler sehr variieren. Gerade aber die höheren Konzentrationen führen auch hier zu signifikanten Ergebnissen.

4.2.2 Abhängigkeit der Effekte von Trimethylantimontrichlorid von der Follikelschicht

Wie schon bereits erwähnt, scheint es einen Zusammenhang bezüglich der blockierenden Effekte der Antimonverbindung und der Follikelschicht der Oozyte zu geben. So konnte an follikulierten Oozyten lediglich bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimonsubstanz eine signifikante Änderung der Amplitude des Ioneneinwärtsstroms bei Rezeptorkanalaktivierung beobachtet werden (siehe auch Abb.4.1). Eine Antimonkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ hatte einen kaum messbaren Effekt auf die Stromamplituden zur Folge. Wurde die Konzentration auf 10 $\mu\text{mol/l}$ Antimonsubstanz erhöht, so verringerte sich die Amplitude auf 95%, bzw. 85% bei 100 $\mu\text{mol/l}$. Entfernte man jedoch die Follikelschicht von der Oozyte, so stellten sich bereits bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Antimon signifikante Effekte ein, die bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ Antimon fehlten, sich jedoch bei 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon wieder einstellten (Abb.4.2). Zu beachten ist dabei, dass die GABA-Rezeptorkanäle nur in der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Antimon überprüft wurden. Durchschnittlich sanken die Stromamplituden bei Rezeptorkanalaktivierung auf 90% bis sogar 67% ihres Ausgangswertes herab. Es ist jedoch nicht, anders

als bei den follikulierten Oozyten, ein Zusammenhang zwischen Größe der Amplitude und Antimonkonzentration erkennbar.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Effekte der Antimonsubstanz bei den Rezeptorkanalaktivierungen bei defollikulierten Xenopus-Oozysten größer sind. Offensichtlich stellt die Follikelschicht auch für Trimethylantimondichlorid ein wirksames Diffusionshindernis dar.

4.2.3 Abhängigkeit der Effekte von Trimethylantimondichlorid vom Rezeptorkanaltyp

Wie in den Abbildungen 4.1 und 4.2 erkennbar, scheint es keine auffälligen Affinitäten zu einem speziellen Rezeptorkanaltypen zu geben. Die Amplituden des Ioneneinstroms bei Rezeptorkanalaktivierung bewegen sich jedenfalls bei den follikulierten Oozyten je nach Konzentration der Antimonsubstanz auf relativ gleichem Niveau. Lediglich bei den defollikulierten Oozyten scheint es eine etwas höhere Hemmung von NMDA-Rezeptorkanälen im Vergleich zu GABA- oder AMPA-gesteuerte Rezeptorkanälen zu geben.

Paradoxerweise ist die maximale Hemmung von NMDA-gesteuerten Rezeptorkanälen mit $1\mu\text{mol/l}$ Antimonsubstanz erreicht und scheint dann wieder mit steigender Konzentration abzunehmen, was wiederum im Widerspruch zu der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Konzentrationsabhängigkeit steht und somit wahrscheinlich ein Artefakt darstellt. Hierbei wird nochmals auf den hohen Standardfehler der Messergebnisse verwiesen.

4.3 Bedeutung der gefundenen Antimoneffekte bezüglich des Nervensystems

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung legen nahe, dass ein Zusammenhang bezüglich der Exposition mit Trimethylantimon und den in Kapitel 1.5 gestellten neuro-

nal bedingten Intoxikationserscheinungen besteht. Je höher die Konzentration, desto höher ist auch der Einfluss auf die neuronale Zelle, so dass die Substanz die untersuchten Rezeptorkanaltypen zu blockieren scheint.

Es lassen sich jedoch keine genauen Aussagen treffen, an welchen Orten die Substanz genau wirkt. So könnte die organische Antimonverbindung beispielsweise eine Störung der Membranstruktur durch Änderung der Lipidzusammensetzung oder Lipidanordnung der Membran bewirken oder durch eine Änderung der Phospholipidstruktur innerhalb der Protein-Lipid-Mikrodomäne, welche die Proteinbauweise aufrecht erhält, zu Störungen führen (siehe auch Abb.4.3).

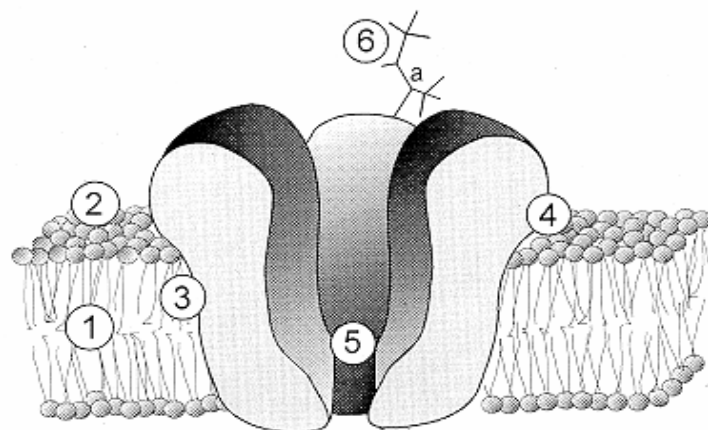


Abb.4.3 Bildliche Darstellung des Querschnitts eines hypothetischen neurotransmittergesteuerten Ionenkanalproteins und mögliche Ioneninteraktionsstellen. 1: Störung der Membranstruktur durch Änderung der Lipidzusammensetzung und -anordnung. 2: Interaktion mit polaren Kopf-Gruppen der Phospholipide. 3: Änderung der Phospholipidstruktur innerhalb der Protein-Lipid-Mikrodomäne. 4: Direkte Interaktion mit Aminosäurestrukturen der Proteine. 5: Blockade oder Beeinflussung unmittelbar in der Pore. 6: Wirkung an der Rezeptorbindungsstelle (modifiziert nach Fadda und Rossetti, 1998).

Hierbei würde die Substanz dann unmittelbar in der Membran wirken. Ein weiterer Weg wäre die Interaktion mit den polaren Köpfchen der Phospholipide und damit einer indirekten Beeinflussung der Proteinfunktion. Möglicherweise wirkt die Substanz aber auch direkt in der Pore oder als endogener Ligand von Außen an der Rezeptorbindungsstelle und beeinflusst so dessen Funktion (siehe Abb.4.3). Dafür spricht jedenfalls die Feststellung aus den Kontrollversuchen nach Koapplikation mit Antimon, in der die Stromamplitude zurück zum Ausgangswert der Bezugsmessung findet. Die Antimonverbindung scheint also keine irreversiblen Effekte auf die untersuchten Rezeptorkanäle auszuüben.

Es seien auch die Möglichkeiten der Beeinflussung anderer neuronaler Strukturen wie beispielsweise spannungsgesteuerter Ionenkanäle sowie Rezeptoren der erregenden und hemmenden synaptischen Übertragung erwähnt. Samaan wies 1976 einen Einfluss von Antimon auf die Konzentration von GABA und Acetylcholin in den cerebralen Hemisphären nach.

Durch die Membrangängigkeit sind weitere Möglichkeiten zur Wirkung innerhalb der Zelle gegeben. So kann es auch zu Störungen an Zellorganellen oder Enzymen kommen. Für andere metallorganische Substanzen ist bekannt, dass sie die Mitochondrienfunktion beeinträchtigen können (z.B. Blei; Craig, 2003).

Die Funktion der Natrium-Kalium-Pumpen, welche für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials zuständig sind, ist direkt durch die gestörte Mitochondrienfunktion aufgrund unzureichender ATP-Synthese beeinträchtigt. Möglicherweise ist dies auch eine Erklärung für die bereits beschriebenen Schwierigkeiten bei einigen Versuchen, bei denen es nach Antimonapplikation häufig nicht mehr möglich war, sie in der Spannungsklemme weiterzuführen.

Wahrscheinlich bewirkte die Antimonverbindung einen solchen Effekt an der Oozytenmembran, der im Gegensatz zur Beeinflussung der Rezeptorkanäle eher konzentrationsunabhängig zu sein scheint. Eine direkte Übertragung vom Expressionssystem der Oozyten auf natives Nervengewebe ist aus den oben genannten Gründen schwierig. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass hohe Konzentrationen von Trimethylantimondichlorid zu Störungen von Rezeptorkanälen führen und das Krankheitsbild von neuronalen Intoxikationen bewirken können. Hierbei sei auch noch einmal darauf hingewiesen, dass die neurotoxischen Prozesse anderer begleitender Schwermetalle wie beispielsweise Arsen oder Blei immer in den Vordergrund treten und eine alleinige Verantwortung dem Antimon meistens nicht zukommt.

5. Literaturverzeichnis

Bertine KK, DS Lee (1983): Antimony content and specification in the water column and interstitial waters of Saanich Inlet. Wong CS, Boyle E, Bruland KW, Goldberg ED (eds) Trace Metals in Sea Water, Plenum press, New York: 21-38

Binding N, M Madeja, U Mußhoff, U Neidt, U Altrup, EJ Speckmann, U Witting (1996): Prediction of neurotoxic potency of hazardous substances with a modular in vitro test battery. Toxicol Lett. 88 1-3: 115-120

Blumenau C, E Berger, J-D Fauteck, M Madeja, W Wittkowski, EJ Speckmann, U Mußhoff (2001): Expression and functional characterization of the mt₁ melatonin receptor from rat brain in *Xenopus* oocytes: Evidence for coupling to the phosphoinositol pathway. J Pineal Res 30: 139-146

Brieger H, CW Semisch, J Stasney, D Piatnek (1954): Industrial antimony poisoning. Ind. Med. Surg. 23: 521-523

Carson BL, HV Ellis, JL McCann (1986): Antimony. Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans. Lewis Publishers, Chelsea, Mi: 21-26

Cathala G, JF Savouret, B Mendez, BL West, M Karin, JA Martial JD Baxter (1983): A method of isolation of intact translationally active ribonucleic acid. DNA 2: 329-335

Choi S-C, R Bartha (1993): Cobolamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Appl Envi Microbiol 59: 290-295

Craig PJ (ed) (1986): General comments on the toxicities of organometallic compounds. Organometallic compounds in the environment. Longmans Group, Harlow

Craig PJ, RO Jenkins, R Dewick, DP Miller (1999): Trimethylantimony generation by *Scopulariopsis brevicaulis* during arohic growth. Sci Total Environ 229: 83-88

Craig PJ, F Cima, C Harrington (2003): Organitin Compounds in the Environment. In: John Wiley & Sons Ltd (Eds.), Organometallic Compounds in the Environment, 2. Auflage, West Sussex 102-106, 111-113, 127-141

Craig PJ, G Eng, RO Jenkins (2003): Occurrence and Pathways of organometallic Compounds in the Environment. In: John Wiley & Sons Ltd (Eds.), Organometallic Compounds in the Environment, 2. Auflage, West Sussex 10-27, 33-40

Dascal N (1987): The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. CRC crit Rev Biochem 22: 317-387

De Wolff FA (1995): Antimony and health. British Medical Journal 310: 1216-1217

- Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of Oocyte Development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-180
- Elinder CG, L Friberg (1986): Antimony. Handbook on the Toxicology of Metals. L Friberg, GF Nordberg, VB Vouk. Elsevier, New York. 2: 26-42
- Fadda F, ZL Rosetti (1998): Chronic ethanol consumption: From neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56: 385-431
- Feldmann J, AV Hirner (1995): Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases. *Intern J Environ Anal Chem* 60: 339-359
- Gates PN, HA Harrop, JB Pridham, B Smethurst (1997): Can microorganisms convert antimony trioxide or potassium antimony tartrate to methylated stibines. *Science of the Total Environment* 205: 215-221
- Gebel T, J Schäfer, I Beuermann, H von Platen, H Dunkelberg (1995): Biomonitoring-Untersuchung bei Personen in Wohngebieten mit erhöhten Bodenwerten an Quecksilber, Arsen und Antimon. *Forum Städte Hyg.* 4: 211-215
- Gebel T (1997): Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chemico-Biological Interactions* 107: 131-144
- Gundersen CB, R Mideli, I Parker (1983): Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond* 219: 103-109
- Gürleyük H, V Van Fleet-Stalder, TG Chasteen (1997): Confirmation of the biomethylation of antimony compounds. *Applied Organometallic Chemistry* 11: 471-483
- Henneberry RC (1992): Cloning of the genes for excitatory amino acid receptors. *BioEssay* 14: 465-471
- Hirner AV, J Feldmann, R Goguel, S Rapsomanikis, R Fischer, O Andreae (1994): Volatile metal and metalloid species in gases from municipal waste deposits. *Appl Organomet Chem* 8: 65-69
- Hirner AV, J Feldmann, E Krupp, R Grumping, R Goguel, WR Cullen (1998): Metal(oid)organic compounds in geothermal gases and waters. *Org Geochem* 29: 1765-1778
- Hodgkin AL, AF Huxley, B Katz (1949): Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* 3: 129-150
- Hodgkin AL, AF Huxley, B Katz (1952): Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo. *J Physiol (Lond)* 116: 424-448
- Hollmann M, S Heinemann (1994): Cloned glutamate receptors. *Ann Rev Neurosci* 17: 31-108

Honey M (1960): The effects of sodium antimony atrtrate on the myocardium. *Br. Heart Journal* 22: 601-616

Hepburn NC, J Nolan, L Fenn, RM Herd, JMM Neilson, GR Sutherland, KAA Fox (1994): Cardiac effects of sodium stilboglucanate: Myocardial. Electrophysiological and biochemical studies. *Q.J. Med.* 87:465-472

Kelso SR, JP Leonard (1991): Expression of exogenous NMDA receptors in *Xenopus* oocytes. In: AP Kozikowski und G Barrionuevo (Eds.), *Neurobiology of the NMDA receptor*. New York-Weinheim-Cambridge 91-111

Jenkins RO, PJ Craig, W Goessler, KJ Irgolic (1998): Biovolatilization of antimony and sudden infant death syndrome (SIDS). *Hum. Exp. Toxicol.* 17 4: 231-238

Li X, I Thornton (1993): Arsenic, antimony and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. *Environ. Geochem. Health* 15: 135-144

Luo J, Y Wang, RP Yasuda, AW Dunah, BB Wolfe (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 1: 79-86

Luong KVQ, LTH Nguyen (1999): Organic arsenic intoxication from birds`s nest soup. *Am J Med Sci* 317: 269-271

Madeja M, U Mußhoff, EJ Speckmann (1991): A concentration-clamp system allowin two-electrode voltage-clamp investigations in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Neurosci Methods* 38: 267-269

Madeja M, U Mußhoff (1992): Oocytes of the Claw Frog – A Model in Neurophysiology. *EEG-Labor* 14: 25-37

Madeja M, N Binding, U Mußhoff, O Pongs, U Witting, EJ Speckmann (1995): Effects of lead on cloned neuronal voltage-operated potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol* 351: 320-327

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

Maniatis T, EF Fritsch, J Sambrook (1982): *Molecular cloning (A laboratory manual)*. Cold Springs Harbor Laboratory. USA 468

Mayer ML, GL Westbrook, PB Guthrie (1984): Voltage dependent block by Mg^{2+} of NMDA response in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-263

Mazumder DN, J Das Gupta, AK Chakraborty et al. (1992): Environmental pollution and chronic arsenosis in south Calcutta. *Bull World Health Organ* 70: 481

- Middleburg JJ, D Hoede, HA VanDer Sloot, CH VanDer Weijden, J Wijkstra (1988): Arsenic, antimony and vanadium in the North Atlantik Ocean, *Geochim Cosmochim Acta* 52:2871-2878
- Monyer H, N Burnashev, DJ Laurie, B Sakmann, PH Seeburg (1994): Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 173-183
- Mok WM, CM Wai (1990): Distribution and mobilization of arsenic and antimony species in the Coeur d'Alene River, Idaho. *Environmental Science and Technology* 24: 102-108
- Mußhoff U, M Madeja, P Bloms, EJ Speckmann (1992): Time course of glutamate receptor expression in individual oocytes of *Xenopus laevis* after injection of rat brain RNA. *Comp Biochem Physiol* 103: 189-193
- Mußhoff U, M Madeja, N Binding, U Witting, EJ Speckmann (1995): Lead-induced blockade of kainat-sensitive receptor channels. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 353: 42-45
- Mußhoff U, N Binding, M Madeja, U Witting, EJ Speckmann (1995): Das Oozyten-Expressionssystem: Ein In-vitro-Modell für neurotoxikologische Fragestellungen. *EEG-EMG* 26: 209-214
- Mußhoff U, M Madeja, N Binding, U Witting, EJ Speckmann (1999): Effects of 2-phenoxyethanol on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated ion currents. *Arch Toxicol* 73: 55-59
- Needleman HL, C Gunnoe, A Leviton, R Reed, H Peresie, C Maher, P Barrett (1979): Deficits in physiologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med* 300: 689-695
- Needleman HL, D Bellinger (1991): The health effects of low level exposure to lead. *Ann Rev Public Health* 12: 111-140
- Nicoll RA, RC Malenka, JA Kauer (1990): Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 70: 513-565
- Nriagu JO, JM Pacyna (1988): Quantitative assessment of world wide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139
- Pocock SJ, M Smith, P Baghurst (1994): Environmental lead and childrens` intelligence: A systematic review of the epidemiological evidence. *Brit Med J* 309: 1189-1197
- Pongratz R, KG Heumann (1998): Production of methylated mercury and lead by polar macroalgae – a significant source of atmospheric heavy metals in clean room compartments. *Chemosphere* 36: 1935-1946

Randle JCR, P Vernier, AM Garrigues, E Brault (1988): Properties of kainate channels in rat brain mRNA injected *Xenopus* oocytes: Ionic selectivity and blockade. *Mol Cell Biochem* 80: 121-132

Samaan SS Galal, EE Khayyal, MT Saad SF (1976): The effect of potassium antimonyl tartrate on the gamma-aminobutyric acid and acetylcholine contents in the cerebral hemispheres of normal and *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 28(5): 465-466

Schoepp D, PJ Conn (1993): Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacol Sci* 141: 13-20

Sigel E (1987): Properties of single sodium channels translated by *Xenopus* oocytes after injection with messenger ribonucleid acid. *J Physiol* 386: 73-90

Sigel E (1990): Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117: 201-221

Silverman HS, MD Stern (1994): Ionic basis of ischaemic cardiac injury: Insights from cellular studies. *Cardiovasc. Res.* 28: 581-597

Snutch TP (1988): The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends in Neurosci* 11: 250-256

Speckmann EJ (1983): Einführung in die Neurophysiologie I. *EEG Labor* 5: 114-131

Speckmann EJ (1983): Einführung in die Neurophysiologie II. *EEG Labor* 5: 154-168

Stemmer KL (1976): Pharmacology and toxicology of heavy metals: antimony. *Pharmacology and Therapeutics* 1: 157-160

Stokinger HE (1981): The metals: 2 antimony, Sb. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, (GD Clayton and FE Clayton, Eds.), Vol. IIA, 3rd ed., Wiley-Interscience, New York: 1505-1517

Sumikawa K, M Houghton, JS Emtage, BM Richards, EA Barnard (1981): Active multi-subunit acetylcholine receptors assembled by translation of heterologus mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 292: 862-864

Takayanagi (2001): Acute Toxicity of Waterborne Se(IV), Se(VI), Sb(III), and Sb(V) on red Seabream (*Pargus major*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66:808-813

Takeuchi T (1982): Pathology of the Minamata disease. *Acta Pathol Jpn* 32: 73-99

Thayer JS (1995): Environmental chemistry of the heavy elements: hydrido and organo compounds. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim: 29-41

Tingley WG, MD Ehlers, K Kameyama, C Doherty, JB Ptak, CT Riley, RL Huganir (1997): Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem.* 272 8: 5157-5166

Turpeinen R, M Pansar-Kallio, M Häggblom, T Kairesalo (1999): Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Sci Total Environment* 238: 173-180

Watkins JC, HJ Olverman (1987): Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends in Neuroscience* 10: 265-271

Winship KA (1987): Toxicity of antimony and its compounds. *Adv. Drug React. Ac. Pois. Rev.* 2: 67-90

Yellen G (1984): Channels from genes: The oocyte as an expression system. *Trends in Neuroscience* 7 : 457-458

Danksagung

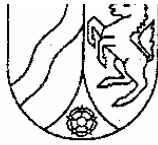
An erster Stelle bin ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Ulrich Mußhoff zu Dank verpflichtet, der mich zu dieser Arbeit führte und mir mit wertvollen Tips und Ratschlägen bei der Fertigstellung zur Seite stand.

Ebenso wichtig war die umfangreiche und nette Betreuung durch Frau Dr. Katharina Krüger, sowohl beim experimentellen Abschnitt im Labor, als auch bei der Datenverarbeitung am PC. Außerdem war sie mir bei der Bereitstellung von Fachliteratur sehr behilflich.

Eine weitere Person, der ein Riesendank gebührt, ist Frau Alexandra Markovic. Sie übernahm in ihrer Funktion als Medizinisch technische Angestellte die Vorbereitung der Xenopus-Oozyten. Sie stand mir ebenfalls bei Problemen während des Experimentierens zur Seite. Hierbei sei auch allen anderen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie gedankt, die mir in irgendeiner Form behilflich waren.

Schließlich danke ich allen Freunden und Verwandten, welche mir die nötige Motivation für den langen Weg der Promotion gegeben haben.

LEBENS LAUF



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle Epilepsie-
forschung-

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 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 79/2002)

19 . Dez. 2002

Tierschutz;

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 10.10.2002, hier eingegangen am 06.11.2002

Genehmigungsbescheid:

Sehr geehrter Herr Professor Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Experimentelle Epilepsieforschung“. (10 Teilprojekte gem. Antrag)

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreter sind:

Herr

Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle

Epilepsieforschung-

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Frau

Prof. Dr. rer. nat. Heidrun Straub

Institut für Physiologie

des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Herr
Prof. Dr. med. Ulrich Altrup
Institut für Experimentelle
Epilepsieforschung
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Maßhoff
Institut für Physiologie
des Universitätsklinikums Münster
Robert-Koch-Str. 27 a
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **31. 12. 2005**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

**100 Mäuse,
500 Ratten,
30 Frösche,
500 Landschnecken.**

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

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder seine Stellvertreter wechseln, 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.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

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

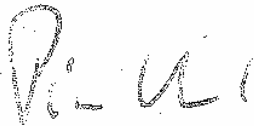
Rechtsbehelfsbelehrung:

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.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Piontkowski