

Zeitschrift:	Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche
Herausgeber:	Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften
Band:	30 (1974)
Artikel:	Die Nervengewebekultur : ein Modell zur Untersuchung synaptischer Mechanismen im Zentralnervensystem
Autor:	Hösl, L.
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-307976

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 23.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Abteilung für Neurophysiologie
der Neurologischen Universitätsklinik Basel

Die Nervengewebekultur – ein Modell zur Untersuchung synaptischer Mechanismen im Zentralnervensystem

L. HÖSLI

Der Begriff der Synapse wurde schon 1897 von SHERRINGTON eingeführt. Die Synapse ist eine morphologisch und funktionell besonders spezialisierte Kontaktstelle zwischen zwei Nervenzellen, die der Erregungsübertragung dient. Die grossen Fortschritte in der Erforschung der Struktur und Funktion der Synapse in den letzten Jahren waren erst möglich durch die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden und -apparaturen; so ist es z. B. mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gelungen, die Ultrastruktur der Synapse zu erforschen (s. AKERT 1971). Ferner konnten durch Verwendung feiner Glasmikroelektroden die bioelektrischen und ionalen Vorgänge, die den synaptischen Erregungs- und Hemmungsvorgängen zugrunde liegen, näher abgeklärt werden (ECCLES 1964).

Zahlreiche morphologische, biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen unterstützen die Auffassung, dass die Übertragung von Nervenimpulsen an der Mehrzahl der Synapsen des Zentralnervensystems der Säugetiere auf chemische Weise erfolge (ECCLES 1964). Die heutige Vorstellung über den Mechanismus der synaptischen Übertragung lässt sich in folgender Weise vereinfacht zusammenfassen:

Die Ankunft eines elektrischen Nervenimpulses in der präsynaptischen Nervenendigung bedingt die Freisetzung einer chemischen Substanz – der Überträgersubstanz –, die durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran diffundiert. Die Verbindung der Überträgersubstanz mit spezifischen, subsynaptischen Rezeptoren bewirkt eine Veränderung der Ionenpermeabilität der postsynaptischen Membran, die wiederum eine Veränderung des Ruhepotentials der Nervenzelle zur Folge hat. Die Art der Ionenpermeabilitätsänderung wird durch die chemische Natur der freigesetzten Überträgersubstanz und deren Einwirkung auf die Rezeptoren an exzitatorischen oder inhibitorischen Synapsen bestimmt. Während die bioelektrischen und ionalen Vorgänge, die den synaptischen Hemmungs- und Erregungsprozessen zugrunde liegen, recht gut abgeklärt sind, ist es bisher noch nicht gelungen, die erregenden und hemmenden Überträgersubstanzen an den Synapsen des Zentralnervensystems zu identifizieren.

Tabelle 1
Kriterien und Methoden zur Identifizierung von Überträgersubstanzen

Kriterien	Methoden
1. <i>Vorkommen</i> in Nervenzellen	Biochemisch Histochemisch
2. <i>Freisetzung</i> an Nervenendigungen	Elektrophysiologisch- biochemisch
3. <i>Wirkung</i> an der postsynaptischen Membran	Elektrophysiologisch Mikroelektrophorese
4. <i>Inaktivierung</i> a) enzymatischer Abbau b) Wiederaufnahme	Biochemisch Histochemisch Autoradiographie

Für die Identifikation einer Transmittersubstanz wurden folgende Kriterien aufgestellt (CURTIS 1961): Die Substanz muss in der präsynaptischen Nervenendigung nachgewiesen werden können (Tab. 1.1) und dort unter physiologischen Bedingungen freigesetzt werden (Tab. 1.2). Die Verabreichung der vermutlichen Überträgersubstanz im Bereich der postsynaptischen Membran (z. B. mit Hilfe von Mikroelektroden) soll eine ähnliche Wirkung hervorrufen wie die durch Nervenreizung freigesetzte natürliche Überträgersubstanz (Tab. 1.3). Da die Wirkung einer Überträgersubstanz nur sehr kurze Zeit dauert (ca. 1 msec), muss ferner ein rascher und wirksamer Mechanismus vorhanden sein, der den Überträgerstoff unmittelbar nach seiner Wirkung inaktiviert (Tab. 1.4).

Zur experimentellen Abklärung dieser Kriterien war die Entwicklung verschiedener neuer Untersuchungsmethoden notwendig. Spezifische, histochemische Methoden (KOELLE 1954, 1963, FUXE u. Mitarb. 1965, HILLARP u. Mitarb. 1966) sowie die Technik der biochemischen Analyse von subzellulären Fraktionen von Nervengewebe (WHITTAKER 1964, 1966, DE ROBERTIS 1966, 1967) geben Aufschluss über das Vorkommen und die Verteilung der Überträgersubstanzen im Bereich der synaptischen Strukturen. Mit Hilfe der Methode der Mikroelektrophorese, die es ermöglicht, mit mehrfachen Mikroelektroden kleinste Mengen von gelösten Substanzen in die unmittelbare Umgebung von Nervenzellen zu verabreichen, wurde die Wirkung von synaptischen Überträgersubstanzen auf die Aktivität von einzelnen Neuronen des Zentralnervensystems untersucht (CURTIS 1964).

Die vorliegende Arbeit beschreibt elektrophysiologische und histochemische Untersuchungen an Nervengewebe, welches während Wochen *in vitro* gezüchtet wurde. Es soll gezeigt werden, dass die Nervengewebekultur ein geeignetes Modell darstellt, an dem grundlegende Mechanismen der synaptischen Übertragung im Zentralnervensystem näher abgeklärt werden können, Untersuchungen, die sich nur schwer oder nicht am intakten Gehirn *in situ* durchführen lassen wie z. B. ionale Mechanismen, welche der Trans-

mitterwirkung zugrunde liegen oder die zelluläre Lokalisation der Aufnahme (Uptake) von Überträgersubstanzen ins Hirngewebe.

1. Morphologische Untersuchungen an Nervengewebekulturen

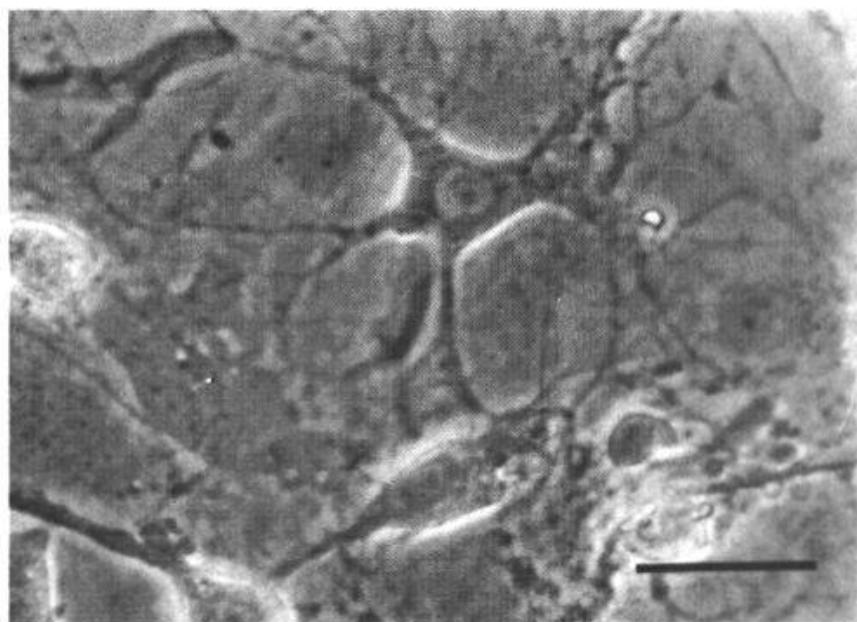
Zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Nerven- und Gliazellen, die während mehrerer Wochen in Gewebekultur gezüchtet wurden, ähnliche morphologische Eigenschaften aufweisen wie unter In-vivo-Bedingungen (MURRAY 1966, 1971).

Seit den Untersuchungen von HARRISON (1907), der als erster Nervengewebe kultiviert hat, sind in zahlreichen Laboratorien verschiedene Techniken zur Züchtung von Nervengewebe ausgearbeitet worden (MURRAY 1966). Trotz diesen Anstrengungen ist die In-vitro-Züchtung von Nervengewebe bis heute noch mit relativ grossen technischen Schwierigkeiten verbunden. Eine Methode, die sich besonders für die Züchtung von organotypischen Nervengewebekulturen bewährt hat, ist die von MURRAY und STOUT (1947) entwickelte Technik der Gewebezüchtung in der Maximov-Kammer. Diese Methode ist auch für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet worden.

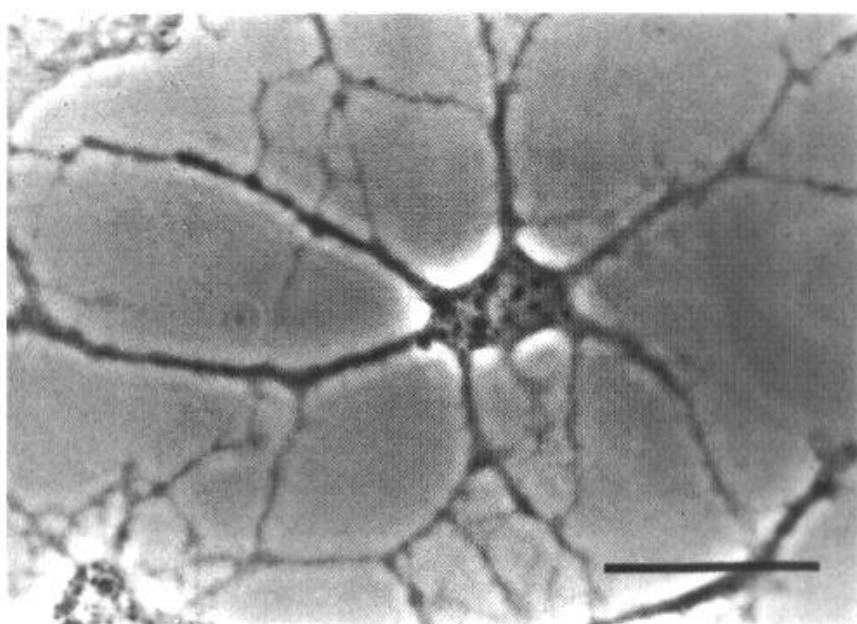
Das Gewebe zur Herstellung der Kulturen wurde aus dem lumbosakralen Anteil des Rückenmarks und aus dem unteren Hirnstamm von menschlichen Föten (7-18 Wochen in utero) sowie von neugeborenen Ratten entnommen. Die Explantate wurden auf Deckgläschen, welche mit Kollagen beschichtet waren, in der Maximov-Kammer bei 35° C gezüchtet (MURRAY 1966). Als Nährmedium wurden TC Minimum Eagle, Glutamin, fötales Kalbsserum, Rinderserum, Glukose und Antibiotika verwendet (HÖSLI und HÖSLI 1971, HÖSLI u. Mitarb. 1973 b).

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit Hilfe des Licht- und Elektronenmikroskops durchgeführt. Das Auswachsen der lebenden Kulturen wurde täglich mit einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet.

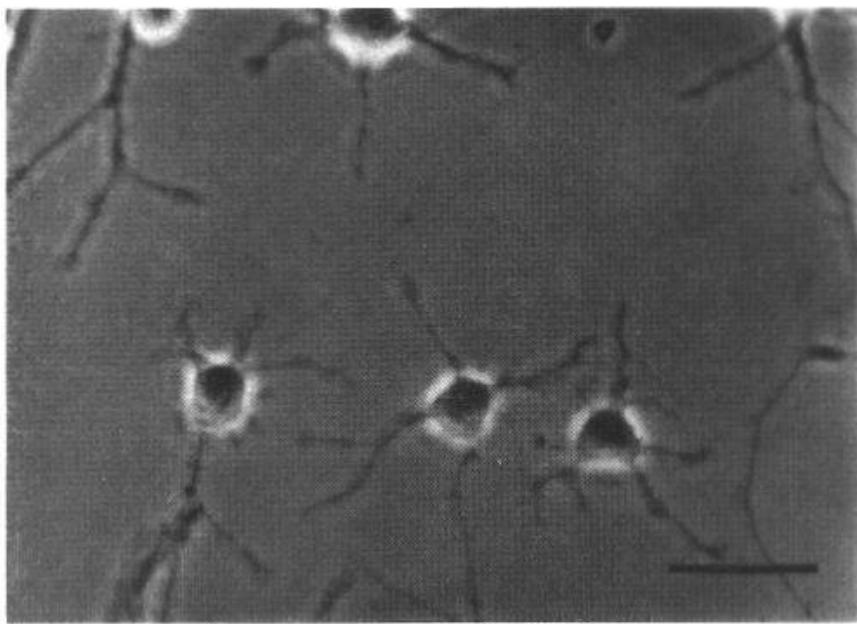
In der ersten Woche beobachtet man in vitro zuerst eine Auswanderung mesenchymatöser Zellen, wahrscheinlich pia-vaskulärer Herkunft. Diese Zellen, die eine diskus-spindelförmige Form haben und einen runden oder ovalen Kern mit mehreren Nucleoli enthalten, bilden die äusserste Randzone der Gewebekultur. Gleichzeitig oder etwas später wandern kleine, undifferenzierte, oligodendrozytenähnliche Zellen aus, welche jedoch nach einigen Tagen degenerieren. Der Zellkörper dieser Zellen, die meistens 3-4 Fortsätze aufweisen, ist im Phasenkontrastmikroskop von einem hellen Ring umgeben, der durch die Kugelform der Zellen bedingt ist (Abb. 1C). Die Astrozyten wandern nach 4-6 Tagen aus dem Explantat aus. Die Fortsätze dieser Astrozyten bilden zusammen mit den auswachsenden Neuriten ein dichtes Geflecht in der Auswachszone. Die ausgewanderten Gliazellen sind vorwiegend protoplasmatische Astrozyten von unterschiedlicher Form und Grösse des Zellkörpers und weisen oft mehrere, stark verzweigte Fortsätze auf (Abb. 1B). Der Kern dieser Zellen ist meistens oval, unregelmässig und enthält 2-3 Nucleoli. Im Gegensatz zu den Neuronen haben wir oft bei Astrozyten und undifferenzierten Gliazellen Zellteilungen beobachtet.



a



b



c

Abb. 1. Phasenkontrastaufnahme verschiedener Zelltypen in der Gewebekultur. – a) Nervenzelle, Rattenrückenmark, 22 Tage in vitro. – b) Astrozyt, Hirnstamm der Ratte, 13 Tage in vitro. – c) Gruppe von Oligodendrozyten, Zerebellum der Ratte, 13 Tage in vitro. – Maßstab: 30 μ m. – Höstl u. Mitarb. 1973e.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Astrozyten die Fähigkeit haben, eine Basalmembran zu bilden (WOLFF u. Mitarb. 1971), wie dies bei reifen Astrozyten *in vivo* beobachtet wurde.

Die Neurone, die erst nach 1–2 Wochen auswandern, bleiben in der Regel am Rande des Explantats liegen und nur wenige finden sich in der Auswachszone. Die Nervenzellen sind meistens erkennbar an ihrer Form und Kernstruktur sowie am Abgang der Dendriten (Abb. 1A). Der Zellkern weist eine deutliche Abgrenzung zum Zytoplasma auf und enthält meistens nur einen ausgeprägten Nucleolus. Nach Färbung mit Toluidinblau sind reichlich Nissl-Schollen erkennbar. Neurone, die nach Bodian gefärbt wurden, zeigen zahlreiche Neurofibrillen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Nervengewebekulturen der Ratte und des Menschen haben gezeigt, dass sich die meisten Synapsen am Rande des Explantats befinden (Abb. 2), während Neurone in der Peripherie der Auswachszone keine Synapsen aufweisen (WOLFF u. Mitarb., in Vorbereitung).

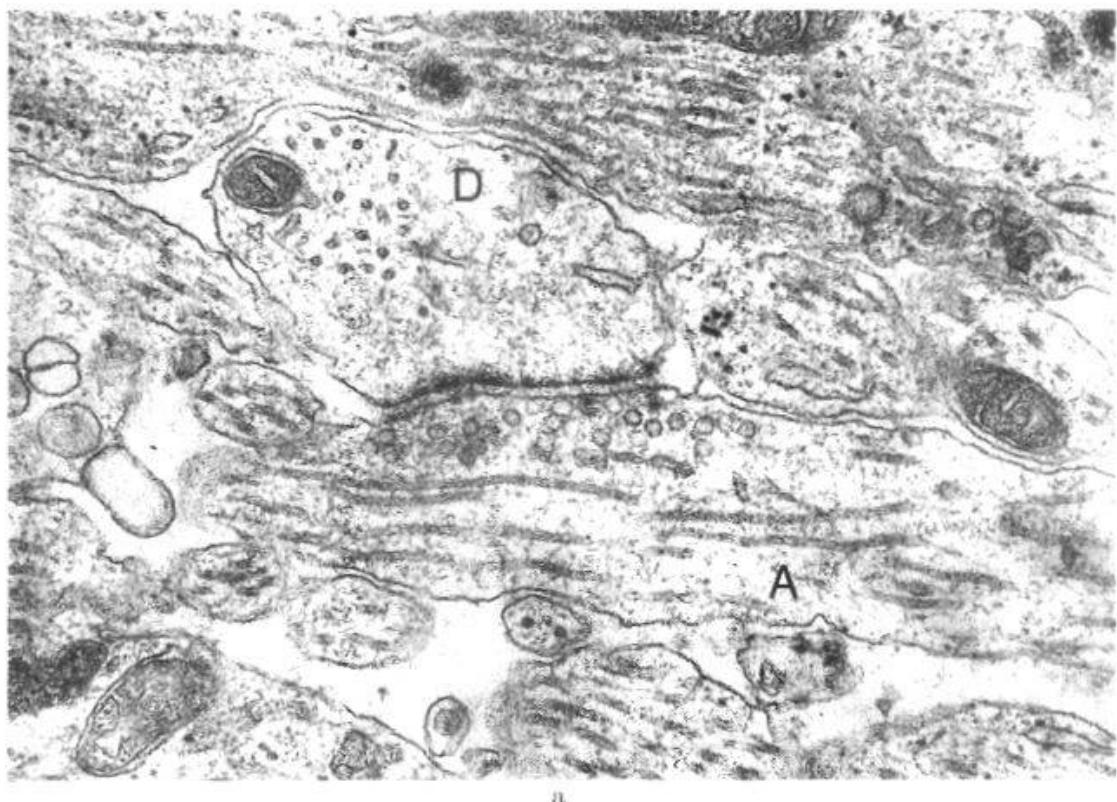
2. Histochemischer Nachweis der Azetylcholinesterase (AChE) in Rückenmarkkulturen der Ratte und des Menschen

Histochemische Untersuchungen im Rückenmark der Ratte und der Katze haben ergeben, dass AChE-haltige Neurone sowohl im Vorder- wie im Hinterhorn gefunden werden (KOELLE 1963, SILVER und WOLSTENCROFT 1970). Unsere Untersuchungen befassten sich mit der Fragestellung, ob spinale Neurone in der Gewebekultur ebenfalls AChE enthalten, wie Motoneurone *in situ*, und ob sich Unterschiede im AChE-Gehalt während verschiedener Entwicklungsstadien im menschlichen Rückenmark finden.

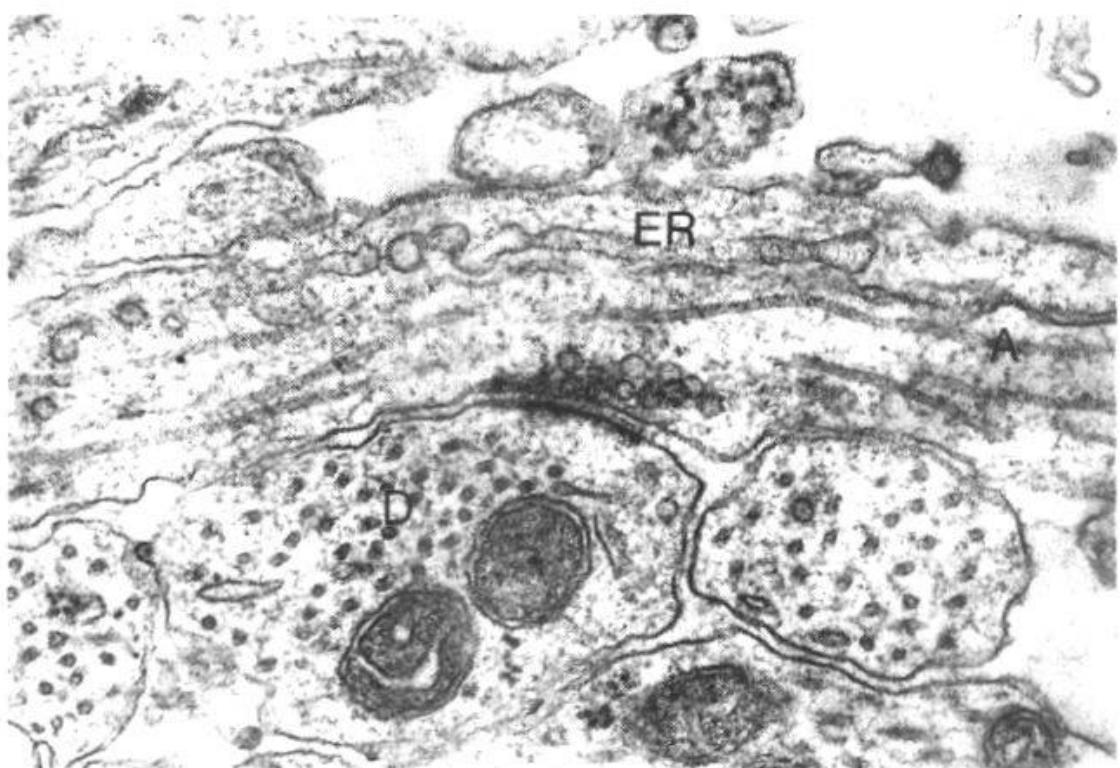
Zum Nachweis der AChE verwendeten wir die von EL BADAWI und SCHENK (1967) modifizierte Methode von KARNOVSKY und ROOTS (1964) (HÖSLI und HÖSLI 1970, 1971).

Die AChE konnte als braune Körner vor allem im Zellkörper sowie in zahlreichen Dendriten (Abb. 3A) von kultivierten Rückenmarkneuronen verschiedener Zellgrösse nachgewiesen werden. Die Axone waren meistens nur schwach gefärbt, und die Zellkerne enthielten keine AChE. Neurone, die in die Auswachszone ausgewandert waren, zeigten meistens einen geringeren Gehalt an AChE als Zellen, die im Explantat lagen. Oft wurden Gruppen von grossen AChE-haltigen Zellen beobachtet (Abb. 3B), was auf eine organotypische Organisation der Kulturen schliessen lässt. Vermutlich handelt es sich bei diesen Zellen um Motoneurone des Vorderhorns. Wie Untersuchungen von KOELLE (1963) am Rückenmark der Ratte *in situ* gezeigt haben, enthalten Motoneurone reichlich AChE. In Gliazellen wurde keine AChE, jedoch Pseudocholinesterase beobachtet.

Untersuchungen über den Nachweis der AChE wurden auch in Rückenmarkkulturen und -schnitten von menschlichen Föten verschiedenen Alters (7–18 Wochen *in utero*) durchgeführt. Wir konnten beobachten, dass Rückenmarkneurone von jungen Föten (7–8 Wochen *in utero*) nur wenig

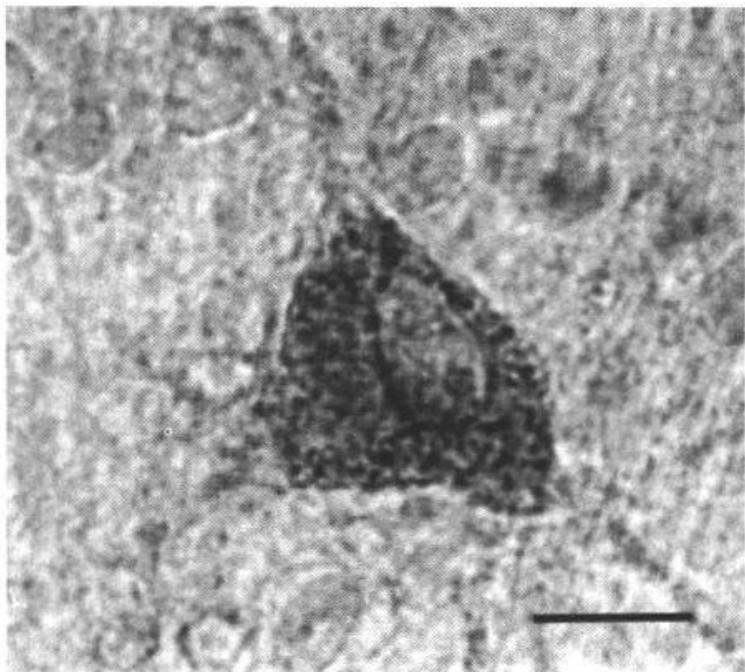


a

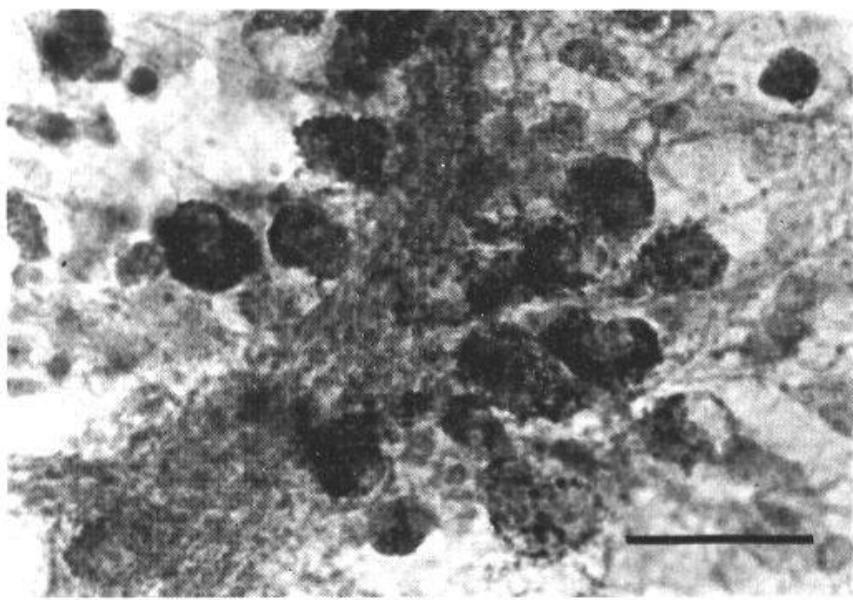


b

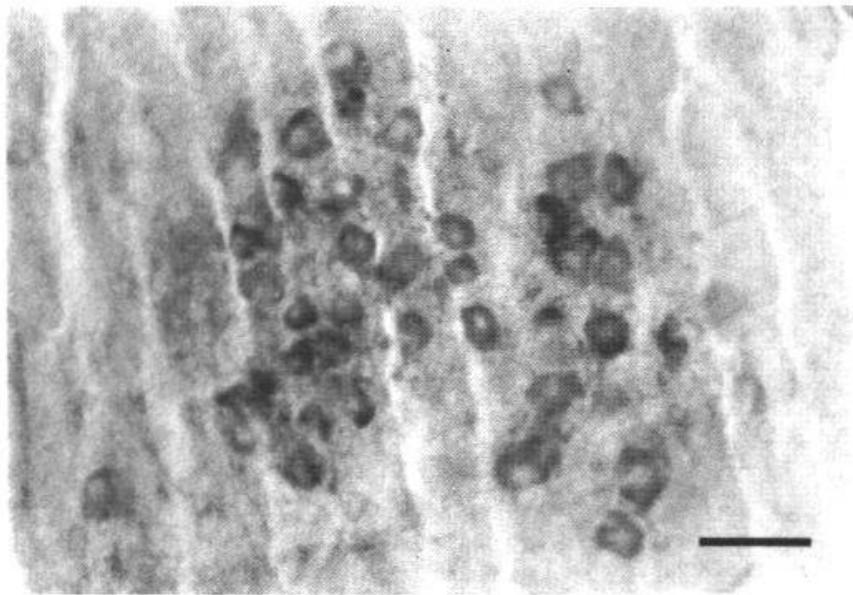
Abb. 2. – a) Axodendritische Synapse in der Auswachszone einer Rückenmarkkultur des Menschen (Fötus 17 Wochen in utero, 12 Tage in vitro). Vergrösserung: 72 000×. – b) Hirnstammkultur eines menschlichen Fötus (17 Wochen in utero, 12 Tage in vitro). Axodendritische Synapse in der Auswachszone. Vergrösserung: 75 000×. – A = Axon. D = Dendrit, ER = endoplasmatisches Retikulum. – WOLFF, HÖSLI und HÖSLI, unpublizierte Ergebnisse.



a



b



c

Abb. 3. Histochemischer Nachweis der Azetylcholinesterase. – a) Rückenmarkneurone, Ratte, 14 Tage in vitro. Masstab: 20 μ m. – b) Gruppe von azetylcholinesterasehaltigen Neuronen in einer Rückenmarkkultur, Ratte, 22 in vitro. Masstab: 50 μ m. – HöSLI u. Mitarb. 1973e. – c) Azetylcholinesterase in Neuronen in einem Schnitt eines menschlichen Rückenmarks (Fötus 18 Wochen in utero). Masstab: 30 μ m.

AChE aufwiesen, während Nervenzellen von älteren Föten (12–18 Wochen in utero) einen hohen AChE-Gehalt zeigten (DUCKETT und PEARSE 1969, HÖSLI u. Mitarb. 1973 d). Abb. 3 C zeigt stark AChE-haltige Neurone aus einem Rückenmarkschnitt eines 18 Wochen alten Fötus.

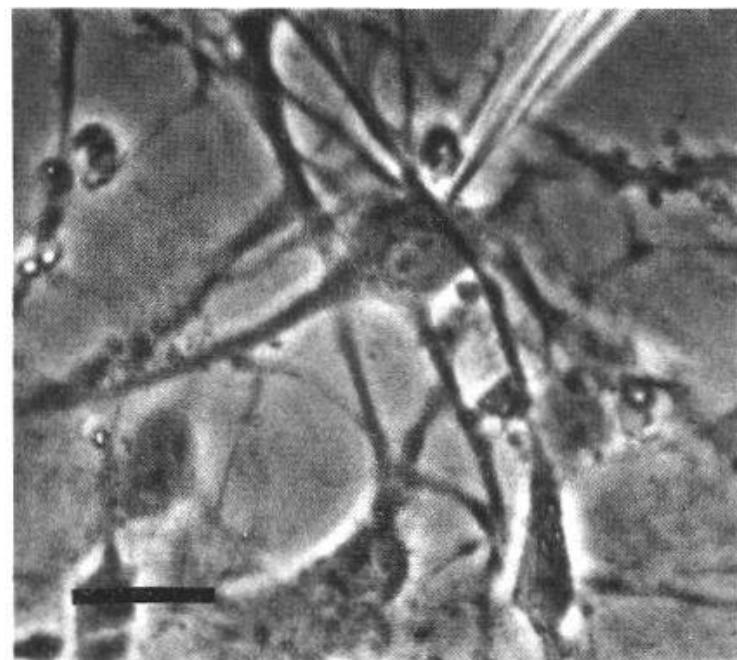
Die Beobachtung, dass der Gehalt an AChE grösser ist in Neuronen von Rückenmarkkulturen und -schnitten von älteren als von jüngeren Föten stimmt mit biochemischen Untersuchungen von YOUNGSTROM (1941) überein, die gezeigt haben, dass der AChE-Gehalt im menschlichen Rückenmark *in situ* zwischen 8–17 Wochen in utero stark ansteigt. Untersuchungen von WINDLE und FITZGERALD (1937) weisen ferner darauf hin, dass der Reflexbogen im Rückenmark des menschlichen Fötus schon nach 8 Wochen in utero funktionsfähig ist. Aus diesen Befunden geht hervor, dass eine gewisse Korrelation zwischen AChE-Gehalt und der Entwicklung der Rückenmarkreflexe besteht.

3. Die Wirkung von Überträgerstoffen auf Rückenmarkneurone in der Gewebekultur

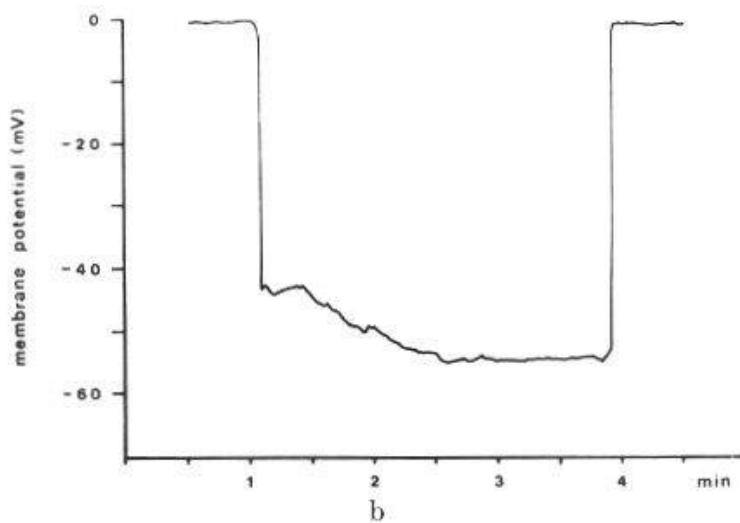
Aus verschiedenen biochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen geht hervor, dass den beiden Aminosäuren Glyzin und Glutamat die Funktion von Überträgersubstanzen im Rückenmark zukommt. Glyzin ist in relativ hoher Konzentration im Rückenmark nachgewiesen worden; die Glyzinkonzentration war höher in der grauen als in der weissen Substanz, mit höchsten Werten im Vorderhorn (APRISON und WERMAN 1965). Im Gegensatz dazu wurden die höchsten Konzentrationen von Glutamat im Spinalganglion und im dorsalen Anteil des Rückenmarks gefunden (DUGGAN und JOHNSTON 1970). Ferner wurde ein wirksamer Aufnahmemechanismus («high affinity uptake system») für Glyzin wie auch für Glutamat in Homogenaten von Nervenendigungen sowie in Schnittchen des Rückenmarks nachgewiesen (SNYDER u. Mitarb. 1970; HAMMERSCHLAG und WEINREICH 1972, LOGAN und SNYDER 1972). Dies ist von besonderer Bedeutung, da «Wiederaufnahme» («re-uptake») wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung von gewissen Überträgersubstanzen darstellt (IVERSEN 1967, IVERSEN und NEAL 1968).

Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Glutamat spinale Neurone aktiviert und depolarisiert (CURTIS u. Mitarb. 1972), während Glyzin zu einer Hemmung und Hyperpolarisation von Rückenmarkneuronen führt (CURTIS u. Mitarb. 1968, WERMAN u. Mitarb. 1968). Die durch Glyzin erzeugte Hemmung ist, wie die natürliche postsynaptische Hemmung, in reversibler Weise durch das Konvulsivum Strychnin blockiert (CURTIS u. Mitarb. 1968).

Die Wirkung der vermutlichen Transmitter Glyzin und Glutamat auf das Membranpotential von Rückenmarkneuronen in der Gewebekultur wurde mit Hilfe von intrazellulären Mikroelektrodenableitungen untersucht (HÖSLI u. Mitarb. 1971, 1973 c).



a



b

Abb. 4. – a) Phasenkontrastaufnahme einer Nervenzelle in einer Gewebekultur von menschlichem Rückenmark (Fötus 18 Wochen in utero, Kultur 28 Tage *in vitro*). Die Spitze der Mikroelektrode berührt die Zellmembran. Maßstab: 30 μ m. – b) Ruhepotential abgeleitet mit einer Mikroelektrode von einer Nervenzelle aus einer menschlichen Rückenmarkkultur. – HÖSLI u. Mitarb. 1973b.

Die Mikroelektroden wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators unter direkter mikroskopischer Kontrolle (Phasenkontrastmikroskopie) in die Nervenzellen eingestochen (Abb. 4A; Einzelheiten über Versuchsmethoden siehe HÖSLI u. Mitarb. 1971, 1972).

Da die Technik der Nervengewebekultur die Möglichkeit bietet, die Ionenzusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit zu verändern, wurden zudem Versuche über ionale Mechanismen, welche der durch die Aminosäuren erzeugten Depolarisation bzw. Hyperpolarisation zugrunde liegen, durchgeführt. Die intrazellulären Ableitungen von Rückenmarkneuronen in der Gewebekultur waren mit grossen technischen Schwierigkeiten ver-

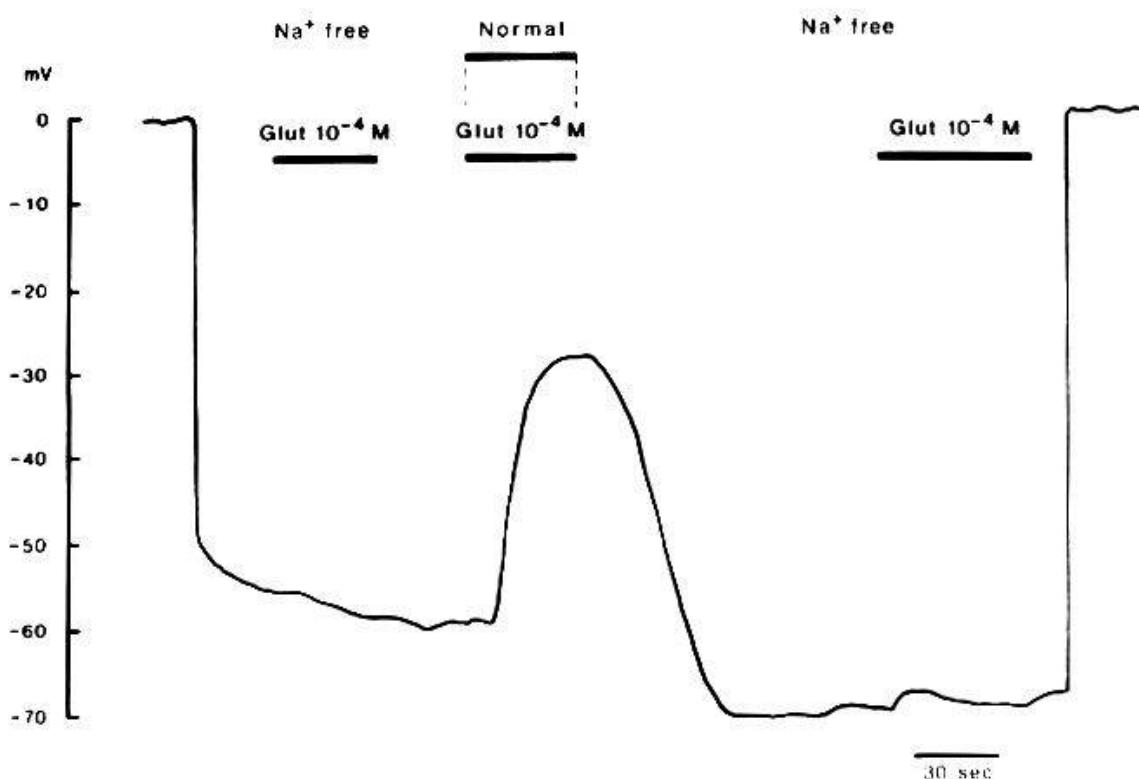


Abb. 5. Die Wirkung von Glutamat (Glut. 10^{-4} M) auf das Membranpotential eines menschlichen Rückenmarkneurons in der Gewebekultur in Na^+ -freier (Na^+ -free) und normaler (Na^+ 137 mM) extrazellulärer Flüssigkeit. – Ordinate: Membranpotential in Millivolt (mV); Abszisse: Zeit in Sekunden (Balken: 30 sec). – HÖSLI u. Mitarb. 1973a.

bunden. Bei der Mehrzahl der Zellen konnte nur während einigen Sekunden nach Einstich der Mikroelektrode das Ruhepotential abgeleitet werden, dann erfolgte meistens ein rascher Abfall des Membranpotentials, oft begleitet von morphologischen Veränderungen der untersuchten Zelle. Trotz dieser Schwierigkeiten war es möglich, von einer geringen Zahl von Neuronen stabile Ruhepotentiale während einiger Minuten abzuleiten (Abb. 4B).

Glyzin und Glutamat wurden mit Hilfe von feinen Glasmikropipetten mikroelektrophoretisch in die unmittelbare Umgebung der Nervenzellmembran verabreicht oder in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-6} M der extrazellulären Flüssigkeit beigefügt (HÖSLI u. Mitarb. 1973 a,c,d). Es wurde beobachtet, dass Glyzin zu einer Membranhyperpolarisation (HÖSLI u. Mitarb. 1971) führt, während Glutamat eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt (Abb. 5, HÖSLI u. Mitarb. 1973 a, c). Eine ähnliche Wirkung dieser Aminosäuren wurde an Motoneuronen im Rückenmark der Katze *in situ* beobachtet (WERMAN u. Mitarb. 1968, CURTIS u. Mitarb. 1968, 1972). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Rückenmarkneurone in der Gewebekultur ähnliche Aminosäurenrezeptoren besitzen wie Motoneurone *in situ*. Mikroelektrodenversuche an kultivierten Rückenmarkneuronen von menschlichen Föten haben gezeigt, dass Glyzin und Glutamat auch eine ähnliche Wirkung an menschlichen Neuronen haben (HÖSLI u. Mitarb. 1973 d).

Um die ionalen Mechanismen, die der Glyzinhyperpolarisation bzw. der Glutamatdepolarisation zugrunde liegen, näher abzuklären, wurde die

Ionenkonzentration (Cl^- , Na^+) der extrazellulären Flüssigkeit verändert. ECCLES u. Mitarb. (1964) haben gezeigt, dass die hemmende Überträgersubstanz die Durchlässigkeit für Chlor- und Kaliumionen erhöht, während die Depolarisation an erregenden Synapsen wahrscheinlich auf einem erhöhten Einstrom von Natriumionen beruht.

Eine Herabsetzung der Chlorionenkonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit führt zu einer Umkehr der Glyzinhypopolarisation in eine Depolarisation, was darauf hinweist, dass Glyzin die Chlorionenpermeabilität erhöht, wie dies ECCLES (1964) auch für die natürliche hemmende Überträgersubstanz postulierte.

Eine Entfernung der Natriumionen aus der extrazellulären Flüssigkeit führte zum Verschwinden der Glutamatdepolarisation (Abb. 5, HÖSLI u. Mitarb. 1973 a, c) was wiederum darauf hinweist, dass die durch Glutamat erzeugte Depolarisation auf einem erhöhten Einstrom von Natriumionen ins Zellinnere beruht. Diese Versuche zeigen, dass die Nervengewebekultur ein geeignetes Modell ist zur Abklärung von ionalen Mechanismen, welche der Wirkung von Überträgersubstanzen im Zentralnervensystem zugrunde liegen.

4. Autoradiographische Untersuchungen über die Wiederaufnahme von Aminosäuren

Aus verschiedenen experimentellen Befunden geht hervor, dass Aminosäuren-Transmitter wahrscheinlich durch Wiederaufnahme («re-uptake») inaktiviert werden (IVERSEN und NEAL 1968, JOHNSTON und IVERSEN 1971). Obwohl zahlreiche Untersuchungen an Hirnschnitten gezeigt haben, dass Glyzin und Glutamat aktiv in Nervengewebe aufgenommen werden (SNYDER u. Mitarb. 1970), ist nur wenig bekannt über die zelluläre Verteilung der aufgenommenen Aminosäuren (HAMMERSCHLAG und WEINREICH 1972, HÖKFELT und LJUNDAHL 1972). Die Nervengewebekultur ist ein geeignetes Modell, an dem mit Hilfe der Autoradiographie die zelluläre Lokalisation der Aufnahme von markierten Überträgersubstanzen untersucht werden kann (HÖSLI und HÖSLI 1972, HÖSLI u. Mitarb. 1972, 1973 c, d).

Für die autoradiographischen Untersuchungen wurden die Kulturen während 2–15 min in einer Hank's Lösung, welche ^3H -Glyzin (New England Nuclear Corp., spezifische Aktivität 4,7 Ci/mM) oder L- ^3H -Glutaminsäure (New England Nuclear Corp., spezifische Aktivität 20,4 Ci/mM) in Konzentrationen von 5×10^{-7} — 5×10^{-6} M enthielt, inkubiert, fixiert, entwässert und mit Ilford-Emulsion L4 überzogen (Einzelheiten über Versuchsmethoden siehe HÖSLI und HÖSLI, 1972; HÖSLI et al. 1972). Die Autoradiogramme wurden mit einem Wild-Epi-Illuminations-Mikroskop beobachtet.

Radioaktives Glyzin und Glutamat sowie auch γ -Aminobuttersäure (GABA) wurden von einer grossen Zahl von Neuronen, vor allem aber auch von zahlreichen Gliazellen in Rückenmark- und Hirnstammkulturen des Menschen und der Ratte aufgenommen (HÖSLI und HÖSLI 1972, HÖSLI u. Mitarb. 1972, 1973 c, d, e). Die Silberkörner fanden sich im Soma und in den

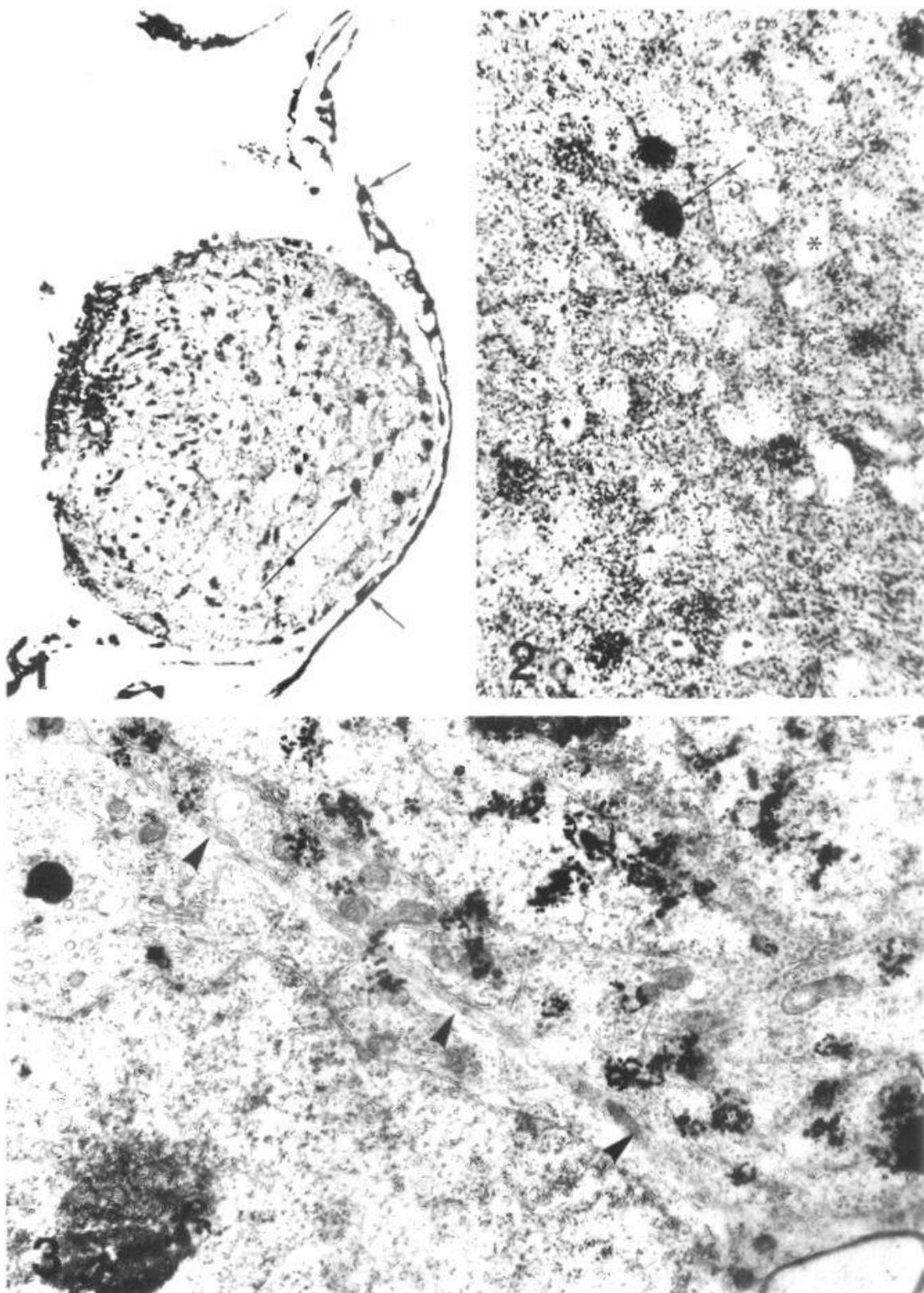


Abb. 6. Autoradiogramme von Rückenmarkkulturen (Ratte, 26 Tage *in vitro*). – 1,2: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Inkubation mit $(^3\text{H})\text{-GABA}$, 10^{-6}M , während 5 min. – 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier verschiedener Neurone (Inkubation mit $(^3\text{H})\text{-Glyzin}$, $5 \times 10^{-6}\text{M}$, während 15 min.) Die Zellgrenzen der Neuronen sind durch Pfeile markiert. Die obere Zelle zeigt eine starke Anhäufung von Silberkörnern, während die untere Zelle kaum markiertes Glyzin aufweist. – Vergrösserung 1: 160, 2:640, 3:17 000. – HÖSLI u. Mitarb. 1972.

Fortsätzen der Zellen angereichert. Abb. 6 (1,2) zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen einer Rückenmarkkultur nach Inkubation mit (^3H)-GABA (10^{-6}M , 5 min). Gewisse Neurone zeigen eine starke Anhäufung der Aminosäure (Pfeil), während andere (*) nur wenig oder keine Silberkörner aufweisen. Die Beobachtung, dass nur gewisse Neurone die Aminosäuren aufnehmen, konnte auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Abb. 6 (3) zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von 2 Neuronen aus einer Rückenmarkkultur nach Inkubation mit ^3H -Glyzin ($5 \times 10^{-6}\text{M}$, 15 min). Während die obere Zelle eine starke Anhäufung von markiertem Glyzin aufweist, finden sich in der unteren Zelle keine Silberkörner.

Die Beobachtung, dass Gliazellen auch eine starke Anreicherung von Aminosäuren aufweisen, lässt vermuten, dass die Gliazellen ebenfalls an der Inaktivierung von vermutlichen Überträgersubstanzen beteiligt sein könnten (HÖKFELT und LJUNDAHL 1972, HÖSLI und HÖSLI 1972, HÖSLI u. Mitarb. 1972, 1973 c, d, e).

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass Nervengewebe, welches in der Gewebekultur gezüchtet wurde, ähnliche histochemische, elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften aufweist wie Nervengewebe *in situ*. Die Nervengewebekultur ist ein geeignetes Modell, an welchem unter direkter mikroskopischer Kontrolle zahlreiche physiologische und pharmakologische Untersuchungen auf der Stufe der Einzelzelle durchgeführt werden können. Auf diese Weise ist es möglich, die bioelektrischen Vorgänge gleichzeitig mit morphologischen Beobachtungen zu korrelieren. Ein weiterer Vorteil dieser Technik liegt in der Möglichkeit, die Ionenkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit zu verändern, um auf diese Weise die ionalen Mechanismen, die den synaptischen Übertragungsvorgängen zugrunde liegen, näher abzuklären.

Zusammenfassung

Histochemische und elektrophysiologische Untersuchungen wurden an Gewebekulturen des Rückenmarks und Hirnstamms des Menschen und der Ratte durchgeführt. Untersuchungen über den Nachweis von Azetylcholinesterase (AChE) an Rückenmarkkulturen und -schnitten von menschlichen Fötten verschiedenen Alters haben ergeben, dass Rückenmarkneurone von jungen Fötten (7–8 Wochen *in utero*) eine beträchtlich geringere Menge von AChE aufweisen als Nervenzellen von älteren Fötten (12–18 Wochen *in utero*). Aus unseren histochemischen Befunden und aus Untersuchungen von WINDLE und FITZGERALD 1937) über den Reflexbogen im Rückenmark des menschlichen Fötus geht hervor, dass eine gewisse Korrelation zwischen dem AChE-Gehalt und der Entwicklung des Rückenmarkreflexe besteht. Mikroelektrodenversuche über die Wirkung der vermutlichen Überträgersubstanzen Glyzin und Glutamat auf das Membranpotential von kultivierten Rückenmarkneuronen haben gezeigt, dass Glyzin zu einer Membranhyper-

polarisation führt, während Glutamat eine Depolarisation der Nervenzellmembran bewirkt. Die durch Glutamat erzeugte Depolarisation beruht auf einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran für Natriumionen. Radioaktives Glyzin und Glutamat wurden aktiv in kultivierte Neurone und Gliazellen aufgenommen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Wiederaufnahme («re-uptake») wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung von Aminosäure-Transmittern darstellt.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass Nervengewebe, welches in der Gewebekultur gezüchtet wurde, ähnliche histochemische, elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften aufweist wie Nervengewebe *in situ*. Die Nervengewebekultur stellt ein geeignetes Modell dar, an welchem grundlegende Mechanismen der synaptischen Übertragung im Zentralnervensystem näher abgeklärt werden können, wie z. B. ionale Mechanismen, welche der Transmitterwirkung zugrunde liegen, oder die zelluläre Lokalisation der Aufnahme von Überträgersubstanzen in Hirngewebe.

Résumé

Des cultures de tissus prélevés sur la moelle et la région bulbaire chez l'homme et chez le rat ont été soumises à des examens histochimiques et électrophysiologiques. Les recherches sur la présence d'acétylcholinestérase (AChE) dans les cultures et les coupes de moelle épinière de fœtus humains à différents stades de développement ont montré que les neurones de la moelle de fœtus jeune (7-8e semaine *in utero*) contiennent une quantité nettement plus faible d'AChE que les cellules nerveuses de fœtus plus âgés (12-18e semaine *in utero*). Ces résultats histochimiques ainsi que les observations de WINDLE et FITZGERALD (1937) sur l'arc réflexe dans la moelle épinière du fœtus humain ont démontré qu'il existe une certaine corrélation entre la teneur en AChE et le développement de l'arc réflexe médullaire.

Les essais qui ont été faits avec des microélectrodes pour démontrer l'action de la glycine et du glutamate, substances qu'on suppose être des transmetteurs sur le potentiel de la membrane de neurones médullaires en culture ont montré que la glycine mène à une hyperpolarisation de la membrane, tandis que le glutamate provoque une dépolarisation de la membrane de la cellule nerveuse. Cette dépolarisation induite par le glutamate est due à une perméabilité accrue de la membrane cellulaire aux ions de sodium. De la glycine et du glutamate radioactifs ont été résorbés par des neurones et des cellules gliales en culture. Ce fait a une grande importance, car cette résorption (uptake) est probablement un élément vital dans le mécanisme de l'inactivation d'un transmetteur d'acide aminé.

Nos recherches ont montré que du tissu nerveux en culture a les mêmes propriétés histochimiques, électrophysiologiques et pharmacologiques que du tissu nerveux *in situ*. La culture tissulaire de cellules nerveuses présente ainsi un modèle adéquat pour permettre d'étudier les mécanismes principaux de transfert dans les synapses du système nerveux central, comme

p. ex. les mécanismes ioniques, qui sont à la base de l'action des transmetteurs, ou encore la localisation cellulaire de la résorption des substances transférées dans le tissu cérébral.

Riassunto

Esami istochimici ed elettrofisiologici sono stati fatti in culture di midollo spinale e di istmi encefalici umani e del ratto. Studi rivolti a dimostrare la presenza di acetilcolinesterasi (AChE) in culture e sezioni di midollo spinale di feti umani di età diversa hanno rivelato che i neuroni spinali di feti giovani (7-8 settimane in utero) posseggono una quantità nettamente inferiore di AChE per rapporto a cellule nervose di feti più anziani (12-18 settimane in utero). I nostri esami istochimici, così come gli studi di WINDLE e FITZGERALD (1937) sull'arco riflesso del midollo spinale del feto umano, dimostrano che esiste una certa correlazione tra il contenuto di AChE e lo sviluppo dei riflessi spinali. Gli esperimenti utilizzanti microelettrodi nello studio dell'azione delle presunte sostanze di trasmissione glicina e glutamato sul potenziale della membrana di neuroni spinali coltivati hanno dimostrato che la glicina provoca una iperpolarizzazione, mentre il glutamato provoca una depolarizzazione della membrana della cellula nervosa. La depolarizzazione provocata dal glutamato è dovuta ad un aumento di permeabilità della membrana cellulare per gli ioni di sodio.

Glicina e glutamato radioattivi furono assorbiti attivamente in neuroni e cellule gliali coltivati. Questo fatto ha un'importanza particolare, poiché il riassorbimento («re-uptake») rappresenta probabilmente un importante meccanismo nell'inattivazione di trasmettitori di aminoacidi. I nostri studi dimostrano che il tessuto nervoso allevato in cultura ha proprietà istochimiche, elettrofisiologiche e farmacologiche simili a quelle del tessuto nervoso *in situ*. La cultura di tessuti nervosi rappresenta un modello appropriato per lo studio dei meccanismi fondamentali della trasmissione sinattica nel sistema nervoso centrale, come ad esempio i meccanismi ionali che stanno alla base dell'azione trasmettitrice, oppure la localizzazione cellulare dell'assorbimento di sostanze trasmetttrici nel tessuto cerebrale.

Summary

A study was made of histochemical and electrophysiological properties of cultured human and rat spinal cord and brain stem.

Histochemical studies on the acetylcholinesterase (AChE) activity in human spinal cord showed that neurones in cultures and sections prepared from older fetuses (12-18 weeks in utero) had a considerably higher AChE content than spinal neurones from younger fetuses (7-8 weeks in utero) suggesting that there is a correlation between AChE content and functional development.

Microelectrode studies have demonstrated that glycine hyperpolarizes and glutamate depolarizes human and rat spinal neurones in tissue culture.

The depolarization by glutamate is mainly dependent on an increased sodium permeability of the neuronal membrane. These findings show that the technique of tissue culture is a good model to study ionic mechanisms underlying transmitter actions on neurones of the mammalian central nervous system.

Autoradiographic investigations revealed that ^3H -glycine and L- ^3H -glutamic acid are taken up in neurones and glial cells of cultures of fetal human and rat spinal cord and brain stem indicating that the technique of tissue culture also provides a good model to study the cellular localization of the uptake of putative neurotransmitters into mammalian central nervous tissue.

Frau ELISABETH HÖSLI und Herrn P. F. ANDRÈS bin ich für ihre Mitarbeit bei den obenerwähnten Untersuchungen zu grossem Dank verpflichtet. Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. J. R. WOLFF, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder (Abb. 2) sowie Fr. D. POMS für das Schreiben des Manuskriptes bestens danken.

- Akert K.: Struktur und Ultrastruktur von Nervenzellen und Synapsen. *Klin. Wschr.* **49**, 509 (1971).
- Aprison M. H. und Werman R.: The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci.* **4**, 2075 (1965).
- Curtis D. R.: The identification of mammalian inhibitory transmitters. In: «Nervous Inhibitions» (Ed. E. Florey) p. 342. Pergamon Press, New York 1961.
- Curtis D. R.: Microelectrophoresis, in: *Physical Techniques in Biological Research* (Ed. W. Nastuk), p. 144. Academic Press, New York/London 1964.
- Curtis D. R., Duggan A. W., Felix D., Johnston G. A. R., Tebécis A. K. und Watkins J. C.: Excitation of mammalian central neurones by acidic amino acids. *Brain Res.* **41**, 283 (1972).
- Curtis D. R., Hösli L., Johnston G. A. R. und Johnston I. H.: The hyperpolarization of spinal motoneurones by glycine and related amino acids. *Exp. Brain Res.* **5**, 235 (1968).
- De Robertis E.: Adrenergic endings and vesicles isolated from brain. *Pharmacol. Rev.* **18**, 413 (1966).
- De Robertis E.: Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region: the macromolecular components involved in nerve transmission are being studied. *Science* **156**, 907 (1967).
- Duckett S. und Pearse A. G. E.: Histoenzymology of the developing human spinal cord. *Anat. Rec.* **163**, 59 (1969).
- Duggan A. W. und Johnston G. A. R.: Glutamate and related amino acids in cat spinal roots, dorsal root ganglia and peripheral nerves. *J. Neurochem.* **17**, 1205 (1970).
- Eccles J. C.: *The Physiology of Synapses*, Springer-Verlag, Berlin 1964.
- El-Badawi A. und Schenk E. A.: Histochemical methods for separate, consecutive and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephrine in cryostat sections. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 580 (1967).
- Fuxe K., Dahlström A. und Hillarp N. A.: Central monoamine neurons und monoamine neuro-transmission. *Proc. XXIIIrd int. Congr. physiol. Sciences*, Tokyo, Excerpta med. int. Congr. Series **87**, 419 (1965).
- Hammerschlag R. und Weinreich D.: Glutamic acid and primary afferent transmission. *Advanc. in biochem. Psychopharmacol.* **6**, 165 (1972).
- Harrison R. G.: Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* **1**, 116 (1907).

- Hillarp N. A., Fuxe K. und Dahlström A.: Central monoamine neurons, in: *Mechanisms of Release of Biogenic Amines* (Ed. U. S. von Euler, S. Rosell, B. Uvnäs), p. 31. Pergamon Press, New York 1966.
- Hökfelt T. und Ljungdahl Å.: Application of cytochemical techniques to the study of suspected transmitter substances in the nervous system. *Advanc. in biochem. Psychopharmacol.* 6, 1 (1972).
- Hösli E. und Hösli L.: The presence of acetylcholinesterase in cultures of cerebellum and brain stem. *Brain Res.* 19, 494 (1970).
- Hösli E. und Hösli L.: Acetylcholinesterase in cultured rat spinal cord. *Brain Res.* 30, 193 (1971).
- Hösli E., Ljungdahl Å., Hökfelt T. und Hösli L.: Spinal cord tissue cultures – a model for autoradiographic studies on uptake of putative neurotransmitters such as glycine and GABA. *Experientia (Basel)* 28, 1342 (1972).
- Hösli L., Andrès P. F. und Hösli E.: Effects of glycine on spinal neurones grown in tissue culture. *Brain Res.* 34, 399 (1971).
- Hösli L., Andrès P. F. und Hösli E.: Effects of potassium on the membrane potential of spinal neurones in tissue culture. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 333, 362 (1972).
- Hösli L., Andrès P. F. und Hösli E.: Ionic mechanisms underlying the depolarization of L-glutamate on rat and human spinal neurones in tissue culture. *Experientia (Basel)* 29, 1244–1247 (1973a).
- Hösli L. und Hösli E.: Autoradiographic localization of the uptake of glycine in cultures of rat medulla oblongata. *Brain Res.* 45, 612 (1972).
- Hösli L., Hösli E. und Andrès P. F.: Light microscopic and electrophysiological studies of cultured human central nervous tissue. *Europ. Neurol.* 9, 121 (1973b).
- Hösli L., Hösli E. und Andrès P. F.: Nervous tissue cultures – a model to study action and uptake of putative neurotransmitters such as amino acids. Symposium on «Dynamic Aspects of the Synapse», Boldern, Zürich. *Brain Res.* 62, 597–602 (1973c).
- Hösli L., Hösli E. und Andrès P. F.: Electrophysiological and histochemical properties of fetal human spinal cord in tissue culture. Wenner-Gren Center int. Symposium on «Dynamics of Degeneration and Growth in Neurons», Stockholm (1973d, im Druck).
- Hösli L., Hösli E., Andrès P. F. und Meier-Ruge W.: Histochemische, elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen an Nervengewebeskulturen, in: *In-vitro-Systeme und ihre Anwendung zur Substanztestung* (Ed. J. Merker). Verlag Freie Universität, Berlin 1973e.
- Iversen L. L.: *The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves*. Cambridge University Press, Cambridge 1967.
- Iversen L. L. und Neal M. J.: The uptake of (3 H) GABA by slices of rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 15, 1141 (1968).
- Johnston G. A. R. und Iversen L. L.: Glycine uptake in rat central nervous system slices and homogenates: Evidence for different uptake systems in spinal cord and cerebral cortex. *J. Neurochem.* 18, 1951 (1971).
- Karnovsky M. J. und Roots L.: A «direct-coloring» thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219 (1964).
- Koelle G. B.: The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J. comp. Neurol.* 100, 211 (1954).
- Koelle G. B.: Cytological distributions and physiological functions of cholinesterases, in: *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* (Ed. O. Eichler und A. Farah) Vol. 15, p. 187. Springer-Verlag, Berlin 1963.
- Logan E. J. und Snyder S. H.: High affinity uptake system for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissue. *Brain Res.* 42, 413 (1972).
- Murray M. R.: Nervous tissues in vitro, in: *Cells and Tissues in Culture*, Vol. 2 (Ed. E. N. Willmer), p. 373. Academic Press, New York 1965.
- Murray M. R.: Nervous tissue isolated in culture, in: *Metabolic Turnover in the Nervous System. Handbook of Neurochem.* Vol. 5, part. A, (Ed. A. Lajtha), p. 373. Plenum Press, New York 1971.

- Murray M. R. und Stout A. P.: Adult human sympathetic ganglion cells cultivated in vitro. *Amer. J. Anat.* 80, 225 (1947).
- Peterson E. R., Crain S. M. und Murray M. R.: Differentiation and prolonged maintenance of bioelectrically active spinal cord cultures (rat, chick and human). *Z. Zellforsch.* 66, 130 (1965).
- Sherrington C. S.: The central nervous system, Vol. 3, in: *A Text Book of Physiology*, 7th ed. (Ed. M. Forster) Macmillan, London 1897.
- Silver A. and Wolstencroft J. H.: Cholinesterase and choline acetylase in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 210, 92P (1970).
- Snyder S. H., Kuhar M. J., Green A. I., Coyle J. T. und Shaskan E. G.: Uptake and subcellular localization of neurotransmitters in the brain. *The Int. Rev. Neurobiol.* 13, 127 (1970).
- Werman R., Davidoff R. A. und Aprison M. H.: Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 31, 81 (1968).
- Whittaker V. P.: Investigations on the storage sites of biogenic amines in the central nervous system, in: *Biogenic Amines, Progress in Brain Research* (Ed. H. Himwich an W. Himwich), Vol. 8, p. 90, Elsevier, New York 1964.
- Whittaker V. P.: The subcellular distribution of amino acids in brain and its relation to a possible transmitter function for these compounds, in: *Wenner-Gren Center int. Sympos. Ser. Vol. 10: Structure and Function of Inhibitory Neuronal Mechanisms* (Ed. C. Von Euler, S. Skoglund, U. Söderberg), p. 487. Pergamon Press, New York 1968.
- Windle W. F. und Fitzgerald J. E.: Development of the spinal reflex mechanism in human embryos. *J. comp. Neurol.* 67, 493 (1937).
- Wolff J. R., Hösli E. and Hösli L.: Basement membrane material and glial cells in spinal cord cultures of newborn rats. *Brain Res.* 32, 198 (1971).
- Wolff J. R., Hösli E. und Hösli L.: in Vorbereitung.
- Youngstrom K. A.: Acetylcholine esterase concentration during the development of the human fetus. *J. Neurophysiol.* 4, 473 (1941).

Adresse des Autors: Prof. Dr. L. Hösli, Abteilung für Neurophysiologie, Neurologische Universitätsklinik Basel, Socinstrasse 55, CH-4051 Basel.