



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München**

Berichterstatter            Priv. Doz. Dr. Franz Worek.....  
.....

Mitberichterstatter        Prof. Dr. Winfried Lange .....  
                                  Prof. Dr. Michael Meyer .....

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter Dr. Michael Mörschel.....  
.....

Dekan                         Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen  
Prüfung                     23.09.2010 .....

*Zukunftsforschung ist Kratzen, bevor es einen juckt*

Peter Sellers

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gudermann danke ich für die Befürwortung meiner Arbeit sowie für die bereitwillige Übernahme des Gutachtens.

Ich bedanke mich bei Herrn PD. Dr. Thiermann für die Möglichkeit unter den hervorragenden Bedingungen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie arbeiten zu dürfen.

Ich möchte Herrn Dr. Mörschel für die Entscheidung mich in seiner Arbeitsgruppe zu beschäftigen danken. Ihr verdanke ich ein sehr interessantes Thema und einen nicht minder spannenden Arbeitsplatz mit vielen interessanten Menschen.

Herrn PD Dr. Worek danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und seine Unterstützung, vor allem in der letzten Phase des Projektes.

Oliver Tenberken danke ich für die nette Atmosphäre und die Möglichkeit meine Wand-Gestaltungswünsche in seinem Büro zu verwirklichen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kehe möchte ich danken, dass sie mich so nett aufgenommen und sowohl materiell wie auch mit Rat und Tat in meinem Laboralltag unterstützt hat. Ich habe mich als Adoptiv-Doktorandin die zwei Jahre über sehr gut gefühlt (auch wenn die Kittelpflicht bis heute „cerebral noch nicht angekommen ist“). Persönlich erwähnen möchte ich Steffen Müller, der sich viele Male meinen Färbungen gewidmet hat, Mirko Papritz für seine schier unerschöpfliche Hilfe mit den Mikroskopen und Christoph Wübbeke für den sportlichen Ausgleich zur harten Arbeit. Bei einem weiteren Mitglied der AG Kehe, Cornelia Wollner, möchte ich mich persönlich bedanken für ihr immer offenes Ohr, ihre Gesprächsbereitschaft über jedes nur erdenkliche Thema und ihre Hilfsbereitschaft. Du warst und bleibst der Garant für ein Lachen :-)

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Marco Melzer bedanken, für die fortwährende Diskussionsbereitschaft und die vielen geistreichen Gespräche, die mir sehr viel Freude im Arbeitsalltag bereitet haben.

Fern ab des InstPharmTox möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken. Meinen Großeltern danke ich dafür, dass sie meine Wissbegierde mit diversen Büchern gefördert haben, so dass irgendwann einmal ein echter Forscher aus mir werden konnte. Meinen Eltern danke ich, dass ich mich immer auf sie verlassen konnte und sie mir ermöglichten zu studieren und somit den Grundstein zu dieser Arbeit gelegt haben. Ute und Gisbert danke ich für den erholsamen Ausgleich fernab der Arbeit durch Skiurlaube oder Heimaturlaub in Münster.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei Georg Rodewald bedanken, der meinen Ehrgeiz geweckt, mich in jeder Hinsicht unterstützt hat und mir in vielen schönen Momenten die liebste Alternative zur Arbeit war.

# Inhaltsverzeichnis

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>I.</b>   | <b>Zusammenfassung</b> .....                                    | <b>I</b>   |
| <b>II.</b>  | <b>Abstract</b> .....   | <b>III</b> |
| <b>III.</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....                              | <b>IV</b>  |
| <b>IV.</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....                              | <b>VI</b>  |
| <b>1</b>    | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>   |
| 1.1         | Atmung .....  | 1          |
| 1.1.1       | Atemzentren .....   | 1          |
| 1.1.2       | Neuromodulation der Atmung .....                                | 4          |
| 1.2         | Das zentrale cholinerge System.....                             | 5          |
| 1.2.1       | Acetylcholinrezeptoren .....                                    | 6          |
| 1.2.2       | Rolle des Acetylcholins bei der Atemregulation .....            | 8          |
| 1.3         | Organophosphate und Atmung .....                                | 9          |
| <b>2</b>    | <b>Zielsetzung</b> .....  | <b>11</b>  |
| <b>3</b>    | <b>Material</b> .....   | <b>12</b>  |
| 3.1         | Tiere .....   | 12         |
| 3.2         | Chemikalien .....   | 12         |
| 3.3         | Lösungen und Puffer.....  | 12         |
| 3.4         | Rezeptoraktive Wirkstoffe .....                                 | 14         |
| 3.5         | Organophosphate .....   | 16         |
| 3.6         | Antikörper .....  | 16         |
| 3.6.1       | Primärantikörper .....  | 16         |
| 3.6.2       | Sekundärantikörper .....  | 17         |
| 3.7         | Enzym-Konjugate.....  | 18         |
| 3.8         | Chromogene .....  | 18         |
| 3.9         | Geräte.....   | 19         |
| <b>4</b>    | <b>Methoden</b> .....   | <b>22</b>  |
| 4.1         | Immunhistochemie .....  | 22         |
| 4.1.1       | Fixierung.....  | 22         |
| 4.1.2       | Färbungen .....   | 24         |
| 4.1.3       | Auswertung .....  | 27         |
| 4.2         | Western Blot .....  | 28         |
| 4.2.1       | Proteinaufreinigung .....                                       | 28         |
| 4.2.2       | Proteinbestimmung.....  | 28         |
| 4.2.3       | SDS-Gelelektrophorese.....                                      | 28         |
| 4.3         | Perfundierte Hirnstammpräparation .....                         | 29         |
| 4.3.1       | Ableitung kardiovaskulärer und respiratorischer Parameter ..... | 30         |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.3.2    | Auswertung und Statistik. ....   | 30         |
| 4.3.3    | Test verschiedener Agonisten und Antagonisten .....                                | 31         |
| 4.3.4    | Organophosphat.....  | 32         |
| <b>5</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>36</b>  |
| 5.1      | Immunhistochemie.....  | 36         |
| 5.1.1    | Fixierung.....   | 36         |
| 5.1.2    | Negativkontrollen.....   | 38         |
| 5.1.3    | Auswertung der Verteilungsmuster .....   | 38         |
| 5.1.4    | Co-Färbungen .....   | 50         |
| 5.2      | Western Blot .....   | 53         |
| 5.3      | Perfundierte Hirnstammpräparation .....  | 55         |
| 5.3.1    | Rezeptoraktive Wirkstoffe .....  | 55         |
| 5.3.2    | Organophosphat.....  | 62         |
| <b>6</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>72</b>  |
| 6.1      | Verteilungsmuster der AChR Subtypen.....   | 72         |
| 6.1.1    | Muskarinische Acetylcholin Rezeptoren.....   | 72         |
| 6.1.2    | Nikotinische Acetylcholin Rezeptoren .....   | 75         |
| 6.1.3    | Co-Färbungen .....   | 76         |
| 6.2      | Effekte rezeptoraktiver Wirkstoffe in der perfundierten Hirnstammpräparation ..... | 78         |
| 6.2.1    | Nikotinische Antagonisten und Agonisten .....                                      | 78         |
| 6.2.2    | Muskarinische Antagonisten und Agonisten .....                                     | 82         |
| 6.3      | CRS .....  | 84         |
| <b>7</b> | <b>Fazit.....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>8</b> | <b>Literatur .....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>9</b> | <b>Kongressbeiträge.....</b>   | <b>101</b> |

## I. Zusammenfassung

Die Atmung ist ein komplexer Vorgang, dessen koordinierte Funktion durch verschiedene Zentren im Hirnstamm reguliert wird. Die Kommunikation der in *Medulla oblongata* und *Pons* verteilten Areale wird durch eine Vielzahl unterschiedlichster Neurotransmitter gewährleistet. Organische Phosphorverbindungen führen über eine Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) zu verschiedenen schwerwiegenden zentralen und peripheren Störungen, die hervorgerufen werden durch eine Überstimulierung der Rezeptoren mit Acetylcholin.

In dieser Arbeit wurde mit immunhistochemischen Methoden die Verteilung unterschiedlicher Acetylcholin-Rezeptoren im Hirnstamm der Ratte untersucht. Im Anschluss dienten physiologische Experimente unter Anwendung der perfundierten Hirnstammpräparation dazu, mit Hilfe verschiedener Agonisten und Antagonisten, Einblicke in die Funktion der Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) bei der Regulierung der Atmung zu erlangen. Des Weiteren wurde der Effekt des Organophosphats Crotylmethylphosphonofluoridat (CRS) auf die Atemparameter bei kontinuierlicher Sauerstoffversorgung und simulierter Hypoxie untersucht.

Durch Antikörperfärbungen konnte nicht nur gezeigt werden, dass verschiedene muskarinische und nikotinische Subtypen in der dorsalen (DRG), ventralen (VRG) und pontinen respiratorischen Gruppe (PRG) vorhanden sind, sondern auch, dass Neuronen gleich mehrere Rezeptoren co-exprimieren. So wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen, dass innerhalb einer Zelle G-Protein gekoppelte muskarinische Acetylcholinrezeptor-Subtypen und nikotinische Liganden-gesteuerte Ionenkanäle co-lokalisieren. Ein Rezeptor-Subtyp eines konvergierenden Transmittersystems, der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor, konnte ebenfalls zusätzlich in selbigen Zellen mittels Antikörpern angefärbt werden.

Physiologische Experimente in der perfundierten Hirnstammpräparation zeigten eine Beteiligung sowohl muskarinischer als auch nikotinischer Acetylcholinrezeptoren, dabei übten Agonisten und Antagonisten unterschiedliche, teils signifikante Einflüsse auf die Atemparameter aus. Das Organophosphat CRS führte in der perfundierten Hirnstammpräparation zu einer kurzen Apnoephase von einigen Sekunden, gefolgt von einem pathologischen Atemmuster, welches sich jedoch innerhalb von 60 min spontan regenerierte. Durch einen zusätzlichen simulierten Kollaps des Herzkreislaufsystems verlängerte sich die Apnoephase auf bis zu 3 min. Die Zugabe eines 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten führte zu einer Reduzierung dieser Phase ohne *Nervus Phrenicus* Aktivität.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen, dass die Organophosphate ihre zentralen Wirkungen auf die Atmung in sämtlichen bislang klassifizierten Atemzentren der Ratte ausüben können. Die hohe Rezeptordichte unterschiedlicher AChR-Subtypen in den Kerngebieten von DRG, VRG und PRG und die physiologischen Experimente zeigten, dass ACh bei der Atemregulation ein hoher Stellenwert beikommt. Durch die

Untersuchungen mit CRS konnte nachgewiesen werden, dass sich die Atemparameter bei gewährleisteter Sauerstoffversorgung trotz dauerhafter Hemmung der Acetylcholinesterase wieder normalisieren. Mit dem Einsatz verschiedener Agonisten und Antagonisten, speziell für das cholinerge und serotonerge System, eröffnen sich durch diese Arbeit neue Therapieansätze bei der Behandlung von Organophosphatvergiftungen.

## II. Abstract

Breathing is a very complex process being regulated via the coordinated activity of different areas scattered in the brainstem. Communication between these areas in medulla oblongata and pons is warranted by different neurotransmitters.

Organophosphorous compounds cause severe effects in the central nervous system and in the periphery. By inhibition of the enzyme acetylcholinesterase they lead to over stimulation of the receptors due to an excess of acetylcholine.

In this work the distribution of acetylcholine receptor subtypes in the rat brainstem was investigated with immunohistochemical methods. By the use of different muscarinic and nicotinic receptor agonists and antagonists in the perfused brainstem preparation of the rat the effect on breathing patterns was tested to gather knowledge for their possible use in the therapy of organophosphate poisonings. To directly test the effects of an organophosphoric compound in the perfused brainstem preparation CRS was applied once using normal oxygenation, the second time using simulated hypoxia.

With antibody-stainings it was shown that not only muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors are present in the dorsal, ventral and pontine respiratory group but also neurons expressing multiple receptor subtypes. Using immunofluorescence it was verified that neurons express muscarinic G-protein coupled receptors and nicotinic ligand-gated ionchannels. 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the converging serotonin transmitter system were also shown to be colocalized in the same cell with the acetylcholine receptors.

Physiological experiments using the perfused rat brainstem preparation proofed the involvement of muscarinic and nicotinic receptors in the regulation and modulation of breathing. Agonists and antagonists caused differently, sometimes significantly, changes in the breathing pattern. The organophosphate CRS induced a small apnoea, lasting several seconds, followed by a pathological breathing pattern which recovered within 60 min.

By simulation of a cardiac-arrest the apnoea was elongated to 3 min but it could be reduced by application of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT.

Concluding this work it is likely that organophosphates exert influence on every part of the respiratory centre due to the high number of different acetylcholine receptor subtypes being expressed there. The experiments with CRS showed a normalization of the breathing pattern under constant oxygenation of the preparation despite complete inhibition of AChE. It might be a great chance to test specific muscarinic and nicotinic receptor antagonists for their potential in the therapy of nerve agent poisoning.

### III. Abkürzungsverzeichnis

| <u>Abkürzung</u> | <u>Definition</u>   |
|------------------|---|
| 5-HT             | 5-Hydroxytryptamin, Serotonin   |
| ABC              | Avidin-Biotin-Komplex   |
| ACh              | Acetylcholin  |
| AChE             | Acetylcholinesterase  |
| AChR             | Acetylcholinrezeptor  |
| ACSF             | artificial cerebrospinal fluid (artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit)            |
| AEC              | 3-Amino-9-Ethylcarbazol   |
| ATP              | Adenosin-Triphosphat  |
| BHS              | Blut-Hirn-Schranke  |
| CRS              | Crotylmethylphosphonofluoridat  |
| cVRG             | caudal respiratory group (caudale respiratorische Gruppe)                         |
| Da               | Dalton  |
| DAB              | Diaminobenzidin   |
| DAPI             | 4',6 Diamindin-2-phenylindol  |
| DRG              | dorsale respiratorische Gruppe  |
| DTT              | Dithiothreitol  |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EKG              | Elektrokardiogramm  |
| FACS             | fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenzaktivierte Zell-sortierung)       |
| FOV              | field of view   |
| GABA             | $\gamma$ -aminobutyric acid ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)                         |
| HPLC             | high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| Ig               | Immunglobulin   |
| LTD              | laterale tegmentale Kerne   |
| mAChR            | muskarinischer Acetylcholinrezeptor   |
| mRNA             | messenger ribonucleic acid (Messenger Ribonukleinsäure)                           |
| nAChR            | nikotinischer Acetylcholinrezeptor  |
| NTS              | Nucleus Tractus Solitarius  |
| OP               | Organophosphat  |
| PBS              | phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)                         |
| PCR              | polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)                             |
| PFA              | Paraformaldehyd   |

---

| <b><u>Abkürzung</u></b> | <b><u>Definition</u></b>   |
|-------------------------|--|
| pFRG                    | parafaciale respiratorische Gruppe   |
| PLC                     | Phospholipase C  |
| PN                      | phrenic nerv (Nervus Phrenicus)  |
| PNA                     | phrenic nerve activity (Aktivität des Nervus Phrenicus)  |
| PPT                     | Pedunklopontine Kerne  |
| PRG                     | pontine respiratorische Gruppe   |
| RT                      | Raumtemperatur   |
| RNA                     | ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)  |
| RT-PCR                  | reverse transkriptase polymerase chain reaction (Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion) |
| RTN                     | Nucleus Retrotrapezoides   |
| rVRG                    | rostrale ventrale respiratorische Gruppe   |
| SDS                     | Sodiumdodecylsulfat  |
| T <sub>e</sub>          | time of expiration (Expirationszeit)   |
| T <sub>i</sub>          | time of inspiration (Inspirationszeit)   |
| T <sub>tot</sub>        | total time (Zykluslänge)   |
| UE                      | Untereinheit   |
| VRG                     | ventrale respiratorische Gruppe  |
| WHBP                    | working heart brainstem preperation (perfundierte Hirnstampräparation)                             |
| ZNS                     | Zentrales Nervensystem   |

## IV. Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellungen der Atemzentren im Rattenhirn.....  | 2  |
| <b>Abb. 2:</b> Darstellung der verschiedenen modulierenden Einflüsse, denen das Respiratorische Netzwerk unterworfen ist.....                     | 5  |
| <b>Abb. 3:</b> Schematische ZImmunhistochemischeeichnung eines Nagerhirns.....  | 7  |
| <b>Abb. 4:</b> Übersichtsschema über die verschiedenen Schritte von der Gewebepreparation bis zur Antikörperfärbung der Rattenhirne.....          | 22 |
| <b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung der perfundierten Hirnstammpräparation .....  | 30 |
| <b>Abb. 6:</b> PNA unter Kontrollbedingungen .....  | 31 |
| <b>Abb. 7:</b> Schema für die Bestimmung der Atemparameter nach CRS-Injektion.....  | 33 |
| <b>Abb. 8:</b> Schema für die Bestimmung der Atemparameter nach CRS-Injektion und zusätzlicher Gabe von 8-OH-DPAT.....                            | 34 |
| <b>Abb. 9:</b> Hypoxieprotokoll.....  | 34 |
| <b>Abb. 10:</b> Aceton-fixierter Coronalchnitt des Rattenhirns, Cy3-Färbung für mAChR M <sub>1</sub> .....  | 36 |
| <b>Abb. 11:</b> Aceton-fixierter Coronalchnitt des Rattenhirns, Cy3-Färbung für mAChR M <sub>3</sub> .....  | 36 |
| <b>Abb. 12:</b> Aceton-fixierter Coronalchnitt des Rattenhirns, Cy3-Färbung für mAChR M <sub>1</sub> .....  | 37 |
| <b>Abb. 13:</b> Coronalchnitt des PFA-perfundierten Rattenhirns, Cy3-Färbung für nAChR β <sub>2</sub> , ...                                       | 37 |
| <b>Abb. 14:</b> Coronalchnitt des PFA-perfundierten Rattenhirns, Demaskierungsschritt, Cy3-Färbung für mAChR M <sub>1</sub> .....                 | 37 |
| <b>Abb. 15:</b> Coronalchnitt des PFA-perfundierten Rattenhirns, Permeabilisierung mit 0,5 % Triton X, Cy3-Färbung für mAChR M <sub>1</sub> ..... | 37 |
| <b>Abb. 16:</b> Färberegebnis für mAChR M <sub>1</sub> nach Absättigung mit Kontrollpeptid. ....  | 38 |
| <b>Abb. 17:</b> Färbung mit mAChR M <sub>3</sub> nach Absättigung mit Kontrollpeptid .....  | 38 |
| <b>Abb. 18:</b> Schematische Zeichnung eines Sagitalschnitts des Rattenhirns.....   | 39 |
| <b>Abb. 19:</b> Schematische Darstellung eines Coronalchnitts des Rattenhirns, rot eingezeichnet der NTS.....                                     | 39 |
| <b>Abb. 20:</b> Färbung für nAChR α <sub>7</sub> mit DAB .....  | 39 |
| <b>Abb. 21:</b> Färbung für mAChR M <sub>2</sub> mit DAB .....  | 40 |
| <b>Abb. 22:</b> Färbung für alle mAChR Subtypen mit M35 und Cy3 markiertem Streptavidin .....   | 40 |
| <b>Abb. 23:</b> Färbung für mAChR M <sub>1</sub> mit Cy3 .....  | 40 |
| <b>Abb. 24:</b> Färbung für nAChR β <sub>2</sub> mit AEC .....  | 40 |
| <b>Abb. 25:</b> Vergrößerter Bereich aus <b>Abb. 18</b> ; dargestellt sind positiv gefärbte Neuronen im NTS.....                                  | 40 |
| <b>Abb. 26:</b> Vergrößerter Bereich aus <b>Abb. 24</b> .....   | 40 |
| <b>Abb. 27:</b> Schematische Zeichnung eines Sagitalschnitts des Rattenhirns.....   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 28:</b> Schematische Zeichnung eines Coronalschnitts des Rattenhirns, blau<br>eingezeichnet die rVRG.....   | 41 |
| <b>Abb. 29:</b> Färbung für nAChR $\alpha_7$ mit DAB .....  | 41 |
| <b>Abb. 30:</b> Färbung für mAChR $M_1$ , mit Cy3 markierten Strept-avidin .....  | 42 |
| <b>Abb. 31:</b> Färbung für mAChR $M_2$ mit Cy3 markiertem Strept-avidin .....  | 42 |
| <b>Abb. 32:</b> Schematische Zeichnung eines Coronalschnitts des Rattenhirns, blau<br>eingezeichnet der PräBötzinger Komplex.....   | 42 |
| <b>Abb. 33:</b> Färbung für mAChR $M_1$ .mit Cy3 .....  | 42 |
| <b>Abb. 34:</b> Färbung für mAChR $M_2$ mit Cy3 .....   | 43 |
| <b>Abb. 35:</b> Färbung für nAChR $\beta_2$ mit AEC .....   | 43 |
| <b>Abb. 36:</b> Färbung für nAChR $\alpha_7$ mit DAB .....  | 43 |
| <b>Abb. 37:</b> Schematische Zeichnung eines Coronalschnitts des Rattenhirns, blau<br>eingezeichnet der Bötzinger Komplex. ....   | 43 |
| <b>Abb. 38:</b> Positive Zellen im Bereich des Bötzinger Komplex für nAChR $\alpha_7$ mit DAB .....   | 43 |
| <b>Abb. 39:</b> Färbung für mAChR $M_2$ mit DAB .....   | 44 |
| <b>Abb. 40:</b> Färbung für nAChR $\beta_2$ mit AEC .....   | 44 |
| <b>Abb. 41:</b> Färbung für mAChR $M_{35}$ mit DAB .....  | 44 |
| <b>Abb. 42:</b> Färbung für mAChR $M_{35}$ mit DAB.....   | 44 |
| <b>Abb. 43:</b> Schematische Zeichnung eines Coronalschnitts des Rattenhirns, blau<br>eingezeichnet die Parafacialis Region. ....   | 45 |
| <b>Abb. 44:</b> Färbung für nAChR $\alpha_7$ mit DAB .....  | 45 |
| <b>Abb. 45:</b> Färbung für mAChR $M_3$ mit DAB .....   | 45 |
| <b>Abb. 46:</b> Bereich des Parafacialis aus Abb. 45 vergrößert dargestellt.....  | 45 |
| <b>Abb. 47:</b> Schematische Zeichnung eines Sagitalschnitts des Rattenhirns.....   | 46 |
| <b>Abb. 48:</b> Schematische Zeichnung eines Coronalschnitts des Rattenhirns, gelb<br>eingezeichnet der <i>Kölliker fuse Nucleus</i> und der <i>Nucleus Parabrachialis</i> . .... | 46 |
| <b>Abb. 49:</b> Färbung für nAChR $\alpha_7$ mit DAB .....  | 46 |
| <b>Abb. 50:</b> Färbung für mAChR $M_2$ mit DAB .....   | 47 |
| <b>Abb. 51:</b> Färbung für mAChR $M_3$ mit AEC .....   | 47 |
| <b>Abb. 52:</b> Färbung für mAChR $M_{35}$ mit DAB.....   | 47 |
| <b>Abb. 53:</b> Übersichtaufnahme eines Coronalschnitts des Rattenhirns zur Auswertung mit<br>HistoQuest .....  | 48 |
| <b>Abb. 54:</b> Scattergramm und Ergebnisse für die Anzahl der Zellkerne im Ramb .....  | 49 |
| <b>Abb. 55:</b> Scattergramm und Ergebnistabelle für die Anzahl positiver Zellen mit braunem<br>Cytoplasma .....  | 50 |
| <b>Abb. 56:</b> Färbung für 5-HT $1_A$ mit Cy3-markiertem Streptavidin; Färbung für $M_{35}$ mit Cy2;<br>Overlay.....   | 50 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 57:</b> Färbung für M1 mit Cy3; Färbung für 5-HT <sub>1A</sub> mit Cy2, Overlay .....   | 51 |
| <b>Abb. 58:</b> Färbung für M <sub>3</sub> mit Cy3; Färbung für 5-HT <sub>1A</sub> mit Cy2;Overlay .....  | 51 |
| <b>Abb. 59:</b> Färbung für nAChR α <sub>7</sub> mit Cy3; Färbung für 5-HT <sub>1A</sub> mit Cy2.....   | 51 |
| <b>Abb. 60:</b> Co-Färbung für die mAChRs M <sub>1</sub> (mit Cy3) und M35 (mit Cy2).....   | 52 |
| <b>Abb. 61:</b> Co-Färbung für die mAChRs M <sub>1</sub> (mit Cy3) und M <sub>2</sub> (mit Cy2) .....   | 52 |
| <b>Abb. 62:</b> Co-Färbung für die nAChRs α <sub>7</sub> (Cy3) und β <sub>2</sub> (Cy2).....  | 52 |
| <b>Abb. 63:</b> Co-Färbung für M <sub>1</sub> (mit Cy2) und α <sub>7</sub> (mit Cy3) .....  | 52 |
| <b>Abb. 64:</b> Western Blot für mAChR M35 .....  | 53 |
| <b>Abb. 65:</b> Negativkontrolle für mAChR M35 .....  | 53 |
| <b>Abb. 66:</b> Western Blot für nAChR β <sub>2</sub> .....   | 54 |
| <b>Abb. 67:</b> Negativkontrolle für nAChR β <sub>2</sub> .....   | 54 |
| <b>Abb. 68:</b> Western Blot für nAChR α <sub>7</sub> .....   | 54 |
| <b>Abb. 69:</b> Negativkontrolle für α <sub>7</sub> .....   | 54 |
| <b>Abb. 70:</b> Atemparameter nach Applikation von 50 μM TMPH .....   | 56 |
| <b>Abb. 71:</b> Atemparameter i der Applikation von 40 μM DHβE.....   | 56 |
| <b>Abb. 72:</b> Atemparameter nach Applikation von 20 μM MLA.....   | 57 |
| <b>Abb. 73:</b> Mittleres Atemzugvolumen pro Minute nach Applikation der verschiedenen<br>Antagonisten .....  | 58 |
| <b>Abb. 74:</b> Aktivität des Nervus Phrenicus jeweils für die Dauer von 30 s nach Lobelin.....   | 59 |
| <b>Abb. 75:</b> Aktivität des <i>Nervus Phrenicus</i> jeweils für die Dauer von 30 s nach 25 μM AQ-RA<br>741 und 50 μM Telenzepin.....  | 60 |
| <b>Abb. 76:</b> Prozentuale Veränderung des Atemzugvolumens nach Applikation von 50 μM<br>Telenzepin, 25 μM AQ-RA 741, 5 μM DHβE und 40 μM MLA. ....  | 61 |
| <b>Abb. 77:</b> Inspirations- und Expirationszeit nach Zugabe von Carbachol und zusätzlicher<br>Gabe des M <sub>1</sub> AChR Antagonisten Telenzepin. ....                                  | 62 |
| <b>Abb. 78:</b> Vergleich der Atemparameter nach CRS-Zugabe über 60 min .....   | 63 |
| <b>Abb. 79:</b> Veränderungen des Atemzugvolumens nach CRS-Zugabe über 60 min .....   | 64 |
| <b>Abb. 80:</b> Vergleich der Inspirationszeiten nach Zugabe von CRS und bei zusätzlicher Gabe<br>des 5-HT <sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT.....                                  | 65 |
| <b>Abb. 81:</b> Vergleich der Expirationszeiten nach Zugabe von CRS und bei zusätzlicher Gabe<br>des 5-HT <sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT.....                                   | 66 |
| <b>Abb. 82:</b> Vergleich des Atemzugvolumens nach Zugabe von CRS und bei zusätzlicher Gabe<br>des 5-HT <sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT.....                                     | 66 |
| <b>Abb. 83:</b> Darstellung der Atemparameter bei Anwendung des Hypoxieprotokolls.....  | 67 |
| <b>Abb. 84:</b> Darstellung der Inspirationsdauer bei Anwendung des Hypoxieprotokolls<br>(Normalbedingungen) im Vergleich zur Inspirationszeit nach vorangegangener CRS-<br>Vergiftung..... | 68 |

**Abb. 85:** Darstellung der Expirationsdauer bei Anwendung des Hypoxieprotokolls (Normalbedingungen) im Vergleich zur Expirationszeit nach vorangegangener CRS-Vergiftung.....68

**Abb. 86:** Inspirationsdauer während des Hypoxieprotokolls bei Normalbedingungen, nach Vergiftung mit CRS und bei zusätzlicher Gabe eines Serotoninrezeptor-Agonisten.....69

**Abb. 87:** Expirationsdauer während des Hypoxieprotokolls bei Normalbedingungen, nach Vergiftung mit CRS und bei zusätzlicher Gabe eines Serotoninrezeptor-Agonisten.....70

**Abb. 88:** Apnoephasen während des Hypoxieprotokolls im Vergleich.....70

# 1 Einleitung

## 1.1 Atmung

Die Atmung ist eine lebenswichtige Grundfunktion, die der Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung sämtlicher Körperzellen dient. Kommt es zu einem Atemstillstand, Apnoe genannt, setzt ein Zellsterben ein, welches ohne Behandlung zu Organschäden und letztendlich zum Tode führt.

Das komplexe Atemmuster bei Säugern lässt sich in drei Phasen unterteilen: Inspiration, Postinspiration und Expiration, deren Koordination durch ein Zusammenspiel verschiedener motorischer Ausgänge gewährleistet wird.

Die Kontraktion des Diaphragmas, des wichtigsten inspiratorischen Muskels, durch Innervation von im zervikalen Rückenmark entspringenden paarigen *Nervi Phrenici* (PN), führt zum Absinken der Zwerchfellkuppe. Gleichzeitig wird der Brustkorb durch die inspiratorische Interkostalmuskulatur erweitert, so dass sich die Lunge ausdehnen kann und der entstehende Unterdruck die Ventilation während der Inspiration ermöglicht. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung von Larynx-Abduktoren durch motorische Ausgangsstrukturen in der *Medulla oblongata*, dem verlängerten Rückenmark. Die nachfolgende Weitung der Stimmlippe führt zur Abnahme des inspiratorischen Atemwiderstands.

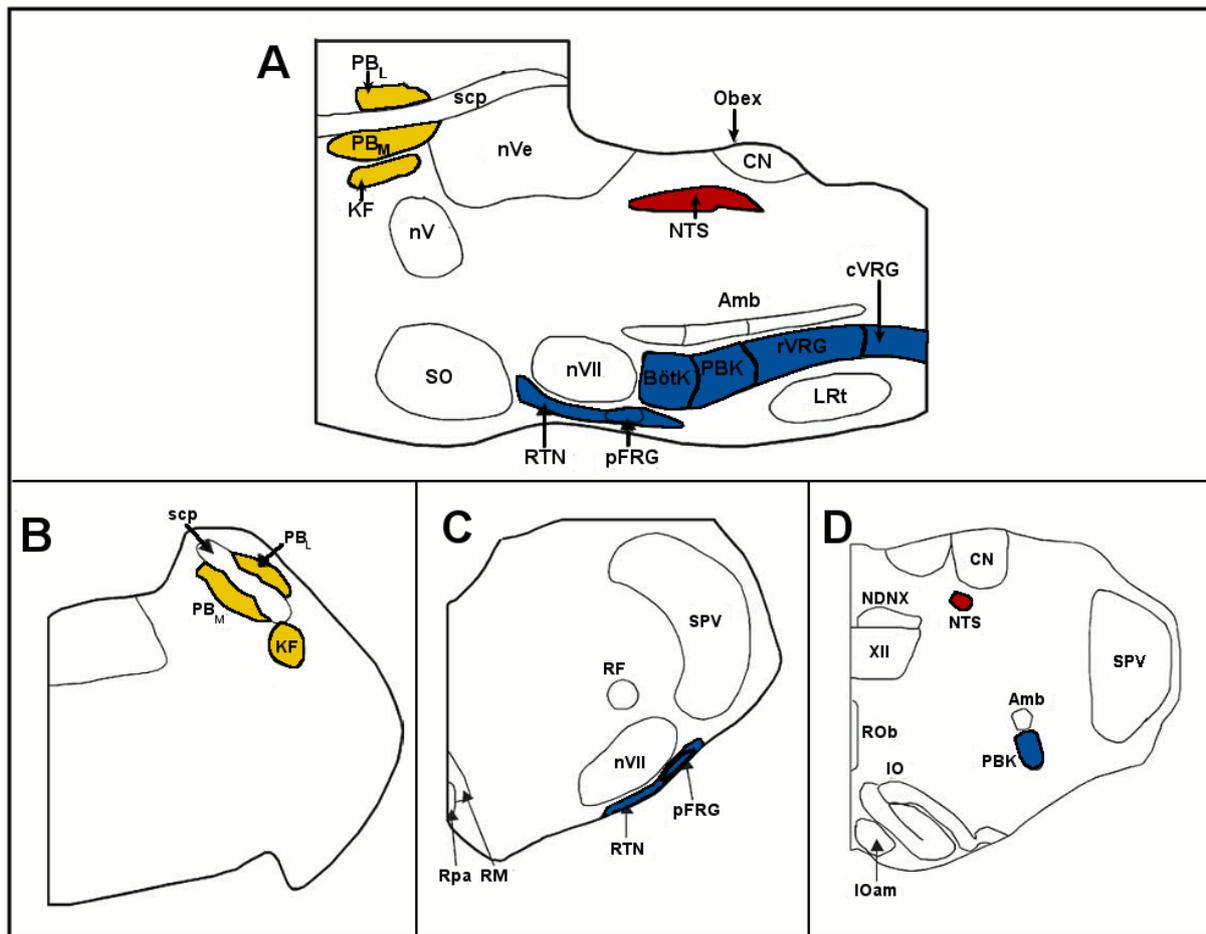
In der späten Inspirationsphase kommt es durch afferente Rückkopplung von Lungendehnungsrezeptoren zu einem Phasenwechsel (Hering and Breuer, 1868) und auf motorischer Ebene beendet eine kurze Kontraktion der Stimmritze die Inspiration. So wird die Ventilation unterbrochen und der Gasaustausch in den Lungenbläschen begünstigt (Richter, 1995). Im Verlauf der frühen Expirationsphase nimmt die Kontraktion der Stimmritze kontinuierlich ab und die eingeatmete Luft kann kontrolliert werden. Diese Phase der Expiration wird automatisch durch Adaption beendet und es schließt sich die späte Expirationsphase an, die jedoch motorisch so lange unerschwellig bleibt, bis durch erhöhte Atemfrequenz oder Atemzugvolumen aktiv Luft aus den Lungen gepresst werden muss.

Die Koordination dieser motorischen Ausgänge, welche die peripheren Atmungsorgane steuern, wird durch übergeordnete Zentren im Hirnstamm gewährleistet, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

### 1.1.1 Atemzentren

Julien Jean César Legallois war der erste Wissenschaftler, der im 19. Jahrhundert, durch Tierversuche, in denen er die Verbindung zwischen Gehirn und Rückenmark durchtrennte, ein Atemzentrum in der *Medulla oblongata* lokalisierte (Fye, 1995).

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Arealen im Gehirn entdeckt worden, die mit der Atmung in Verbindung gebracht werden und teils essentielle, teils modulierende Funktionen haben (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellungen der Atemzentren im Rattenhirn, bearbeitet nach (Wong-Riley und Liu, 2005).

Gelb: Pontine Respiratorische Gruppe (PRG), rot: Dorsale Respiratorische Gruppe (DRG), blau: Ventrale Respiratorische Gruppe (VRG)

(A) Parasagittalschnitt, (B) - (D) Coronale Schnitte durch den Ratten-Hirnstamm in den Ebenen der Pons, der rostralen und caudalen Medulla

Abkürzungen: **Amb:** Nucleus Ambiguus; **BötK:** Bötzinger Komplex; **KF:** Kölliker-Fuse Nucleus; **NTS:** Nucleus Tractus Solitarius; **PBK:** PräBötzinger Komplex; **PBL:** lateraler Nucleus Parabrachialis; **PBM:** Medialer Nucleus Parabrachialis; **pFRG:** parafaciale Respiratorische Gruppe; **RTN:** Nucleus Retro-Trapezoides.

Zur Orientierung: **Amb:** Nucleus Ambiguus; **CN:** Nucleus Cuneatus; **IO:** Nucleus olivaris inferior; **IOam:** Nucleus olivaris accessorius medialis; **LRT:** lateraler Nucleus reticularis; **NDNX:** Nucleus dorsalis nervi vagi; **SPV:** Nucleus spinalis nervi trigemini; **nV:** Nucleus motorius nervi trigemini; **nVII:** Nucleus Facialis; **nVe:** Nucleus Vestibularis; **RF:** Nucleus retrofacialis; **RM:** Nucleus raphe magnus; **Rpa:** Nucleus raphe pallidus; **Rob:** Nucleus raphe obscurus; **scp:** Pedunculus cerebellaris superior; **SO:** Nucleus olivaris superior

Die bislang klassifizierten bilateral angelegten Atemzentren (siehe Abb. 1) können auf Grund ihrer Lage im Hirnstamm in drei Gruppen unterteilt werden. Caudal in der *Medulla oblongata* gelegen, existieren zwei sich gegenüberliegende Bereiche die als dorsale und ventrale respiratorische Gruppe bezeichnet werden (DRG, VRG) weiter rostral in der *Pons* befindet sich die pontine respiratorische Gruppe (PRG).

Die DRG umfasst Zellen des *Nucleus Tractus Solitarius* (NTS), der eine wichtige Rolle in der Verarbeitung autonomer Funktionen spielt und verschiedenste Informationen integriert (siehe Abb. 1A und D). Er erhält Input über Afferenzen aus dem kardiovaskulären System, dem Verdauungstrakt und den Atmungsorganen (Le Brun et al., 2008). So projizieren der IX. und X. Kranialnerv, *Nervus glossopharynx* und *Nervus vagus*, in dieses Kerngebiet. Sie übertragen Informationen über den arteriellen Sauerstoff, Kohlendioxid und pH sowie über den systemischen arteriellen Blutdruck, die sie über Chemorezeptoren in Karotis und Aorta erhalten. Der *Nervus Vagus* verarbeitet außerdem Informationen von Dehnungs- und anderen sensorischen Rezeptoren, die sich in der Lunge befinden (Levitzy, 2002).

Die VRG umfasst verschiedene Kompartimente, die säulenförmig die ventrolaterale Medulla durchziehen, und sich auf Grund ihrer Zellzusammensetzung unterscheiden (siehe Abb. 1A, C und D) Im Gegensatz zur DRG, die als Integrationsstelle verschiedene autonome Informationen verschaltet, enthält die VRG das postulierte neuronale Netzwerk zur Generierung des Atemrhythmus. Sie enthält sowohl Prämotorneurone des *Nucleus Phrenicus*, der das Zwerchfell innerviert, als auch verschiedene Prämotorneurone, die Informationen an expiratorische Motoneurone weiterleiten (Alheid et al., 2002). Auf Grund physiologischer Unterschiede lässt sich die VRG in verschiedene Bereiche unterteilen.

Während der rostrale Teil (rVRG) hauptsächlich inspiratorische Neuronen enthält, die aktiv während der Inspirationsphase des Atemzyklus entladen, sind im Bötzinger Komplex und im caudalen Teil (cVRG) expiratorische Neuronen angehäuft. Der Bötzinger Komplex wird daher auch als Hauptquelle der expiratorischen Aktivität angesehen (Ezure, 1990; Ezure et al., 2003; Jiang and Lipski, 1990; Long and Duffin, 1986; Shen et al., 2003; Smith et al., 2007).

Dem mehr caudal gelegenen, sogenannten PräBötzinger Komplex, in dem sich inspiratorische, expiratorische und phasen-überspannende Neurone befinden, wird zugeschrieben, maßgeblich für die Generierung der Inspirationsphase verantwortlich zu sein (Johnson et al., 1994; Koshiya and Smith, 1999; Smith et al., 1991). So konnte gezeigt werden, dass die vollkommen von anderen Strukturen isolierte Region *in-vitro* autorhythmische Aktivität aufweist (Johnson et al., 2001; Koshiya and Smith, 1999; Smith et al., 2007; Smith et al., 2009).

Der PräBötzinger Komplex steuert unter anderem die Aktivität inspiratorischer Neuronen der rostralen VRG, die wiederum zu Motorneuronen des *Nervus Phrenicus* projizieren und so direkt das Atemmuster beeinflussen. Der Bötzinger Komplex ist für die Inhibierung selbiger Neuronen der rVRG verantwortlich (Smith et al., 2007).

Die Rolle der parafacialen Respiratorischen Gruppe (pFRG) ist bis heute nicht vollkommen geklärt. So besteht die Hypothese, dass sich in der Region der pFRG ein vollkom-

men autonomer zweiter Rhythmusgenerator befindet, der allerdings nur die Expiration steuert (Feldman and Janczewski, 2006a, b; Onimaru and Homma, 2003). Die Region überlappt zum Teil mit dem *Nucleus Retrotrapezoides* (RTN), der vor allem chemosensorische Neuronen aufweist, die zu vielen medullären Strukturen, wie dem Bötzing und PräBötzing Komplex projizieren (Smith et al., 2007).

Die Zugehörigkeit des *Nucleus Facialis* zur VRG wird ebenfalls diskutiert. Der *Nucleus Facialis* ist ein Motornucleus, der Informationen durch motorische Efferenzen in der Peripherie an die Facialis Muskulatur des Gesichts weiterleitet. Allerdings konnte in der Ratte gezeigt werden, dass er sowohl Inputs von der caudalen VRG erhält, wie auch selber Projektionen zur rostralen VRG und zur DRG sendet (Zheng et al., 1998).

Rostral gelegen im Bereich der Pons findet sich die Pontine Respiratorische Gruppe (PRG), welche aus mindestens vier benachbarten Regionen besteht, die unterschiedliche modulierende Einflüsse auf den Atemrhythmus ausüben (siehe Abb. 1A und B). Von caudal nach rostral sind das die A5-Region (Hilaire and Duron, 1999), die Intertrigeminale Region (Chamberlin, 2004) und der Parabrachiale Komplex inklusive des Nucleus Kölliker Fuse (Alheid et al., 2004).

Die PRG nimmt hauptsächlich modulierende Funktionen wahr, sie spielt zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der reflektorischen Begrenzung der Inspiration, auch Hering-Breuer-Reflex genannt, der verhindert, dass die Ausdehnung der Lunge ein gewisses Maß überschreitet. Diesen modulierenden Einfluss auf die Respiration können die Zentren der PRG ausüben, da sie sowohl zu Prämotoneuronen als auch zu Motoneuronen des *Pharynx*, *Hypoglossus* und *Phrenicus*, projizieren (Alheid et al., 2004). Des Weiteren konnte durch Läsionsversuche verschiedener Bereiche im Hirnstamm der Ratte beobachtet werden, dass durch Entfernung der PRG der dreiphasige Atemrhythmus verloren geht und es zu einem Verlust der Postinspiration kommt (Smith et al., 2007).

### 1.1.2 Neuromodulation der Atmung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt, ist die Atmung ein äußerst komplexer Vorgang, der die Verschaltung und Verarbeitung verschiedenster Informationen gewährleisten muss. Die Kommunikation der verschiedenen Hirnareale via Neuronen kann daher nur über eine große Anzahl von Neurotransmittern und Neuromodulatoren gewährleistet werden. Sowohl in Bereichen, die über Projektionen mit Atemzentren verknüpft sind, als auch in Kompartimenten der DRG, VRG und PRG selbst, wurde eine Vielzahl an Neurotransmittern und -modulatoren entdeckt.



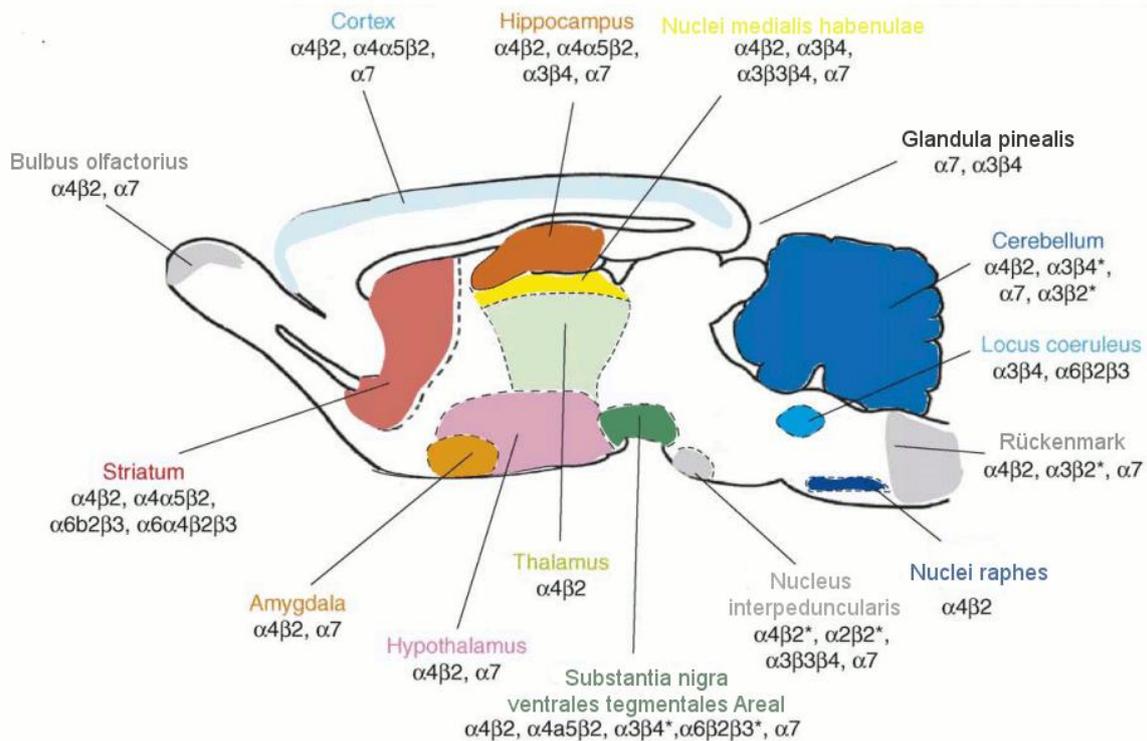
Gastro-Intestinaltrakt, Reproduktionsorganen, Herz, Auge sowie in Krebszellen, Immunzellen und diversen Epithelien von Säugern gefunden (Kawashima and Fujii, 2008).

Im Gehirn finden sich die wichtigsten cholinergen Neuronenpopulationen in den pedunclopontinen (PPT) und lateralen tegmentalern Kernen (LTD) (Bellingham and Funk, 2000; Bellingham and Ireland, 2002). Diese Strukturen im rostralen Hirnstamm stehen mit zahlreichen anderen Kerngebieten, sowohl über Afferenzen als auch über Efferenzen, in Verbindungen. So ist es nicht verwunderlich, dass Acetylcholin auch im Gehirn an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt ist, abhängig von der Zielstruktur, dem vorhandenen Rezeptor an den es bindet und der sich anschließenden Signalkaskade.

### **1.2.1 Acetylcholinrezeptoren**

Grundsätzlich werden die Acetylcholinrezeptoren (AChR) in zwei große Gruppen unterteilt, je nachdem ob sie neben ACh durch Muskarin, ein Alkaloid des Fliegenpilzes, oder Nikotin, ein Alkaloid der Tabakpflanze, stimuliert werden. Während es sich bei den muskarinischen AChRs um G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt, die je nach Subtyp ein bestimmtes *second messenger* System initiieren, handelt es sich bei den nikotinischen AChR um ligandengesteuerte Ionenkanäle für zweiwertige Kationen, die eine Membrandepolarisation bewirken und so eine wesentlich schnellere Signalübertragung gewährleisten.

In Wirbeltieren sind bis heute 17 verschiedene Untereinheiten (UE) des nAChR bekannt, die sich je nach Gewebe und Zelltyp zu verschiedenen funktionellen Rezeptoren zusammensetzen. So ist der Muskeltyp ein Heteropentamer, zusammengesetzt aus  $\alpha\beta\gamma\delta$  Untereinheiten, wobei im ausgewachsenen Tier die  $\gamma$  Untereinheit durch  $\epsilon$  ersetzt wird. Die neuronalen nAChRs sind auch Pentamere, jedoch kommen im zentralen Nervensystem (ZNS) sowohl Heteromere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - als auch Homomere aus verschiedenen  $\alpha$ -UE vor. Jede UE bestimmt dabei entscheidend die pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften des Rezeptors. Abb. 3, entnommen und verändert aus (Gotti et al., 2006), gibt einen Überblick über das Vorkommen verschiedener nikotinischer AChRs im Nagerhirn.



**Abb. 3:** Schematische Zeichnung eines Nagierhirns, farbig gekennzeichnet sind die Bereiche in denen nAChRs gefunden wurden, angegeben sind die jeweiligen Subtypen. Zeichnung entnommen und verändert aus (Gotti et al., 2006).

Abhängig von ihrer Lokalisation innerhalb des ZNS variieren zusätzlich ihre Funktionen. So sind nAChRs, exprimiert in der präsynaptischen Membran, an der Modulation der synaptischen Signalübertragung durch ACh, Dopamin oder Glutamat beteiligt. Finden sie sich dagegen postsynaptisch, führt ihre Aktivierung zu intrazellulären Prozessen, wie Initiierung der Genexpression oder Zelldifferenzierung (Zouridakis et al., 2009). Eine Aussage über eine grundsätzliche Funktion von nAChRs im ZNS ist daher nicht möglich.

Auch muskarinische Rezeptoren lassen sich weiter unterteilen. Mit bislang fünf entdeckten Subtypen ist ihre Anzahl jedoch überschaubar. Während  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  an  $G_{q/11}$  Proteine gekoppelt sind und so dieselben Signaltransduktionsketten in Gang setzen, sind  $M_2$  und  $M_4$  hauptsächlich an  $G_{i/o}$  gebunden (Boudinot et al., 2008). Im Gehirn werden alle muskarinischen Rezeptoren exprimiert und es können ihnen einige Subtyp-spezifische Funktionen zugeschrieben werden. So spielen zum Beispiel  $M_1$  und  $M_2$  wichtige Rollen bei der Verarbeitung kognitiver Funktionen wie Lernen und Erinnerungsverarbeitung (Abrams et al., 2006).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bislang entdeckten mAChR Subtypen, ihre Lokalisation, mögliche Funktion und die an eine Aktivierung gekoppelten Signalwege.

**Tabelle 1:** Überblick über G-Protein, Signalkaskade, Lokalisation und Krankheiten die mit den einzelnen mAChR Subtypen assoziiert werden. Entnommen und verändert aus (Langmead et al., 2008).

|                              | mAChR Subtyp  |   |   |  |  |
|------------------------------|---|---|---|--|--|
|                              | M <sub>1</sub>  | M <sub>2</sub>  | M <sub>3</sub>  | M <sub>4</sub>   | M <sub>5</sub>   |
| Bevorzugter Signalweg        | G <sub>q/11</sub><br>PLC IP <sub>3</sub> /DAG<br>Ca <sup>2+</sup> /PKC                                | G <sub>i/o</sub><br>AC (Hemmung)  | G <sub>q/11</sub><br>PLC IP <sub>3</sub> /DAG<br>Ca <sup>2+</sup> /PKC          | G <sub>i/o</sub><br>AC (Hemmung)                           | G <sub>q/11</sub><br>PLC IP <sub>3</sub> /DAG<br>Ca <sup>2+</sup> /PKC |
| Expressionsprofil            | Cerebraler Cortex,<br>Hippocampus,<br>Striatum, Thalamus,<br>Drüsenewebe,<br>sympathische<br>Ganglien | Medulla oblongata,<br>Thalamus,<br>Cerebraler Cortex,<br>Hippocampus,<br>Striatum,<br>glatte Muskulatur,<br>Herz, Lunge | Cerebraler Cortex,<br>Hippocampus,<br>Drüsenewebe,<br>glatte Muskulatur         | Striatum,<br>Cerebraler Cortex,<br>Hippocampus             | Substantia nigra   |
| Assoziierte Krankheitsbilder | Alzheimer,<br>Schizophrenie,<br>kognitive Dysfunktion   | Alzheimer, Schmerz,<br>kognitive Dysfunktion  | Chronisch obstruktive<br>Lungenerkrankungen<br>Inkontinenz,<br>Reizdarm-Syndrom | Parkinson,<br>Schizophrenie,<br>neuropathischer<br>Schmerz | Drogenabhängigkeit,<br>Parkinson,<br>Schizophrenie                     |

### 1.2.2 Rolle des Acetylcholins bei der Atemregulation

Der Einfluss von ACh auf die Atmung auf physiologischer Ebene ist in verschiedensten Studien untersucht worden. Die Ergebnisse unterscheiden sich jedoch teilweise grundlegend, je nach Art der *in-vivo* oder *in-vitro* Präparation und der untersuchten Tierspezies. So gibt es nicht nur konträre Aussagen über den Einfluss von ACh auf die Atmung, sondern auch über die Beteiligung der verschiedenen Rezeptor-Subtypen.

In isolierten Hirnstamm-Rückenmark-Präparationen neugeborener Ratten konnte durch die Applikation von ACh ein Anstieg der Atemfrequenz beobachtet werden. Durch Atropin, einen kompetitiven mAChR-Hemmer, konnte dieser Effekt stark abgeschwächt werden. Zu einer vollständigen Normalisierung der Atemfrequenz kam es jedoch nur bei gleichzeitiger Gabe von Dihydro-β-erythroidine (DHβE), einem nAChR Antagonist (Murakoshi et al., 1985). Diese Untersuchungen an neugeborenen Ratten lassen auf eine Beteiligung sowohl muskarinischer als auch nikotinischer AChR bei der Generierung des Atemrhythmus schließen. Weiterhin zeigen sie, dass ACh eine stimulierende Wirkung auf die Atemfrequenz ausübt, ein Effekt, der auch in Schnittpräparaten neugeborener Mäuse und Ratten beobachtet werden konnte (Shao and Feldman, 2001).

Für Muskarin sind jedoch im Gegensatz zu ACh und Nikotin auch hemmende Einflüsse auf die Atemfrequenz beobachtet worden (Zanella et al., 2007). Auch ältere *in-vivo* Versuche an Katzen aus den frühen 80er Jahren zeigen heterogene Effekte von ACh auf die Atmung. So wurden sowohl hemmende, als auch erregende Einflüsse auf inspiratorische und expiratorische Neuronen in der *Medulla oblongata* beobachtet (Bohmer et al., 1987; Foutz et al., 1987; Jordan and Spyer, 1981).

Neben den widersprüchlichen Befunden über die cholinerge Modulation der Atmung ist auch das Expressionsmuster der verschiedenen Acetylcholinrezeptorsubtypen nicht eindeutig geklärt. Durch radioaktive Bindungsstudien, *in-situ* Hybridisierungen, RT-PCR und immunhistochemische Methoden konnte bislang das Vorhandensein bestimmter AChR für einzelne Spezies in Atemzentren beschrieben werden. Das Laborteam um Jack L. Feldman wies die mRNA aller muskarinischen Rezeptor-Subtypen im PräBötzinger Komplex und angrenzenden Arealen in neugeborenen Ratten nach (Lai et al., 2001). Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnte außerdem das Vorhandensein der  $\alpha_7$  und  $\alpha_4$  Untereinheiten des nAChR im rostralen Teil der VRG und in der caudalen Pons gezeigt werden (Dehkordi et al., 2007).

Die heterogene Verteilung von  $M_1$  bis  $M_3$  in den respiratorischen Zentren der Katze wurde mit Hilfe radioaktiver Isotope nachgewiesen (Mallios et al., 1995).

Eine allgemeingültige Aussage, wie sich Acetylcholin, Muskarin und Nikotin auf das Atemmuster auswirken und in welchen Kerngebieten des Hirnstamms sie ihre Wirkung entfalten, konnte bis heute nicht eindeutig getroffen werden.

### 1.3 Organophosphate und Atmung

Um eine Dauer- und Überstimulation an den Synapsen zu vermeiden und eine schnelle Signalverarbeitung zu ermöglichen, wird ACh unmittelbar nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt durch AChE abgebaut. Es entstehen hierbei durch Hydrolyse Essigsäure und Cholin.

Organophosphate (OP), bei denen es sich um Phosphor- oder Phosphonsäureester handelt, führen durch kovalente Bindung an Serin im aktiven Zentrum der AChE zu deren Inaktivierung. Hierdurch kommt es zu einer Akkumulation von Acetylcholin im synaptischen Spalt und einer gestörten Reizweiterleitung. OPs werden sowohl in der Landwirtschaft als Insektizide eingesetzt als auch im militärischen Bereich als Nervenkampfstoffe. Die Effekte einer akuten Vergiftung reichen dabei von Pupillenverengung, Muskelschwäche und vermehrtem Speichelfluss bis hin zu epileptischen Krampfanfällen, Atemversagen und Tod.

Das Atemversagen, hervorgerufen sowohl durch die periphere Lähmung der Atemmuskulatur, Verkrampfungen und erhöhte Sekretion in den Luftwegen als auch durch zentrale Effekte auf die Atemzentren im Hirnstamm, gilt als Haupttodesursache (Houze et al., 2008). Wie genau sich dieser zentrale Effekt darstellt und was er für einen Anteil am akuten Atemversagen einnimmt, ist seit langem Gegenstand der Forschung und ist wie schon die Wirkung des AChs auf die Atmung, nicht eindeutig geklärt.

*In-vivo* Experimente mit Meerschweinchen zeigen nach Vergiftung mit dem Organophosphat Soman einen Shift in der sonst synchronen Aktivität des Zwerchfells mit der Aktivität einzelner respiratorischer Neurone in der Medulla (Chang et al., 1990), so dass die sonst so wichtige Synchronität in dem respiratorischen Netzwerk durch OPs unterbrochen zu sein scheint.

Auch in Soman-vergifteten Katzen, konnte eine solche Phasenverschiebung beobachtet werden, der sich Erhöhung der Atemfrequenz, Blutdruckabfall und Verringerung des Herzschlages anschlossen (Bay et al., 1973).

Die Vergiftungserscheinungen spiegeln sich jedoch nicht nur in der Asynchronität von respiratorischen Neuronen und respiratorischen Muskeln wieder, sondern auch an den respiratorischen Parametern selbst. So kam es bei Katzen, intracerebroventrikulär vergiftet mit dem Insektizid Paraoxon, zu gravierenden Auswirkungen auf die Atemfrequenz, abhängig von ihrem Bewusstseinszustand. Waren die Tiere narkotisiert, verringerte sich nach Intoxikation die Atemfrequenz und es kam zum Atemstillstand. Waren die Katzen dagegen bei vollem Bewusstsein, kam es zu einer Atembeschleunigung (Foutz et al., 1987; Haji et al., 2000).

Es gibt eine Vielzahl an Experimenten, die zeigen, dass Organophosphate einen zentralen Effekt auf respiratorische Neurone und die Aktivität des *Nervus Phrenicus* ausüben und weitere Symptome einer akuten Vergiftung nach sich ziehen (Bay et al., 1973; Nambiar et al., 2007; Rickett et al., 1986; Worek and Szinicz, 1993). Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch Untersuchungen an VX-vergifteten Meerschweinchen die mit peripher wirkenden mAChR-Antagonisten behandelt wurden und eine 100 %-ige Überlebensrate zeigten (Nambiar et al., 2007). Eine spontane Wiederherstellung der Atemaktivität nach Soman- und Sarinvergiftung die sich trotz persistierender Hemmung der AChE innerhalb einer Stunde einstellte, wurde ebenfalls in Meerschweinchen beobachtet (Adams et al., 1976).

Anhand dieser Ergebnisse wird ersichtlich, dass sich der cholinerge Einfluss auf die Atmung nicht nur in verschiedenen Spezies unterscheidet, sondern auch von Faktoren wie Narkose und Stress beeinflusst wird. Auch wenn ein zentraler Effekt nach OP-Vergiftung nachgewiesen wurde, lassen sich die bisherigen Untersuchungen auf Grund unterschiedlicher experimenteller Designs nicht zu einer grundlegenden Aussage zusammenfassen. Ob der Atemstillstand allein durch Hemmung der AChE in den Atemzentren zu Stande kommt und nachfolgend Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System induziert oder sich periphere und zentrale Effekte summieren ist bislang nicht eindeutig geklärt.

## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines Forschungsvorhabens welches sich mit der Aufklärung zentraler Effekte durch Organophosphatvergiftungen und der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für die Behandlung beschäftigt. In dem hier vorgestellten Teilprojekt geht es darum, ein grundlegendes Verständnis über die mögliche Wirkung von OPs in den Atemzentren der Ratte zu erlangen. Dazu soll die Verteilung der verschiedenen Subtypen nikotinischer und muskarinischer AChRs in den Atemzentren der Ratte mittels Immunhistochemie untersucht werden.

Weiterhin von Interesse sind konvergierende Transmittersysteme, deren Verteilung im Verhältnis zu den AChRs bestimmt werden soll. Von besonderem Interesse ist hierbei Serotonin, für das gezeigt werden konnte, dass 5-HT Rezeptor Agonisten potentielle therapeutische Wirkung bei der Kompensation von Atemstörungen erzielen. So können Opiat-induzierte Atemstillstände durch die systemische Applikation von Agonisten für 5-HT<sub>1A</sub> und 4 kompensiert werden (Manzke et al., 2009; Manzke et al., 2003; Richter et al., 2003).

Parallel erfolgen Versuche mit spezifischen Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten, um mit Hilfe der perfundierten Hirnstammpräparation (WHBP) die Effekte auf das zentral generierte Atemmuster zu untersuchen. Diese Präparation wird durch eine modifizierte ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) über die Aorta perfundiert. Dabei erfolgt die Oxygenierung über das Gefäßsystem mittels einer externen Perfusionspumpe, und nicht wie bei herkömmlichen *in-vitro* Präparaten, durch passive Diffusion. Ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu *in-vivo* Präparationen liegt darin, dass es sich bei der WHBP nicht um einen Tierversuch handelt, es kommt daher auch nicht zu Narkoseeffekten auf die Atmung, des Weiteren bleibt die Sauerstoffversorgung des Gewebes unter allen experimentellen Bedingungen durch die externe Perfusionspumpe gewährleistet. So kann die zentrale Wirkung hochtoxischer Substanzen auf die Atmung beobachtet werden, auch wenn es zu einem Kollaps der Peripherie kommen sollte.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit soll es zum einen möglich sein, eine grundlegende Aussage zu treffen welche AChR Subtypen in welchen Hirnstammarealen vorhanden sind. Des Weiteren können erste Hinweise über ihre jeweilige Funktion mit Hilfe der perfundierten Hirnstammpräparation erhalten werden, die es ermöglichen, durch gezielte Beeinflussung Therapiemöglichkeiten für Organophosphatvergiftungen weiterzuentwickeln.

## 3 Material

### 3.1 Tiere

Sowohl zur Perfusion wie auch für die perfundierte Hirnstammpräparation wurden Albino Sprague Dawley Ratten, bezogen von Charles River, verwendet. Die Perfusion und anschließende Organentnahme wurde an adulten Tieren, älter als 35 Tage, durchgeführt, die Präparation mit jungen Ratten im Alter von 3 bis 5 Wochen.

### 3.2 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma Aldrich, Roth und Tocris bezogen.

Crotylmethylphosphonofluoridat (CRS) wurde von TNO, Rijswijk Niederlande bezogen.

### 3.3 Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit demineralisiertem (VE-Wasser) oder destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt. Zum Einstellen des pH-Wertes wurden HCl- bzw. NaOH-Lösungen verwendet.

#### Puffer

#### Zusammensetzung

|                           |           |   |
|---------------------------|-----------|---|
| 4 %-ige Formaldehydlösung | 4 % (w/v) | Paraformaldehyd<br>gelöst in 60°C heißem PBS, pH-Wert nach dem Erkalten auf 7,4 pH einstellen |
| Probenpuffer              | 2,4 ml    | Tris-HCl 1 M pH 6,8   |
|                           | 960 mg    | Sodium dodecyl sulfat (SDS)   |
|                           | 4,8 ml    | Glycerol  |
|                           | 4,8 mg    | Bromphenolblau  |
|                           | 740 mg    | Dithiothreitol (DTT)  |
|                           |           | vor der Anwendung 6 x verdünnen   |

|                               |      |    |  |
|-------------------------------|------|----|--|
| ACSF                          | 1,25 | mM | MgSO <sub>4</sub>  |
|                               | 1,25 | mM | KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  |
|                               | 5    | mM | KCl  |
|                               | 25   | mM | NaHCO <sub>3</sub>   |
|                               | 125  | mM | NaCl   |
|                               | 2,5  | mM | CaCl   |
|                               | 2,5  | g  | Glukose  |
| Blockierlösung – Western Blot |      |    | Odyssey Blocking Buffer  |
| Blockierlösung – Färbungen    | 5    | %  | Normalserum in PBS   |
| Citratpuffer                  | 18   | mM | Zitronensäure-monohydrat   |
|                               | 82   | mM | Natriumcitrat-dihydrat   |
|                               |      |    | pH-Wert auf 6 einstellen   |
| verstärktes DAB               | 7,5  | mg | Diaminobenzidin (DAB)  |
|                               | 6    | mg | NH <sub>4</sub> Cl   |
|                               | 3,9  | mg | NiSO <sub>4</sub>  |
|                               | 30   | mg | Glucose  |
|                               | 0,06 | mg | Glucose-Oxidase Typ VII<br>(20.000U)                                     |
|                               |      |    | in 15 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) lösen und<br>vor Gebrauch filtern |
| Eindeckmedium                 | 6    | g  | Glycerin   |
|                               | 2,4  | g  | Moviol 4-88  |
|                               | 6    | ml | dH <sub>2</sub> O  |
|                               | 12   | ml | 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)  |
|                               | 450  | mg | DABCO  |
| Laufpuffer                    | 50   | ml | MES SDS Running 20x,<br>Invitrogen                                       |
|                               |      |    | addiere (ad.) 1000ml dH <sub>2</sub> O                                   |

|                            |  |    |  |
|----------------------------|--|----|--|
| Lysis-Puffer               | 50   | mM | Tris-HCl pH 7,4  |
|                            | 10   | %  | Sucrose  |
|                            | 5  | mM | EDTA (Ethylendiamitetra-<br>essigsäure)                |
| PBS                        |  |    | Phosphate buffered saline<br>Tablets, pH 7,4           |
| Stripping-Buffer           | 62,5   | mM | Tris-HCl, pH 6,7                                       |
|                            | 2  | %  | SDS  |
|                            | 100  | mM | 2- Mercaptoethanol                                     |
| Thioninlösung              | 0,9  | g  | Thionin  |
|                            | 36   | µM | NaOH   |
|                            | 4,5  | ml | Eisessig   |
|                            | ad 500 ml VE-Wasser, vor jedem Gebrauch<br>filtern |    |  |
| Transferpuffer             | 50   | ml | NuPage Puffer 20 x (Invitrogen)                        |
|                            | 200  | ml | Methanol   |
|                            | ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O                       |    |  |
| Waschpuffer – Western Blot | 10   | ml | Wash Solution 20 x (Invitrogen)<br>ad 200 ml VE-Wasser |
| Waschpuffer – Färbungen    |  |    | PBS, pH 7,4  |

### 3.4 Rezeptoraktive Wirkstoffe

#### Agonisten

##### Cholinerg

##### Carbachol

2-Carbamoyloxyethyl trimethylammonium chlorid,  
Agonist an muskarinischen und nikotinischen  
AChRs

|                     |  |
|---------------------|--|
| Muskarinisch        | <p><b>Pilocarpin</b>-hydrochlorid<br/> (3S-cis)-3-Ethyldihydro-4-[(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-2(3H)-furanon-hydrochlorid<br/> kompetitiver Agonist, in sehr hohen Dosen nicht kompetitiv</p>  |
| Nikotinisch         | <p>(-)- <b>Lobelin</b>-hydrochlorid<br/> 2-[(2R,6S)-6-[(2S)-2-Hydroxyphenethyl]-1-methyl-2-piperidiny]acetophenon-hydrochlorid</p>   |
| Serotonerg          | <p><b>8-OH-DPAT</b><br/> 8-Hydroxy-2-(Di-N-Propylamino)Tetralin<br/> selektiver Agonist am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor</p>  |
| <b>Antagonisten</b> |  |
| Muskarinisch        | <p><b>AQ-RA 741</b><br/> 11-[[4-[4-(Diethylamino)butyl]-1-piperidiny]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3b][1,4]benzodiazepin-6-on<br/> selektiver kompetitiver M<sub>2</sub> Antagonist</p> <p><b>Telenzepin</b>-dihydrochlorid<br/> 4,9-Dihydro-3-methyl-4-[(4-methylpiperaziny]acetyl]-10H-thieno[3,4-b][1,5]benzodiazepin-10-on-dihydrochlorid<br/> selektiver kompetitiver M<sub>1</sub> Antagonist</p> |
| Nikotinisch         | <p>Dihydro-β-erythroidine hydrobromide (<b>DHβE</b>)<br/> (2S,13bS)-2-Methoxy-2,3,5,6,8,9,10,13-octahydro1H,12H-benzo[<i>i</i>]pyrano[3,4-g]indolizin-12-on-hydrobromid<br/> kompetitiver Antagonist für die neurale α<sub>4</sub> Untereinheit</p>  |

**TMPH**-hydrochlorid

2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-yl heptanoat  
nicht-kompetitiver Antagonist neuraler nAChRs

Methyllycaconitin-citrat (**MLA**)

[1a,4(S),6b,14a,16b]-20-Ethyl-1,6,14,16-tetramethoxy-4-[[[2-(3-methyl-2,5-dioxo-1-pyrrolidiny) benzoyl]oxy] methyl]aconitane-7,8-diol-citrat

kompetitiver Antagonist für die  $\alpha_7$  Untereinheit

**3.5 Organophosphate**

Crotylmethylphosphonofluoridat (97%)

**3.6 Antikörper****3.6.1 Primärantikörper**

mAChR M<sub>1</sub>

polyklonaler Antikörper, hergestellt in Ziege  
1:50 für Immunhistochemie (Santa Cruz Biotechnology, sc-7470)

mAChR M<sub>2</sub>

polyklonaler Antikörper, hergestellt in Kaninchen  
1:50 für Immunhistochemie, 1:200 für Western Blot (Santa Cruz Biotechnology, sc-9107)

mAChR M<sub>3</sub>

polyklonaler Antikörper, hergestellt in Ziege 1:50 für Immunhistochemie (Santa Cruz Biotechnolgy, sc-7474)

M35

monoklonaler Antikörper, hergestellt in Maus  
1:200 für Immunhistochemie, 1:700 für Western Blot (Argene SA)

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| nAChR $\alpha_7$  | monoklonaler Antikörper, hergestellt in Maus<br>1:50 für Immunhistochemie, 1:200 für Western<br>Blot (Santa Cruz Biotechnology, sc-65865 )         |
| nAChR $\beta_2$   | polyklonaler Antikörper, hergestellt in Kaninchen<br>1:200 für Immunhistochemie, 1:1000 für Western<br>Blot (Lifespan Biosciences, LS-B937 / 9423) |
| 5HT1 <sub>A</sub> | polyklonaler Antikörper, hergestellt in Kaninchen<br>1:200 für Immunhistochemie (Chemicon)   |

### 3.6.2 Sekundärantikörper

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Anti-Maus biotinyliert      | aus Ziege, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und<br>kreuzadsorbiert, 1:500 für Immunhistochemie,<br>1:5000 für Western Blot (Jackson Immuno-<br>Research) |
| Anti-Kaninchen biotinyliert | aus Ziege, IgG (H+L), affinitätsgereinigt, 1:100<br>(Dako Cytomation)  |
| Anti-Kaninchen biotinyliert | aus Esel, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und<br>kreuzadsorbiert, 1:1000 (Jackson Immuno-<br>Research)  |
| Anti-Ziege biotinyliert     | aus Kaninchen, IgG (H+L), affinitätsgereinigt,<br>1:100 (Dako Cytomation)  |
| Anti-Ziege biotinyliert     | aus Esel, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und<br>kreuzadsorbiert, 1:1000 (Jackson Immuno-<br>Research)  |
| Anti-Maus Cy2               | aus Esel, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und<br>kreuzadsorbiert, 1:100 (Jackson Immuno-<br>Research)   |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Anti-Maus IRDye 800      | aus Ziege, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und kreuzabsorbiert, 1:5000 für Western Blot (LI-COR)     |
| Anti-Maus DyLight 549    | aus Ziege, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert, 1:200 (Jackson Immuno-Research)      |
| Anti-Kaninchen Cy2       | aus Esel, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert, 1:100 (Jackson Immuno-Research)       |
| Anti-Kaninchen IRDye 680 | aus Ziege, IgG (H+L), affinitätsaufgereinigt und kreuzadsorbiert 1:5000 für Western Blot (LI-COR)   |
| Anti-Ziege Cy3           | aus Esel, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert, 1:200 (Jackson Immuno-Research)       |
| Anti-Ziege IRDye 800     | aus Kaninchen, IgG (H+L), affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert, 1:5000 für Western Blot (LI-COR) |

### 3.7 Enzym-Konjugate

|                                      |                                 |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| Peroxidase-konjugiertes Streptavidin | 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) |
| Cy3-konjugiertes Streptavidin        | 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) |
| IR800-konjugiertes Streptavidin      | 1:500 (LI-COR)                  |

### 3.8 Chromogene

|   |
|---|
| NOVADetect AEC Substrate System (Dianova) |
| Verstärktes DAB (eigene Herstellung)      |

## 3.9 Geräte

### Immunhistochemie

|              |  |
|--------------|--|
| Dampfgarer   | Multi Gourmet, Braun GmbH, Kronberg/Taunus, Deutschland  |
| Kameras      | Axio-CamHR, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland<br>PixeLINK, Ottawa, Kanada   |
| Kryostat     | CM3050S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland   |
| Lichtquelle  | Prior Lumen, Prior Scientific, Rockland, USA   |
| Magnetrührer | IKAMAG RH basic KT/C, IKA Werke, Staufen, Deutschland  |
| Mikroskope   | Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland<br>Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland<br>Imager Z2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland<br>TissueFAX, TissueGnostics, Wien, Österreich |
| pH-Meter     | Mettler Toledo Quattro MP230, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland  |
| Rollerpumpe  | MCP Standard, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland  |
| Software     | Axiovision, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland<br>AndorIQ, Andor Technology, Belfast, Nordirland<br>GIMP, The GIMP Development Team  |

---

HistoQuest, TissueGnostics, Wien, Österreich

### **Western Blot**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Blotkammer               | Mini Protein Blotkammer, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA                     |
| Gelkammer                | Novex Mini Cell Gelkammer, Invitrogen, Carlsbad, USA                                  |
| Imager                   | Odyssey Infrarot Imager, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA                             |
| Mikrotiterplatten Reader | MRX, Dynex Technologies, Chantilly, USA   |
| Potter                   | Potter S, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland                 |
| Schüttler                | Horizontalschüttler KS 250basic, IKA Werke, Staufen, Deutschland                      |
| Ultrazentrifuge          | Optima XL-100K, Beckman Coulter Inc., Brea, USA                                       |
| Zentrifuge               | Rotina 35R Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland |

### **Präparation**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Analog/Digitalwandler | AC/DC Differential Amplifier Model 3000, A-M System Inc., Sequim, USA |
| Audio Monitor         | Audio Monitor 3300, A-M Systems Inc., Sequim, USA                     |
| Kaltlichtquelle       | KL 1500 LD, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland                    |

|                 |  |
|-----------------|--|
| Rollerpumpe     | Watson Marlow 520S, Watson Marlow GmbH,<br>Rommerskirchen, Deutschland |
| Stereomikroskop | Stemi DV4 Spot, Carl Zeiss AG, Oberkochen,<br>Deutschland              |

## 4 Methoden

### 4.1 Immunhistochemie

Abb. 4 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Immunhistochemie, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.



**Abb. 4:** Übersichtsschema über die verschiedenen Schritte von der Gewebepreparation bis zur Antikörperfärbung der Rattenhirne.

#### 4.1.1 Fixierung

Die Fixierung in der Histologie dient dem Strukturerhalt und der Stabilisierung der Zelle mit all ihren Bestandteilen. Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Verfahren, die routinemäßig eingesetzt werden: Die Fixierung durch organische Fällungsmittel wie Methanol oder Aceton und die Fixierung durch Aldehyde.

Bei ersterer Methode entzieht das Fixans dem Gewebe Wasser, es kommt zum Bruch von Wasserstoffbrücken und Tertiärstrukturen und zur Denaturierung (Cinar et al., 2006).

Die zweite Methode beruht auf der Eigenschaft von Aldehyden intra- und intermolekulare Quervernetzungen auszubilden, wobei es ebenfalls zu Strukturveränderungen der Proteine kommen kann.

#### **4.1.1.1 Aldehydfixierung - Intrakardiale Perfusion**

Um eine gleichmäßige Fixierung auch großer Gewebestücke zu gewährleisten, reicht eine Immersionsfixierung meist nicht aus. Gerade bei histologischen Untersuchungen an stark durchbluteten Strukturen wie dem Gehirn, ist es zudem essentiell den Hintergrund durch Blut und darin vorhandene Antikörper möglichst gering zu halten. Es bietet sich daher an, eine Perfusionsfixierung vorzunehmen.

Die adulten Ratten wurden hierzu bis zur tiefen Bewusstlosigkeit mit Halothan betäubt. Nach Öffnen des Brustkorbes wurde eine 21 G Kanüle, die Anschluss an eine Rollerpumpe hatte, in den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Atrium eröffnet. Bei einer anfänglichen Pumpgeschwindigkeit von 25 ml/min wurde zuerst mit ca. 100 ml körperwarmem PBS perfundiert, bis die aus dem Atrium austretende Körperflüssigkeit klar erschien. Im Anschluss erfolgt die Fixierung mit 200-300 ml kaltem 4 %-igem PFA (pH 7,4), wobei die Pumpgeschwindigkeit auf 50 ml/min erhöht wurde. Im Anschluss erfolgten die Entnahme der Gehirne und eine zweistündige Immersionsfixierung, ebenfalls in 4 %-igem PFA bei 4°C. Anschließend wurden die Gehirne zur Entwässerung für mindestens 48 Stunden bzw. bis zum Absinken bei 4°C in 20 %-iger Sucrose (in dH<sub>2</sub>O) gelagert.

Zum Einfrieren der Gehirne wurden Einmal-Einbettförmchen (Peel-A-Way, Disposable Embedding Molds), gefüllt mit Gewebekleber (Jung, Tissue Freezing Medium), verwendet. Um Schäden an der Gewebestruktur zu vermeiden, wurden die Einbettförmchen in Aceton-Trockeneisgemisch-gekühltes Pentan überführt, um ein möglichst schnelles und gleichmäßiges Durchfrieren zu gewährleisten. Bis zum Schneiden wurden die Probenblöcke nach vollständigem Durchfrieren bei -80°C gelagert.

An einem Leica-Kryostaten (CM3050S) wurden coronale Schnitte entlang der posterioren-anterioren Achse von Bregma -15,96 mm (*Medulla oblongata*) bis Bregma -8,40 mm (*Aqueduct*) angefertigt. Die Schnitte hatten eine Dicke von 14 µm und wurden in Fünfer-Serien auf beschichtete Objektträger (Super frost ultra) aufgebracht. Die ersten fünf Schnitte befanden sich somit auf verschiedenen Objektträgern, erst der sechste Schnitt wurde wieder auf demselben Objektträger wie der erste platziert. Somit unterschieden sich alle Schnitte eines Objektträgers jeweils um 70 µm.

Die Lagerung der Schnitte erfolgte in Objektträgerkästen bei -80°C.

#### **4.1.1.2 Fixierung durch organische Lösungsmittel – Aceton**

Nicht alle kommerziell erhältlichen Antikörper sind für Aldehyd-fixiertes Gewebe geeignet und so erfordert ein negatives Färbeergebnis die Fehlersuche auch bei der Fixierungsme-

thode. Um den Effekt der Aldehyde auf die Proteinstruktur zu umgehen, wurden Schnitte von frischem Gewebe angefertigt.

Dazu wurden adulte Ratten tief mit Halothan betäubt, bis sie keine Reaktion mehr auf schmerzhaft stimuli zeigten. Anschließend wurden sie mit körperwarmem PBS intrakardial perfundiert, um nahezu blutleeres Gewebe zu erhalten. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert. Das Einfrieren und Schneiden der Hirne erfolgte analog wie im Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben. Auch bei den frischen Hirnschnitten bedurfte es einer Fixierung, um die Gewebestruktur für nachfolgende Färbungen und Auswertungen zu erhalten. Hierzu wurde gekühltes Aceton benutzt und die Schnitte wurden 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einer kurzen Trockenphase wurden die Schnitte in PBS rehydriert bevor sich direkt die Färbungen anschlossen.

## **4.1.2 Färbungen**

### **4.1.2.1 Nisselfärbung**

Um die einzelnen mit der Atmung assoziierten Zentren lokalisieren zu können, mussten die Schnitte den korrespondierenden Abbildungen im Rattenatlas (Paxinos, 2007) zugeordnet werden. Um diese Zuordnung zu erleichtern, wurde jeweils eine der Fünfer-Schnitt-Serien mit Thionin gefärbt, einem basischen Farbstoff, der vorrangig an saure Zellorganellen bindet. Es kommt hierdurch zu einer Anfärbung der Ribosomen und Zellkerne im Soma der Neuronen.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden 2 min in der Thioninlösung inkubiert und im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Als Eindeckmedium diente Histokit II.

### **4.1.2.2 Antikörperfärbung**

Bei der Antikörperfärbung nutzt man die Spezifität der Immunglobuline (Ig), die auf das Eindringen eines fremden Antigens hin gebildet werden. Man unterscheidet verschiedene Ig-Klassen, wobei in der Immunhistochemie hauptsächlich IgGs und IgMs zum Einsatz kommen. Zur Produktion dieser Antikörper werden verschiedene Säuger genutzt, von der Maus bis hin zum Affen. Polyklonale Antikörper werden hierbei von verschiedenen B-Lymphozyten im Immunsystem des Wirtes produziert und entstehen als Reaktion auf die Immunisierung mit einem Antigen. Sie erkennen verschiedene Epitope. Der Prozess zur Generierung eines monoklonalen Antikörpers ist im Gegensatz dazu wesentlich zeitaufwändiger, er richtet sich nur gegen ein Epitop des Antigens.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (siehe 3.4.1) sind kommerziell erhältlich, daher wird auf deren Herstellung nicht näher eingegangen.

Während sich die muskarinischen AChRs zumindest in einigen Aminosäuresequenzen gleichen, sind die nikotinischen Rezeptoren aus mehreren meist verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Es war daher möglich, für die mAChRs einen speziellen monoklonalen Antikörper M35 zu verwenden, der in der Lage ist, alle fünf bislang entdeckten Subtypen zu detektieren (Carsi-Gabrenas et al., 1997).

Für die nikotinischen Rezeptoren mussten Untereinheiten-spezifische Antikörper verwendet werden, wobei  $\alpha_7$ , ein Homomer bestehend aus fünf identischen Untereinheiten, und  $\beta_2$ , repräsentativ für das Heteromer aus  $\alpha_4$  und  $\beta_2$ , für die am häufigsten im Säuger ZNS vorkommenden Subtypen zum Einsatz kamen. Des Weiteren wurden polyklonale Antikörper für drei wichtige mAChRs  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  eingesetzt.

Verschiedene Sekundärantikörper wurden getestet, die sich sowohl in der Wirts-Spezies, in der Pre-Adsorption als auch in den gekoppelten Farbstoffen oder Enzymen unterschieden. Für die Auswertung wurden hauptsächlich enzymatische Färbungen durchgeführt, da bei dieser Methode nicht die Gefahr besteht, dass das Signal ausbleicht und so mehr Zeit für die Lokalisierung der einzelnen Hirnareale bestand. Parallel wurden jedoch auch Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt, um die Technik für spätere Co-Färbungen zu etablieren.

### **ABC Technik**

Zur Signalamplifikation wurde die ABC (Avidin-Biotin-Complex) Technik benutzt. Nach der Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper folgt hierbei ein weiterer Inkubationsschritt mit einem gekoppelten Streptavidin-Komplex. Bei Streptavidin handelt es sich um ein reineres biotechnologisch hergestelltes Protein, im Gegensatz zu dem früher verwendeten Avidin, dessen Namen die Methode trägt. Gekoppelt ist dieser Komplex entweder mit einem Enzym wie Alkalische Phosphatase oder Peroxidase oder mit einem Fluorochrom wie Cy3 oder Cy2. Der Streptavidin-Komplex bindet nun an den biotinylierten Sekundärantikörper und der Antigen-Antikörper-Komplex kann entweder direkt visualisiert werden, wie im Fall von Fluoreszenzfarbstoffen, oder es bedarf der Zugabe eines Chromogens, wie DAB oder AEC.

In dieser Arbeit kamen verschiedene gekoppelte Streptavidine zum Einsatz, je nachdem ob eine Fluoreszenz-Färbung durchgeführt werden sollte, oder eine Färbung zur Auswertung.

### **Demaskierung**

Paraformaldehyd führt zu einer Quervernetzung der Proteine, weshalb es sehr häufig als Fixans eingesetzt wird. Der Nachteil ist, dass es durch diese Quervernetzung zu Veränderungen an der dreidimensionalen Proteinstruktur oder zur Maskierung bestimmter Proteinbereiche kommen kann, die in nachfolgenden Färbungen für die Antikörper nicht mehr zugäng-

lich sind. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist ein Demaskierungsschritt, der der eigentlichen Antikörperfärbung vorangestellt wird. Dieser Schritt kann entweder enzymatisch unter Einsatz von Proteasen, wie z. B. Pepsin, erfolgen, oder durch Hitze. So kann die durch Formalin verursachte Proteinvernetzung durch Erhitzen der Proben in einer kalziumpräzipitierenden Lösung wie z. B. Citratpuffer zum Teil wieder aufgehoben werden (Noll and Schaub-Kuhnen, 2000).

Für alle verwendeten Antikörper erwies es sich als notwendig, bei der Verwendung von PFA perfundiertem Gewebe einen Hitze-Demaskierungsschritt durchzuführen. Nur so konnten konstante und signalstarke Färbungen erzielt werden. Hierzu kam eine 0,01 M Natrium-Citratpufferlösung mit einem pH-Wert von 6 zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte in einer mit Pufferlösung gefüllten Plastikzuvette, die mit Hilfe eines handelsüblichen Dampfgärers für 30 min erhitzt wurde. Anschließend wurden die Proben bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur im Puffer belassen, mit PBS gewaschen und den normalen Färbeprotokollen unterzogen.

### **Färbeprotokolle**

Die einzelnen Parameter der Färbeprotokolle mussten durch zahlreiche Versuchsreihen etabliert werden.

Sowohl die Antikörperkonzentrationen als auch die Inkubationszeit und -temperatur wurden experimentell bestimmt und anhand der Signalstärke beurteilt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Block- und Antikörperpuffer in ihrer Auswirkung auf das Färbeergebnis getestet. Die Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt oder in Shandon Coverplates (Thermo Scientific), die es erlaubten, die Objektträger mit einer sehr geringen Flüssigkeitsmenge (100 µl) auch über längere Zeit ohne Austrocknen bedeckt zu halten.

### **Acetonfixiertes Gewebe**

Nach der Acetonfixierung und Rehydrierung in PBS wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit Blockierlösung, die jeweils 5 % des Serums der Wirtsspezies des Sekundärantikörpers enthielt, blockiert. Es folgte die Inkubation mit Primärantikörpern in PBS über Nacht bei RT. Nach 3 Waschschritten mit PBS für jeweils 5 min folgte die Inkubation für 2 Std mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls in PBS verdünnt wurde.

Zur Kernfärbung wurde 4',6 Diamidin-2-phenylindol DAPI verwendet.

### **PFA perfundiertes Gewebe**

Der erste Schritt des Färbeprotokolls bestand aus einer Demaskierung für 30 min. in 0,01 M Citratpuffer (pH 6). Anschließend wurden die Schnitte für 30 min. bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt und in PBS Puffer überführt. Es folgte ein einstündiger Blockierschritt mit 5 %-igem Normalserum in PBS, woran sich die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht an-

schluss. Die Inkubationszeit für den Sekundärantikörper lag bei 2 Std. bei RT. Falls ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet wurde, folgte nach drei Waschschritten die einstündige Inkubation mit gekoppeltem Streptavidin. Das Chromogen wurde auf dem Objektträger belassen bis ein Farbumschlag festgestellt werden konnte. Bei Fluoreszenzfärbungen erfolgte zumeist eine Kernfärbung mit DAPI, bei immunhistochemischen Färbungen eine Gegenfärbung mit Hämalan.

#### **4.1.2.3 Doppelmarkierungen**

Mit den eingesetzten Antikörpern wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Zum einen wurde überprüft, ob in einigen Zellen verschiedene Subtypen der AChRs exprimiert werden. Des Weiteren war von Interesse, ob AChR-exprimierende Neuronen auch durch andere an der Atmung beteiligte Transmittersysteme beeinflusst werden. Hierzu wurden Co-Färbungen mit AChR-Antikörpern und Antikörpern für den Serotonin 1<sub>A</sub> Rezeptor durchgeführt.

Die eingesetzten Antikörper wurden hierzu parallel angewendet, so dass die Inkubationsschritte jeweils mit zwei Primär- und zwei Sekundärantikörpern erfolgten. Hierbei war zu beachten, dass die Primärantikörper nicht aus derselben Wirtsspezies stammen durften und die Sekundärantikörper nicht mit den Primärantikörpern kreuzreagierten.

#### **4.1.2.4 Kontrollen**

Falls erhältlich, wurden Kontrollpeptide verwendet, um die Spezifität des Primärantikörpers zu überprüfen. Es handelt sich hierbei um kurze Proteinstücke mit der Aminosäuresequenz, die bei der Herstellung des Antikörpers zur Immunisierung des Tieres verwendet wurde. Durch eine Prä-Inkubation von Antikörper und Protein, welches in 5-fachem Überschuss eingesetzt wurde, erfolgte eine Absättigung der spezifischen Bindestellen.

Die zu erwartende Färbung sollte daher sehr schwach oder gar nicht vorhanden sein. Für die restlichen Antikörper wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen mitgeführt, bei denen anstelle der Primärantikörper eine Inkubation mit PBS und Serum erfolgte.

### **4.1.3 Auswertung**

Die Objektträger wurden mikroskopisch am Axioplan bzw. am Axiovert 200 ausgewertet. Für Fluoreszenz-Aufnahmen wurde eine über AxioVision gesteuerte Axio-CamHR verwendet. Hellfeld-Aufnahmen wurden mit einer PixeLINK und der AndorIQ Software durchgeführt. Die Fotos wurden in Kontrast und Helligkeit mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware (Gimp) angepasst.

Zum Projektende eröffnete sich die Möglichkeit ein HistoFAX (TissueGnostics) zum Einscannen der Objektträger zu nutzen, um sie im Anschluss mit der HistoQuest-Software auszuwerten. Die Software erlaubt gefärbte Zellen auf Grund von bis zu neun verschiedenen Parametern wie z. B. Durchmesser und Farbintensität zu analysieren. Das Ergebnis wird

dabei anhand eines DotBlots wie bei konventionellen FACS-Geräten ausgegeben. Innerhalb eines Schnitts wurden verschiedene regions of interest (RIOs) definiert, die den Atemzentren entsprachen. Nach Vorgabe der Farbtöne für Zellkerne (Hämalaun) und Cytoplasma (DAB) erfolgte durch die Software das Auszählen der positiv gefärbten Neuronen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in dem entsprechenden Bereich.

## 4.2 Western Blot

Um die Zuverlässigkeit der eingesetzten Primärantikörper zu überprüfen, wurden Western Blots mit Ratten-Gehirn-Extrakten durchgeführt. Da sich die Antikörper teilweise spezifisch gegen nur eine AChR-Untereinheit richten, sollte nur eine Bande mit der entsprechenden Proteingröße im Blot sichtbar werden.

### 4.2.1 Proteinaufreinigung

Die eingesetzten Proteine wurden aus Gehirnen männlicher ausgewachsener Ratten gewonnen. Nachdem die Tiere mit CO<sub>2</sub> betäubt und durch zervikale Dislokation getötet wurden, wurde der Schädelknochen geöffnet und das Gesamtgehirn schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Anschließend wurde das Gewebe in Lysispuffer mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C mit 800 g für 10 min um die größeren Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde nun in einer Ultrazentrifuge bei 4°C mit 20.000 g für 30 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in Lysis Puffer resuspendiert, bevor sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C mit 20.000 g in der Ultrazentrifuge anschloss. Sowohl Pellet als auch Überstand aus diesem letzten Aufreinigungsschritt wurden zur Proteinbestimmung eingesetzt und anschließend bei -20°C gelagert.

### 4.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Fraktionen erfolgte im Anschluss an die Aufreinigung mit Hilfe des kommerziellen BC Assay protein Quantification Kit, der Firma interchim, Frankreich.

### 4.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Die aufgereinigten Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-Gels (NuPage, 4-12 % Bis-Tris Gel, Invitrogen) nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wurden unterschiedliche Proteinmengen, im Bereich von 5 bis 25 µg, eingesetzt. Verglichen wurde des Weiteren die Auswirkung des Kochens auf die Proteinstruktur. Während Proteine zumeist vor der Gelelektrophorese in Probenpuffer aufgekocht werden, um durch das enthaltene DTT und die Hitze eine komplette Denaturierung zu erreichen, neigen Membranproteine bei höheren Temperaturen zur Bildung

von Aggregaten. Die Proben wurden daher entweder für 5 min bei 95°C erhitzt oder nur 5 min bei 37°C inkubiert.

Die Gele wurden in die Novex Mini Cell Gelkammer eingespannt, die Kammer im Anschluss mit Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese für 60 min bei 150V (Bio Rad Power Supply) gestartet. Geblottet wurde in einer Mini Protean Blotkammer (Bio Rad), gefüllt mit Transferpuffer und 1 ml NuPage Antioxidant (Invitrogen), für 60 min bei 350 mA. Im Anschluss an den Blot wurden die Membranen 3 mal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 min bei RT mit Blockierlösung inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht, nach vier Waschschritten von jeweils 5 min wurde für 2 Std mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Falls es sich hierbei um einen Biotin-konjugierten Antikörper handelte, folgte die Inkubation für weitere 30 min mit Infrarot-gelabeltem Streptavidin. Anschließend wurde die Membran gründlich gewaschen und bis zu ihrer Auswertung entweder in dH<sub>2</sub>O belassen oder getrocknet und in selbstklebende Klarsichtfolie eingefasst.

Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte an einem Odyssey Infrarot Imager.

### 4.3 Perfundierte Hirnstammpräparation

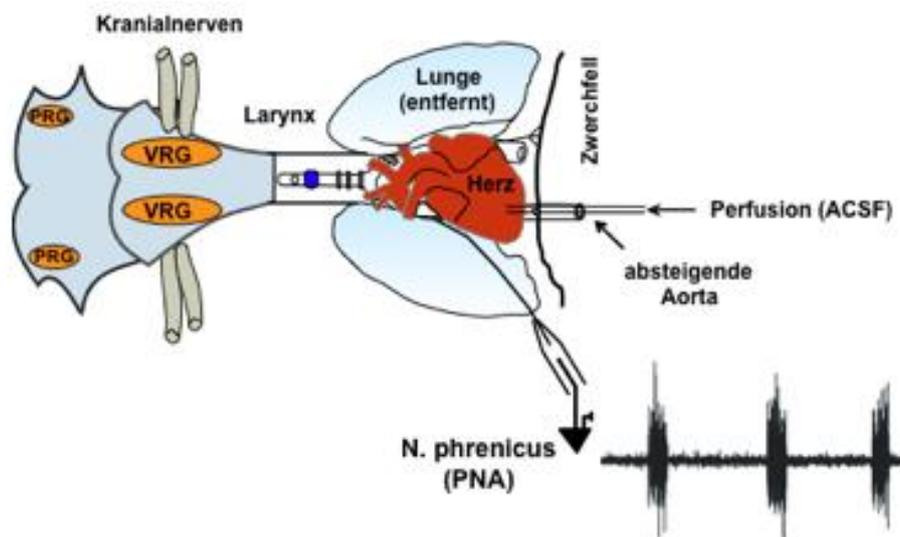
Die weiblichen Ratten wurden initial mit Halothan tief narkotisiert, bis keinerlei Reaktionen auf nozizeptive Stimuli zu beobachten waren. Der Schädel wurde dorsal geöffnet, und die Ratte präcolliculär decerebriert und cerebellektomiert bevor sie unterhalb des Diaphragmas durchtrennt wurde. Das Präparat wurde danach sofort in kalte (4 °C), mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begaste, künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrosppinal fluid, ACSF) überführt. Der pH-Wert der Lösung betrug nach Oxygenierung mit Carbogen  $7,35 \pm 0,05$ . Um zu verhindern, dass Haare den Perfusionskreislauf verstopfen, wurde das Präparat gehäutet. Bauchorgane, wie Leber und Magen, wurden entfernt. Der Thorax wurde durch Beseitigung der Rippenwände geöffnet. Die der Wirbelsäule ventral anliegende Aorta wurde frei präpariert und der thorakale Teil der Wirbelsäule weitgehend entfernt, um bessere Sicht auf die übrigen Brustorgane zu erhalten. Der linke Ast des *Nervus phrenicus* (PN) wurde isoliert und vom umgebenden Gewebe befreit. Nach der Überführung des Präparates in eine Perfusionskammer wurde die absteigende Aorta mit einem Doppellumenkatheter kanuliert, über den das Präparat während des Versuches über eines der beiden Lumen mit ACSF retrograd perfundiert wurde.

Zur Perfusion wurden 200 ml ACSF mit 2,5 g Ficoll®, einem Saccharose Polymer, modifiziert. Durch dessen osmotische Eigenschaften wurde verhindert, dass die Perfusionslösung durch die kolloidosmotische Druckdifferenz zwischen Gewebe und Flüssigkeit, ins Gewebe abgepresst wird und sich Ödeme bilden. Die Perfusionslösung wurde mit Hilfe eines Wärmetauschers (Eigenbau Werkstatt Georg August Universität Göttingen, Physiologisches

Institut) auf 31 °C erwärmt. Über das 2. Lumen des Aortenkatheters wurde der Perfusionsdruck registriert. Am Anfang der Perfusion sollte eine Flussrate von 28 bis 32 ml/Minute nicht unterschritten werden, um das Gewebe zu reoxygenieren. Nach etwa 6 bis 8 min kam es im Präparat zu Kontraktionen der Atmungsmuskulatur, die im weiteren Versuchsverlauf durch systemische Gabe von 0,3 - 0,5 mg des Muskelrelaxans Pancuroniumbromid unterdrückt wurden. Abb. 5 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

#### 4.3.1 Ableitung kardiovaskulärer und respiratorischer Parameter

Die Aktivität des isolierten *N. phrenicus* wurde mit Hilfe einer Saugelektrode abgeleitet und die Signale mittels Differenzialverstärker verstärkt. Ein nachgeschalteter Analog-Digital Wandler digitalisierte die Signale, um sie anschließend mit der Chart Software dazustellen. Durch die Nähe des PN zum Herzen konnte über die Saugelektrode nicht nur seine Aktivität (*phrenic nerv activity*, PNA), sondern auch das Elektrokardiogramm (EKG) aufgenommen werden. Der Perfusionsdruck wurde über ein Lumen des Doppellumenkatheters mit Hilfe eines Druck-Transducer intra-arteriell gemessen und digitalisiert dargestellt. Dies war vor allem zu Beginn des Versuches nötig, um die optimale Perfusionsrate des Präparates zu überwachen. Der Druck wurde während der Versuche auf 60-80 mmHg gehalten.

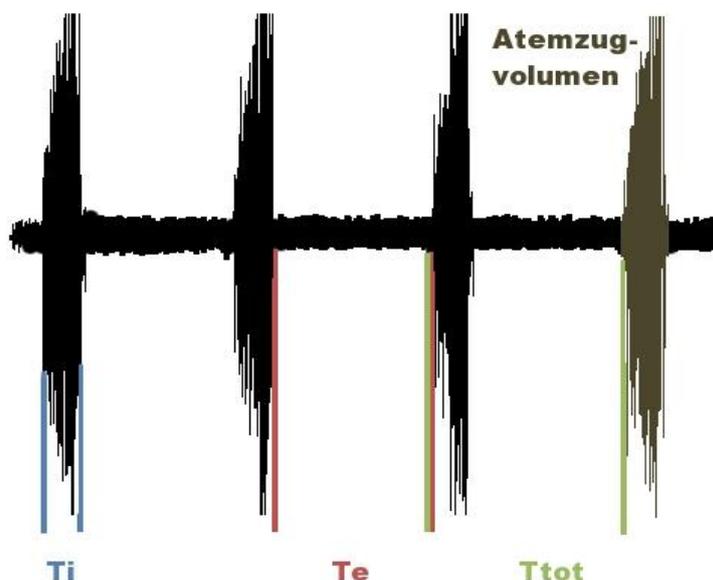


**Abb. 5:** Schematische Darstellung der perfundierten Hirnstammpräparation, die als Grundlage der physiologischen Experimente diente. Das Präparat wird über die absteigende Aorta mit einer modifizierten ACSF mit Sauerstoff versorgt. Peripher diente die Aktivität des *Nervus phrenicus* (PNA) als Index für die Atmungsaktivität.

#### 4.3.2 Auswertung und Statistik.

Um die pharmakologischen Effekte auf die Atmungsaktivität in der WHBP zu untersuchen, wurde die Zykluslänge  $T_{\text{tot}}$  (Beginn der PNA Entladung bis Beginn der nächsten PNA), Inspirations- ( $T_i$ ) und Expirationsdauer ( $T_e$ ), sowie das Atemzugvolumen/min anhand der integrierten PNA analysiert und statistisch ausgewertet. Abb. 6 zeigt ein Beispiel für eine abge-

leitete *Nervus Phrenicus* Aktivität unter Kontrollbedingungen. Zur Veranschaulichung sind die jeweils bestimmten Parameter farblich eingezeichnet.



**Abb. 6:** PNA unter Kontrollbedingungen, farblich eingezeichnet sind die verschiedenen Atemparameter, die während der Versuche bestimmt wurden.

Das Atemzugvolumen wurde anhand der integrierten PNA berechnet und in Volumen/min angegeben. Alle anderen Werte wurden auch für eine Minute bestimmt und im Anschluss gemittelt.

Alle Analysen der Atmungsparameter wurden offline mittels Chart v5.2.2 Software durchgeführt. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollaktivität normalisiert (= 100 %) und als prozentuale Abweichung von den Kontrollwerten angegeben. Mittelwert, Standardabweichung und p-Value wurden mit Graph Pad Prism (Version 5.03) berechnet. Dem Kruskal-Wallis Test folgte eine Dunn's Multiple Comparison wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurde.

### 4.3.3 Test verschiedener Agonisten und Antagonisten

Sobald sich in der Präparation konstante Atemparameter eingestellt hatten, wurde die Aktivität für mindestens 5 min gemessen, so dass die daraus errechneten Parameter (Inspirationszeit, Expirationszeit, Gesamtzykluslänge, Atemzugvolumen) als Kontrollaktivität für das jeweilige Präparat dienten. Als normale Aktivität in der perfundierten Hirnstammpräparation galt eine durchschnittliche  $T_i$  von 0,8-1,2 s, eine  $T_e$  zwischen 2 und 3 s und eine Frequenz von 15 Atemzyklen pro Minute. Der Blutdruck lag während der Aufnahme der Kontrollaktivität bei ca. 70 mmHg.

Nach Aufnahme der Kontrollaktivität wurden verschiedene Konzentrationen der AChR-Agonisten und Antagonisten (siehe Tabelle 2) in den Sammelbehälter mit Perfusionsflüssigkeit gegeben.

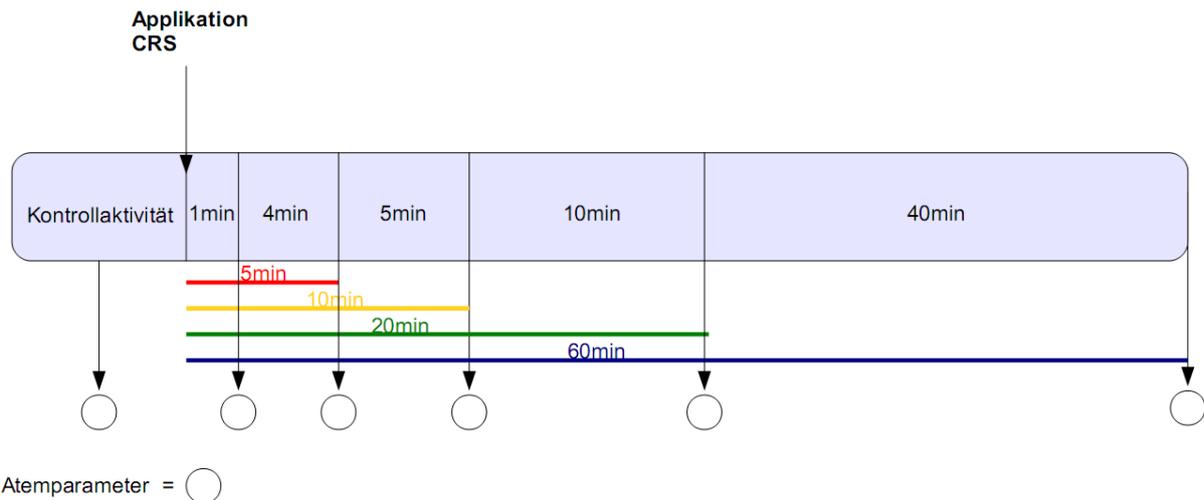
**Tabelle 2:** Zusammenstellung der Gruppengrößen und Konzentrationen für die verschiedenen AChR Agonisten und Antagonisten

| Antagonist                       | Konzentration ( $\mu\text{M}$ ) | Gruppengröße (n) |
|----------------------------------|---------------------------------|------------------|
| TMPH (nAChR)                     | 50                              | 5                |
| DH $\beta$ E ( $\alpha_4$ nAChR) | 40                              | 4                |
| MLA ( $\alpha_7$ nAChR)          | 20                              | 3                |
| Telenzepin ( $M_1$ mAChR)        | 50                              | 2                |
| AQ-RA 741 ( $M_2$ mAChR)         | 25                              | 2                |
| <b>Agonisten</b>                 |                                 |                  |
| Carbachol (AChR)                 | 100                             | 4                |
| Pilocarpin (mAChR)               | 320                             | 2                |
| Lobelin (nAChR)                  | 100                             | 3                |
| 8-OH (5HT $1_A$ )                | 10                              | 5                |
| <b>Organophosphat</b>            |                                 |                  |
| CRS                              | 1,6                             | 5                |

Es dauerte ca. 1,5 min bis die Pharmaka über das Gefäßsystem den Hirnstamm erreichten und erste Effekte zu beobachten waren. Die Atemparameter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Chemikalie bestimmt und mit den Kontrollwerten verglichen.

#### 4.3.4 Organophosphat

Nach dem Test verschiedener Agonisten und Antagonisten der Acetylcholinrezeptoren wurde der Effekt eines Organophosphats in der perfundierten Hirnstammpräparation untersucht. Bei Cortylsarin handelt es sich um ein OP, welches leicht hydrolysiert wird, daher wurde es nicht, wie die anderen rezeptoraktiven Wirkstoffe in das Perfusat appliziert. Zu diesem Zweck wurde ein Dreiwegehahn vor dem Doppellumenkatheter eingebaut, der die direkte Injektion über eine Spritze vor dem Hirnstamm erlaubte. CRS wurde aus einer 1 %-igen Stammlösung in DMSO weiterverdünnt, die Konzentration in dem 1 ml Spritzenvolumen betrug 320  $\mu\text{M}$ . Nachdem die Substanz den Hirnstamm passiert und sich mit den restlichen 200 ml ACSF vermischt hatte, lag eine Konzentration von 1,6  $\mu\text{M}$  im Perfusionskreislauf vor. Die Atemparameter wurden 1 min nach Zugabe des Cholinesterasehemmers gemessen und im weiteren Versuchsverlauf nach 5, 10, 20 und 60 min ausgewertet (siehe Abb.7).



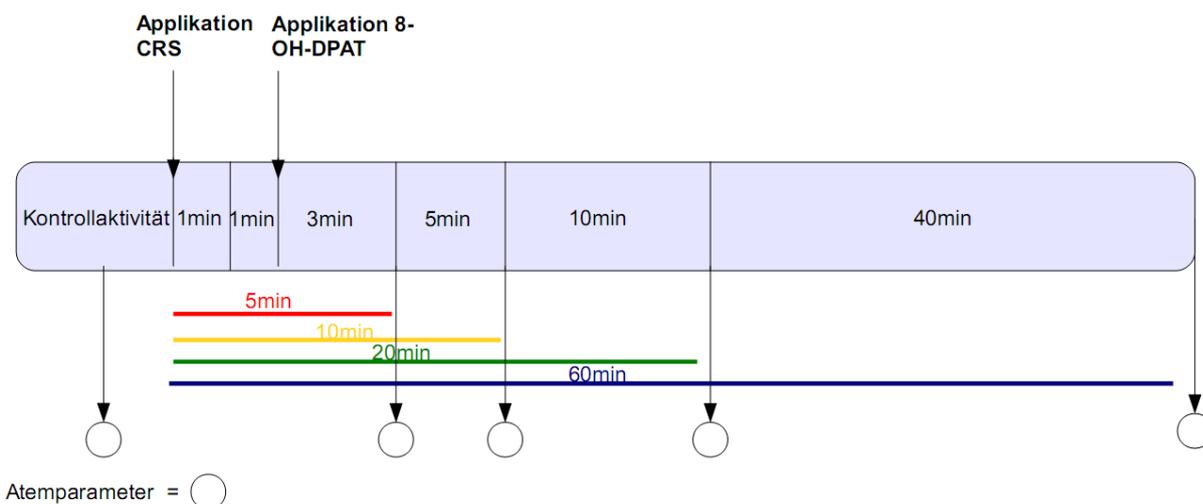
**Abb. 7:** Zeitverlaufschaema für die Bestimmung der Atemparameter nach CRS-Injektion. Die Kreise kennzeichnen die Zeitpunkte zu denen die Atemparameter berechnet wurden. Die farbigen Linien geben die Gesamtzeit an, die seit Versuchsbeginn bis zur Bestimmung der Parameter verstrichen ist.

Als zusätzlicher Parameter bei Einsatz von CRS wurde die Apnoephase bestimmt, die definitionsgemäß die Länge des Zeitraums nach der letzten messbaren Aktivität des *N. Phrenicus* bis zum Beginn einer nachfolgenden Aktivität darstellt.

#### 4.3.4.1 CRS & 8-OH-DPAT

Um zu untersuchen, wie konvergierende Transmittersysteme eine Organophosphatvergiftung beeinflussen können, wurde der Effekt eines Serotonin-Agonisten auf die Atemparameter nach CRS-Vergiftung untersucht. Dabei kam 8-OH-DPAT zum Einsatz, eine Substanz welche agonistisch am 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor wirkt, dessen Vorhandensein und Verteilung mittels Antikörperfärbungen ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit war.

Nach erfolgter Applikation von CRS wie in Abschnitt 0 beschrieben, wurde 2 min später 8-OH-DPAT in einer Konzentration von 10 µM in die Perfusionsflüssigkeit injiziert. Abb. 8 gibt einen Überblick über den genauen Zeitverlauf.



**Abb. 8:** Zeitverlaufschaema für die Bestimmung der Atemparameter nach CRS-Injektion. Die Kreise kennzeichnen die Zeitpunkte zu denen die Atemparameter berechnet wurden. Die farbigen Linien geben die Gesamtzeit an, die seit Versuchsbeginn bis zur Bestimmung der Parameter verstrichen ist.

#### 4.3.4.2 Hypoxie

Die perfundierte Hirnstammpräparation hat den Vorteil zentrale Effekte auf die Atmung separiert von der Peripherie zu betrachten, da die Sauerstoffversorgung des Präparates durch eine externe Perfusionspumpe gewährleistet ist. Um nun einen Kombinationseffekt aus der zentralen Wirkung eines Organophosphats auf die Atmung und zusätzlicher peripherer Effekte zu untersuchen, wurde ein Herzstillstand und daraus resultierende Sauerstoffunterversorgung simuliert. Zu diesem Zweck wurde ein, bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes, Hypoxieprotokoll angewandt, welches in Abb. 9 dargestellt ist.

|              | Akute Hypoxie | Moderate Hypoxie | Leichte Hypoxie | Regeneration |
|--------------|---------------|------------------|-----------------|--------------|
| Pumpleistung | 0 %           | 50 %             | 75 %            | 100 %        |
| Dauer        | 1 min         | 3 min            | 3 min           | 20 min       |

**Abb. 9:** Hypoxieprotokoll

Das Protokoll besteht aus 4 Schritten, beginnend mit 1 min ohne Pumpenumdrehung, so dass kein aktiver Transport von ACSF durch das Präparat stattfindet. Es folgen 3 min moderater Hypoxie, in denen die Pumpleistung bereits wieder auf 50 % gesteigert wird. Es folgen weitere 3 min mit einer 75 %-igen Pumpleistung gefolgt von einer 20 minütigen Regenerationsphase, bei der die Pumpenleistung wieder den Normalbedingungen entspricht. Im Regelfall hieß das bei der verwendeten Rollerpumpe 155 rpm.

Während jeder Phase des Hypoxieprotokolls wurden die Atemparameter bestimmt, ebenfalls der längste Zeitraum ohne PNA (Apnoephase).

Die Injektion von CRS erfolgte unter Normalbedingungen, 1 min nach Injektion wurden wie in den vorangegangenen Versuchen, die Atemparameter bestimmt und nach einer weiteren Minute startete das Hypoxieprotokoll.

Auch bei der Untersuchung eines möglichen Zusammenspiels peripherer und zentraler Effekte auf die Atmung nach Organophosphatvergiftungen wurde der Effekt von 8-OH-DPAT untersucht. Das Hypoxieprotokoll startete 3 min nach CRS-Zugabe, zu diesem Zeitpunkt befand sich 8-OH-DPAT 1 min im Perfusionskreislauf.

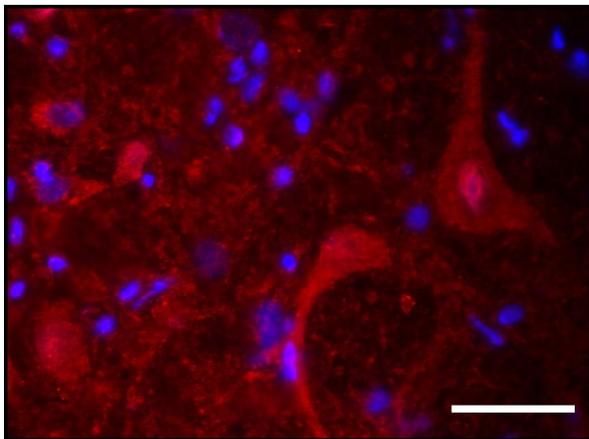
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Immunhistochemie

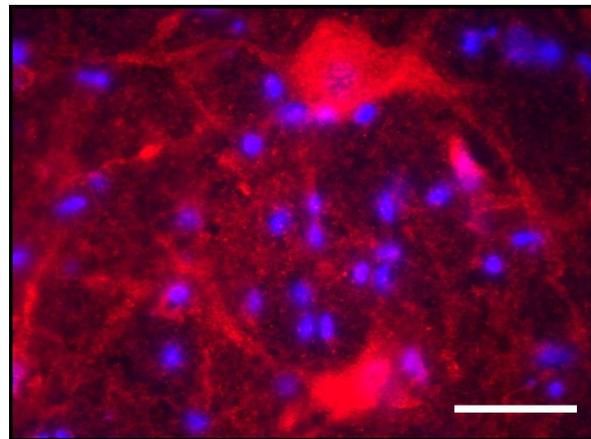
#### 5.1.1 Fixierung

Eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Antikörpern ist nicht in PFA fixiertem Gewebe getestet. Die Herstellerfirma gibt daher in ihrem Datenblatt einen Hinweis, für welche Fixierungsmethode die Antikörper etabliert wurden.

Um zu überprüfen, ob sich mit den Antikörpern Signale im Rattengehirn detektieren lassen, wurden die ersten Versuche mit Aceton-fixierten Gefrierschnitten und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern unternommen, wie vom Hersteller (SantaCruz) empfohlen.

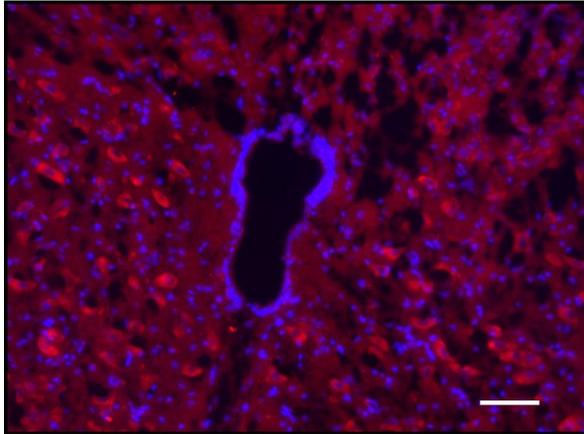


**Abb. 10:** Aceton-fixierter Coronalchnitt des Rattenhirns, Cy3-Färbung (rot) für mACHR  $M_1$ , Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

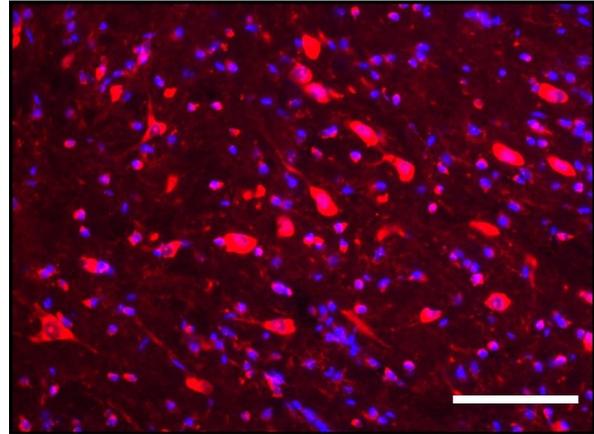


**Abb. 11:** Aceton-fixierter Coronalchnitt des Rattenhirns, Cy3-Färbung (rot) für mACHR  $M_3$ , Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Abb. 10 und Abb.11 zeigen beispielhaft zwei Färbungen für  $M_1$  und  $M_3$  in Aceton-fixiertem Gewebe. Wie zu erkennen ist, wurden gute Färbeergebnisse erzielt, allerdings war der Gewebestrukturerhalt nicht zufriedenstellend, wie sich gut in der Übersicht in Abb. 12 an dem teils löchrigen Gewebe erkennen lässt.



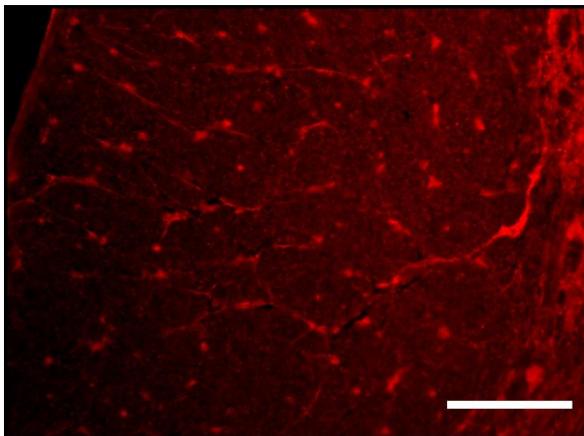
**Abb. 12:** Aceton-fixierter Coronalchnitt des Rattenhirns, Cy3-Färbung (rot) für mAChR  $M_1$ , Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



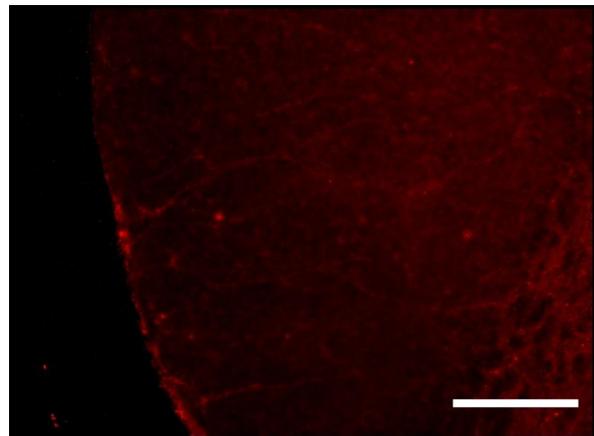
**Abb. 13:** Coronalchnitt des PFA-perfundierten Rattenhirns, Cy3-Färbung (rot) für nAChR  $\beta_2$ , Kernfärbung mit DAPI (blau). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Es wurde daher angestrebt ein Färbeprotokoll zu etablieren, welches den Gebrauch von PFA perfundiertem und postfixiertem Gewebe ermöglicht.

Mit einem Demaskierungsschritt gelang es nun, neben der guten Gewebestruktur in PFA perfundiertem Material, auch auswertbare Signale zu erhalten, was eine morphologische Zuordnung der positiven Rezeptorzellen zu einzelnen Hirnbereichen ermöglichte (siehe Abb. 13).



**Abb. 14:** Coronalchnitt des PFA-perfundierten Rattenhirns, Demaskierungsschritt mit Citratpuffer, Cy3-Färbung (rot) für mAChR  $M_1$ . Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 15:** Coronalchnitt des PFA-perfundierten Rattenhirns, Permeabilisierung mit 0,5 % TritonX, Cy3-Färbung für mAChR  $M_1$ . Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

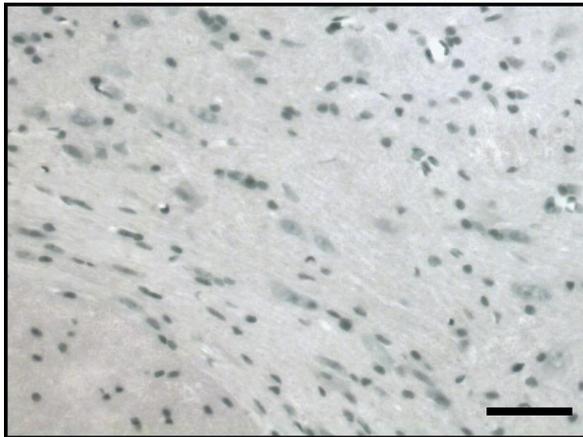
Obwohl nicht alle Antikörper laut Hersteller einen Demaskierungsschritt benötigten, um die Epitope in PFA fixiertem Gewebe wieder zugänglich zu machen, zeigte ein direkter Vergleich der Färbereultate dennoch, dass sich nach einer 30 minütigen Behandlung in heißem Citratpuffer wesentlich mehr Signale detektieren ließen. Abb. 14 und Abb. 15 zeigen jeweils eine Färbung im Bereich der inferioren Olive, wobei in Abb. 14, die sich durch einen Demaskierungsschritt von Abb. 15 unterscheidet, wesentlich mehr Signale für mAChR  $M_1$  detektiert werden können.

### 5.1.2 Negativkontrollen

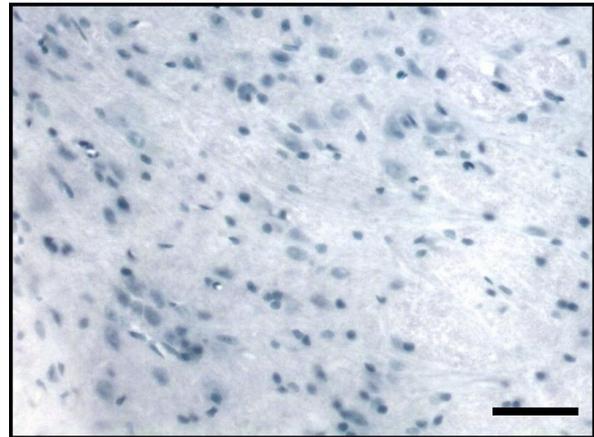
Mit den Negativkontrollen konnte die Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindungen der Primär- und Sekundärantikörper abgeschätzt werden.

Falls vorhanden wurden Kontrollpeptide, wie unter 4.1.2 beschrieben, eingesetzt.

Die folgenden Fotos zeigen immunhistochemische Färbungen, die mit der ABC-Methode durchgeführt und im Anschluss lichtmikroskopisch aufgenommen und ausgewertet wurden.



**Abb. 16:** Färbeargebnis für mAChR M<sub>1</sub> nach Absättigung mit Kontrollpeptid, Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Balken entspricht 50 µm.



**Abb. 17:** Färbung mit mAChR M<sub>3</sub> nach Absättigung mit Kontrollpeptid, Kernfärbung mit Hämalaun (blau) Balken entspricht 50 µm.

Waren keine Kontrollpeptide kommerziell erhältlich, wurden sämtliche Schritte des Färbeprotokolls durchlaufen, jedoch die Inkubation mit dem Primärantikörper ausgespart.

### 5.1.3 Auswertung der Verteilungsmuster

Die Zuordnung der Schnitte zu den jeweiligen Hirnarealen wurde mit Hilfe des Paxinos Rat Brain Atlas vorgenommen (Paxinos, 2007). Als Hilfe bei der Zuordnung der einzelnen Schnitte zu den korrespondierenden Seiten im Hirnatlas dienten mit Thionin gefärbte Schnitte der jeweiligen Serie (vergleiche Abschnitt 4.1.2.1).

Für jeden Antikörper wurden mindestens 3 komplette Schnittserien, *Medulla oblongata* bis *Pons* abdeckend, angefärbt. So konnten im Anschluss repräsentative Schnitte des gesamten Hirnstammes ausgewertet werden. Für jeden Rezeptorsubtypen wurden n = 3 Schnittserien von unterschiedlichen Tieren angefärbt.

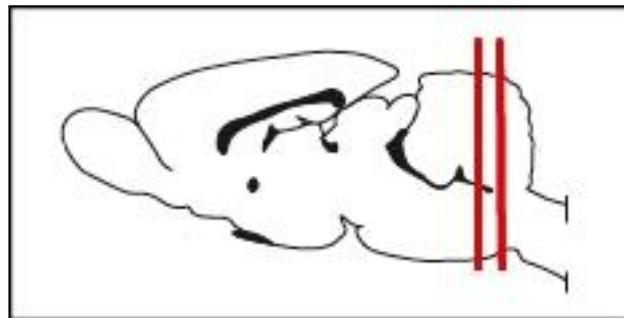
Die Auswertung erfolgte anhand der mikroskopischen Aufnahmen nach visuellen Gesichtspunkten.

Den Kameraaufnahmen vorangestellt, ist jeweils eine schematische Darstellung eines Sagittalschnitts durch das Rattenhirn, in welchen zur Orientierung mittels roter Linien der im Folgenden dargestellte Bereich eingezeichnet ist. Weiterhin angegeben ist die Lage der Schnitte im Verhältnis zu Bregma, definitionsgemäß der Punkt auf dem Schädeldach, bei dem die *Sutura Coronalis*, die das Stirnbein vom Scheitelbein trennt, und die *Sutura Sagita-*

lis, die die beiden Scheitelbeine trennt, zusammentreffen. In einer weiteren schematischen Darstellung ist die Lokalisation des untersuchten Bereichs in einem Coronalchnitt farblich gekennzeichnet.

### 5.1.3.1 DRG

Die folgenden Abbildungen sind beispielhaft für positive Färbeergebnisse, die im NTS mit den getesteten Antikörpern erzielt wurden. Sie erstrecken sich von Bregma -13,56 bis Bregma -12,36. Abb. 18 zeigt in einem schematischen Sagittalschnitt den Bereich, welchem die folgenden Fotos zuzuordnen sind.

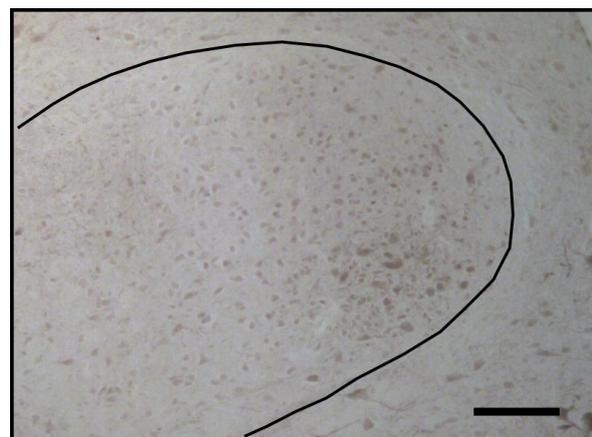


**Abb. 18:** Schematische Zeichnung eines Sagittalschnitts des Rattenhirns. Die roten Linien grenzen den Bereich zwischen Bregma -12,36 und -13,65 ein, die den Figuren 136 bis 146 im Rat Brain Atlas entsprechen.

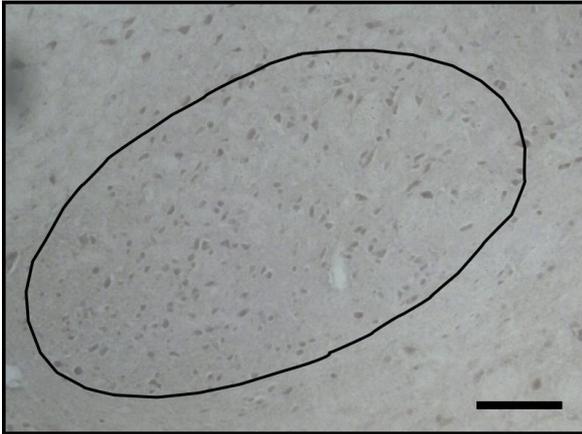
Zur Auswertung wurden hauptsächlich immunhistochemische Färbung mit der ABC-Methode durchgeführt und DAB oder AEC als Substrat eingesetzt. Diese Färbungen bleiben auch über sehr lange Zeiträume stabil, im Gegensatz zu Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen, die, um ein Ausbleichen zu vermeiden, im Dunkeln und kühl gelagert werden müssen. Auf den folgenden repräsentativen Fotos ist der NTS jeweils umrandet dargestellt.



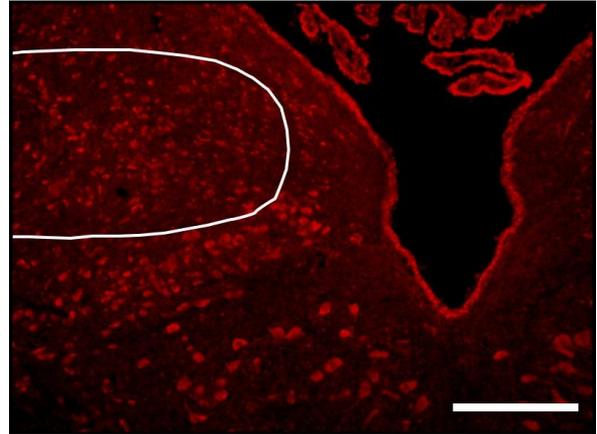
**Abb. 19:** Schematische Darstellung eines Coronalchnitts des Rattenhirns, rot eingezeichnet der NTS.



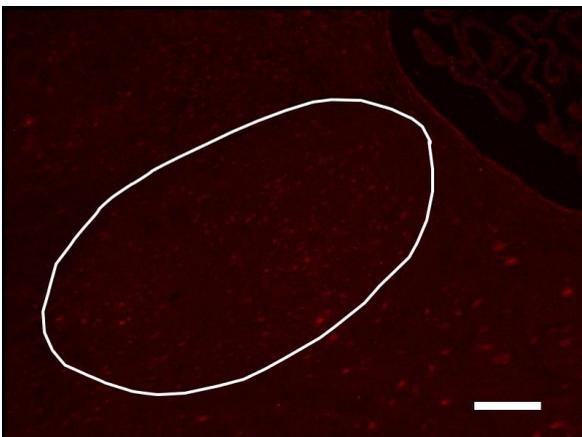
**Abb. 20:** Färbung für nAChR  $\alpha_7$  mit DAB (braun). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



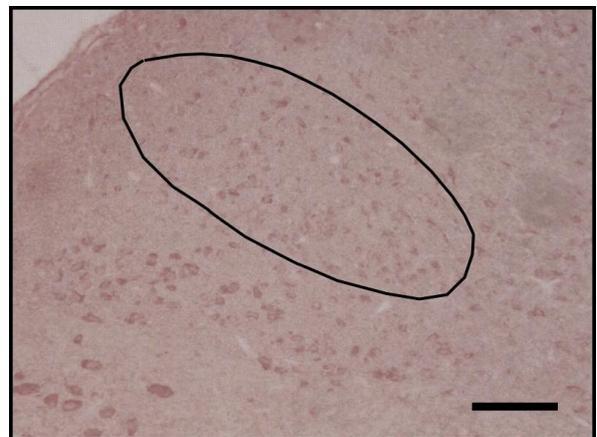
**Abb. 21:** Färbung für mAChR M<sub>2</sub> mit DAB (braun), Balken entspricht 100 µm.



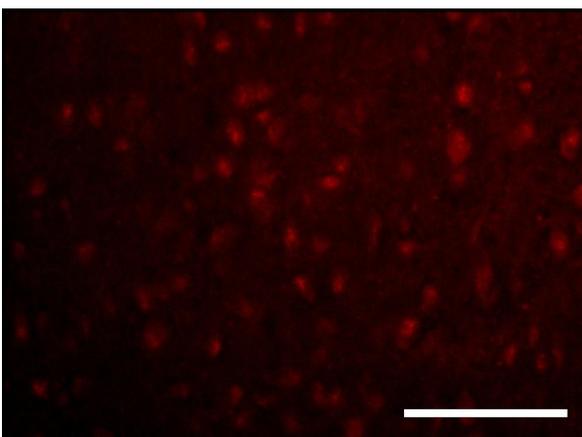
**Abb. 22:** Färbung für alle mAChR Subtypen mit M35 und Cy3 markiertem Streptavidin (rot). Balken entspricht 100 µm.



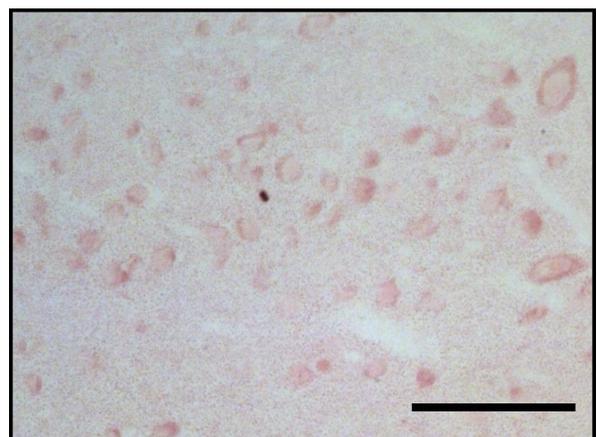
**Abb. 23:** Färbung für mAChR M<sub>1</sub> mit Cy3 (rot), Balken entspricht 100 µm.



**Abb. 24:** Färbung für nAChR β<sub>2</sub> mit AEC (rot). Balken entspricht 100 µm.



**Abb. 25:** Vergrößerter Bereich aus **Abb. 18**; dargestellt sind positiv gefärbte Neuronen im NTS. Balken entspricht 50 µm.



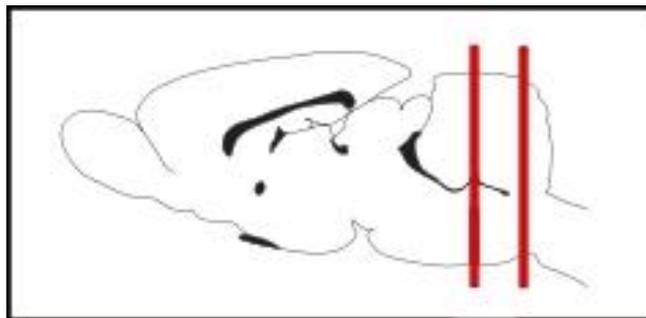
**Abb. 26:** Vergrößerter Bereich aus **Abb. 24**, dargestellt sind mit AEC angefarbte für β<sub>2</sub> positive Neuronen im NTS. Der Balken entspricht 50 µm.

Wie in den Abbildungen 20 bis 26 zu erkennen, konnten mit allen getesteten Antikörpern, sowohl für muskarinische als auch für nikotinische AChRs, Neuronen im Bereich des NTS

angefärbt werden. Die DRG enthielt eine Vielzahl positiver Zellen, die allerdings homogen über den gesamten NTS verteilt waren.

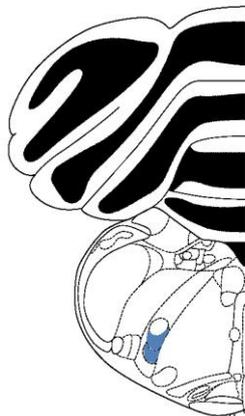
### 5.1.3.2 VRG

Die folgenden Abbildungen zeigen positive Neuronen im Bereich der Ventralen Respiratorischen Gruppe. Die Schnitte decken den Bereich von Bregma -11,88 bis -13,8 ab (Vergleiche Abb. 27). Von caudal nach rostral werden Abbildungen für die verschiedenen Kerngebiete in der VRG gezeigt.

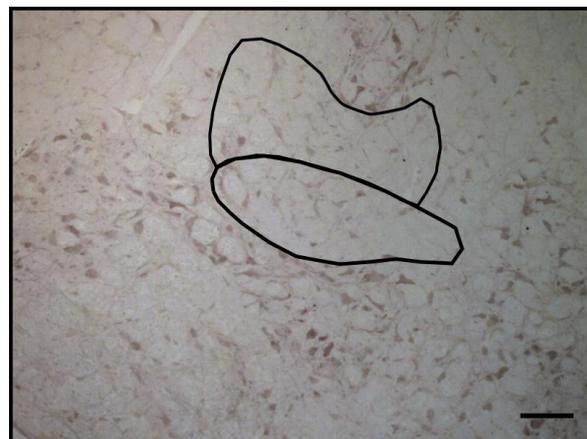


**Abb. 27:** Schematische Zeichnung eines Sagittalschnitts des Rattenhirns. Die roten Linien grenzen den Bereich zwischen Bregma -11,88 und -13,8 ein, die den Figuren 132 bis 148 im Rat Brain Atlas entsprechen.

### rVRG



**Abb. 28:** Schematische Zeichnung eines Coronalchnitts des Rattenhirns, blau eingezeichnet die rVRG.

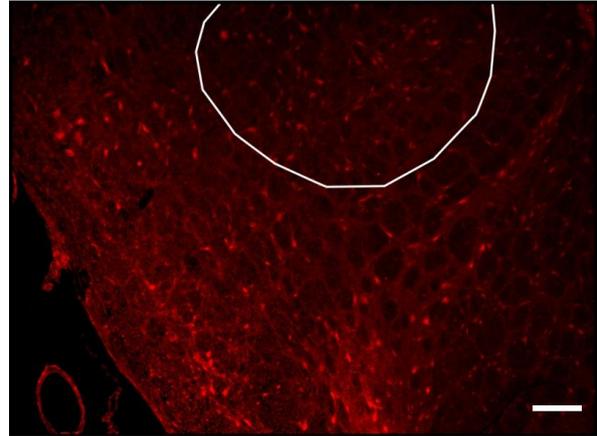


**Abb. 29:** Der obere Bereich entspricht dem rVRG, der untere der C1/A1 Region. Färbung für nAChR  $\alpha_7$  mit DAB (braun). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Abb. 29 zeigt eine positive Färbung für die nikotinische  $\alpha_7$  UE, der obere umrandete Bereich entspricht der rVRG, der untere Bereich entspricht der A1/C1 Zellgruppe, den noradrenergen und adrenergen Neuronen.



**Abb. 30:** Färbung für mAChR M<sub>1</sub>, mit Cy3 markierten Streptavidin (rot). Balken entspricht 200 µm



**Abb. 31:** Färbung für mAChR M<sub>2</sub> mit Cy3 markiertem Streptavidin (rot). Balken entspricht 100 µm.

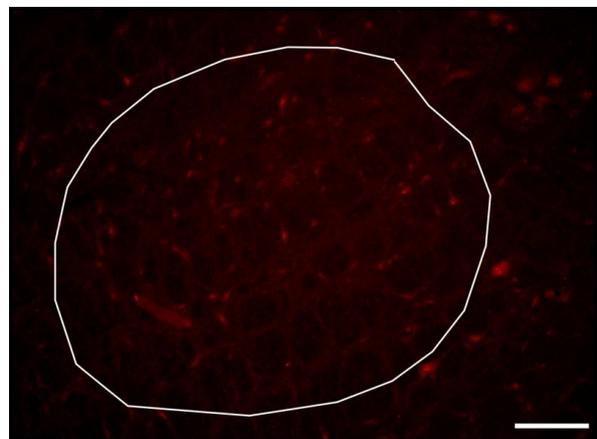
Die in Abb. 30 umrandeten Bereiche entsprechen von links dem caudoventrolateralen *Nucleus reticularis*, gefolgt von der rVRG, welche lateral an den *Nucleus linearis* und dorsal an den subkompakten Teil des *Nucleus Ambiguus* grenzt. In Abb. 31 ist die rVRG eingekreist.

### PräBötzinger Komplex

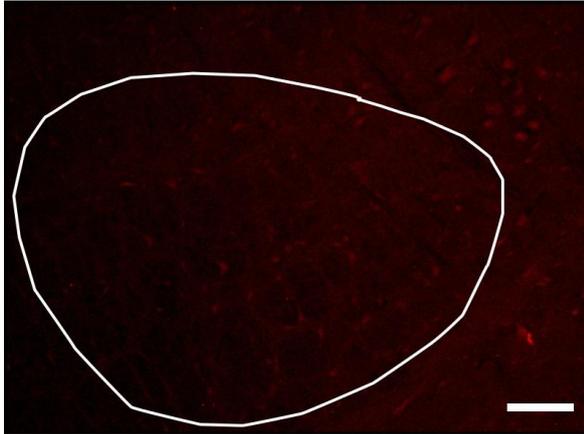
Der PräBötzinger sowie der Bötzinger Komplex ließen sich auf Grund des *Nucleus Ambiguus* eingrenzen, der anhand seiner Form und durch positive Zellen für jeden Rezeptorsubtyp gut zuzuordnen war.



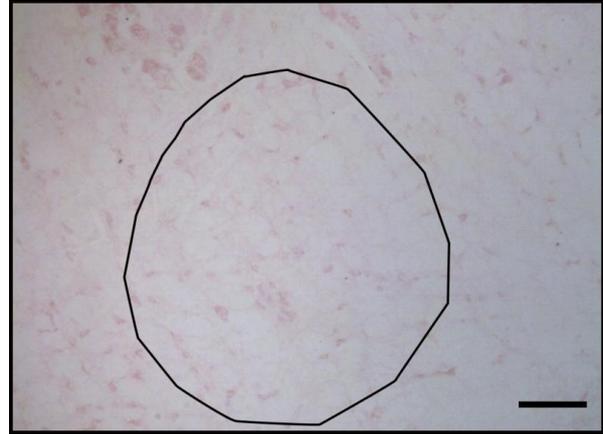
**Abb. 32:** Schematische Zeichnung eines Coronalchnitts des Rattenhirns, blau eingezeichnet der PräBötzinger Komplex.



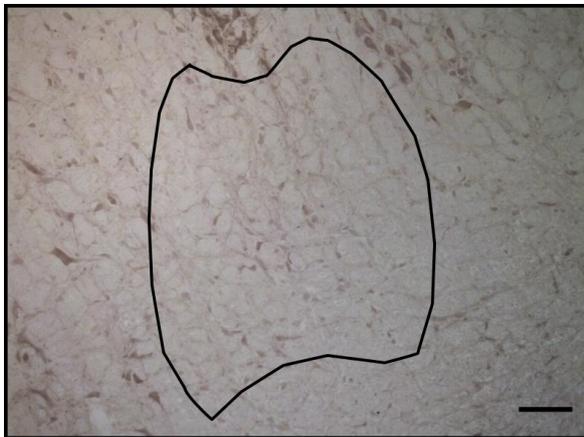
**Abb. 33:** Färbung für mAChR M<sub>1</sub> mit Cy3 (rot). Balken entspricht 100 µm.



**Abb. 34:** Färbung für mAChR  $M_2$  mit Cy3 (rot). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 35:** Färbung für nAChR  $\beta_2$  mit AEC (rot). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

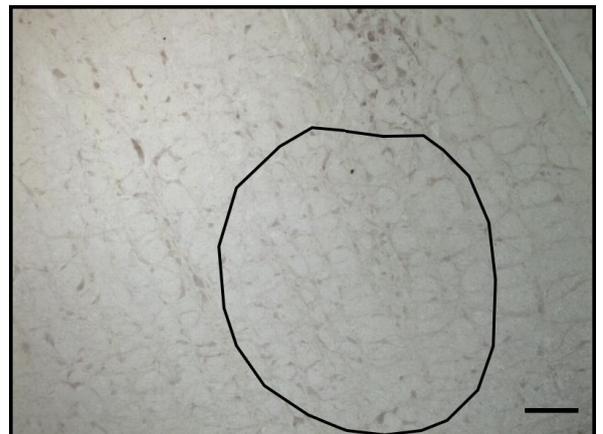


**Abb. 36:** Färbung für nAChR  $\alpha_7$  mit DAB (braun). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

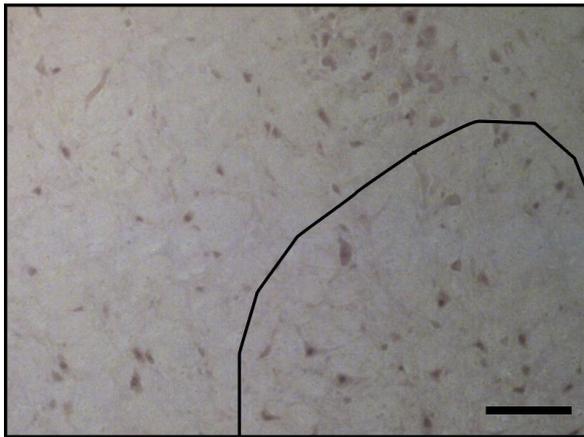
### Bötzinger Komplex



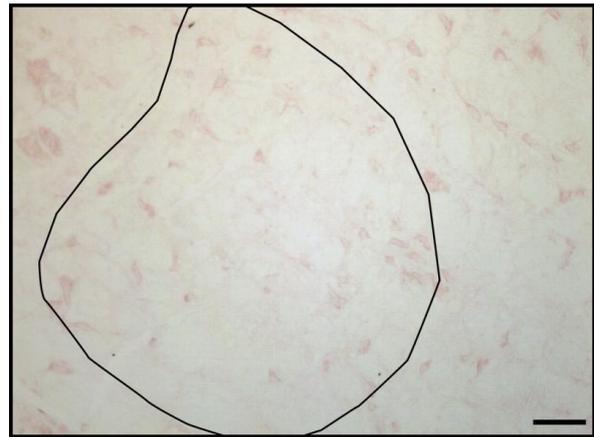
**Abb. 37:** Schematische Zeichnung eines Coronalschnitts des Rattenhirns, blau eingezeichnet der Bötzinger Komplex.



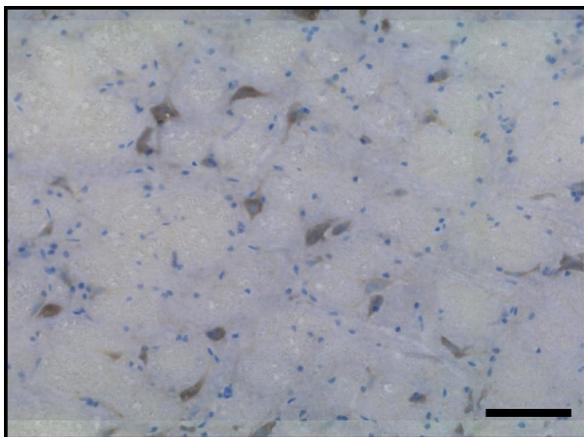
**Abb. 38:** Positive Zellen im Bereich des Bötzinger Komplex, für nAChR  $\alpha_7$  mit DAB (braun). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 39:** Färbung für mAChR M<sub>2</sub> mit DAB (braun). Balken entspricht 50 µm.



**Abb. 40:** Färbung für nAChR β<sub>2</sub> mit AEC (rot). Balken entspricht 50 µm.



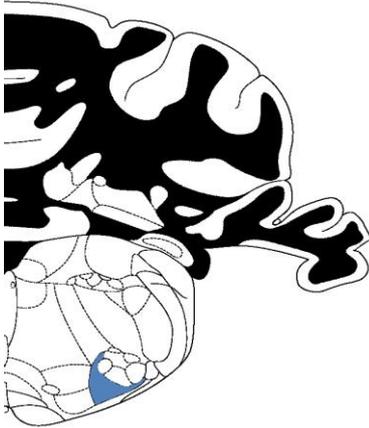
**Abb. 41:** Färbung für mAChR M35 mit DAB (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerter Ausschnitt positiver Zellen im Bötzingner Komplex. Balken entspricht 100 µm.



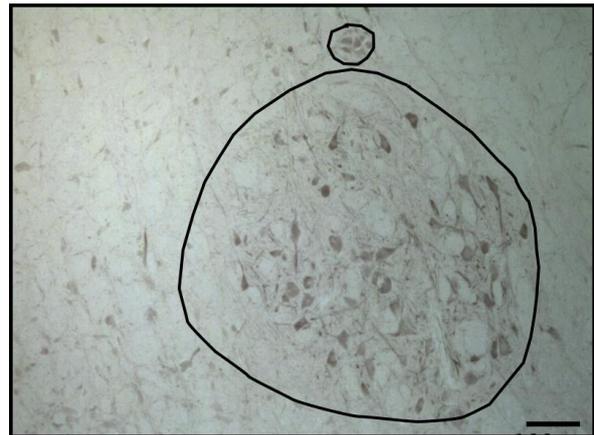
**Abb. 42:** Färbung für mAChR M35 mit DAB (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Balken entspricht 100 µm

### **RTN, Parafaciale Respiratorische Gruppe (pFRG) und *Nucleus Facialis***

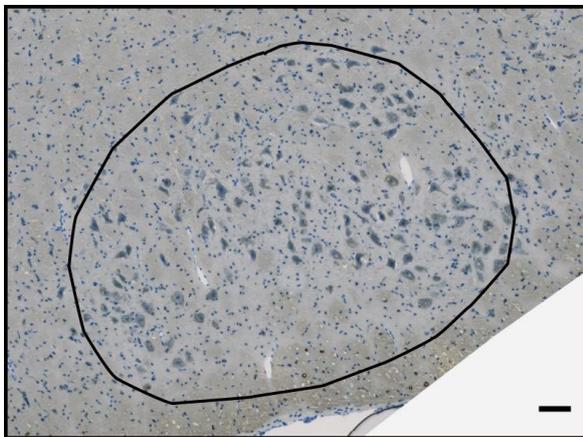
Während sich der *Nucleus Facialis* sehr gut als motorisches Kerngebiet auf Grund großer positiver Neuronen abgrenzen ließ, waren die pFRG und der RTN nicht exakt zu lokalisieren. Die genaue Unterscheidung dieser, sich teilweise überlappenden Kerngebiete, war daher nicht möglich.



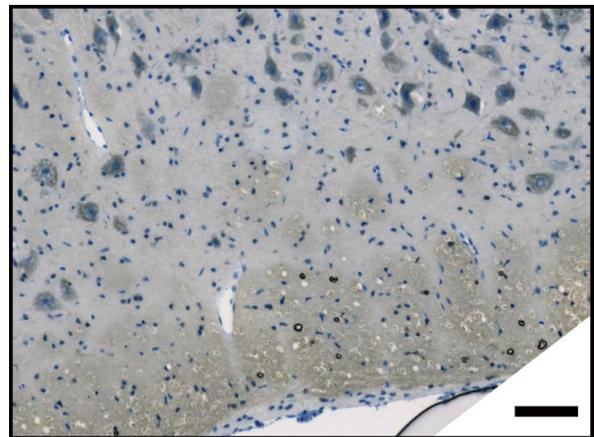
**Abb. 43:** Schematische Zeichnung eines Coronalchnitts des Rattenhirns, blau eingezeichnet die Parafacialis Region.



**Abb. 44:** Färbung für nAChR  $\alpha_7$  mit DAB (braun). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Kleiner eingekreister Bereich *Nucleus motorius nervi facialis*.



**Abb. 45:** Färbung für mAChR  $M_3$  mit DAB (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

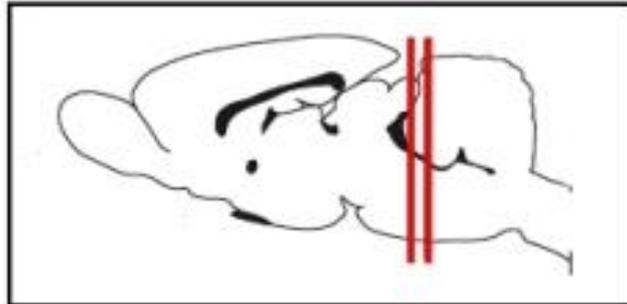


**Abb. 46:** Bereich des Parafacialis aus Abb. 45 vergrößert dargestellt. Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Im Vergleich zur DRG waren in den ventralen Atemzentren für die einzelnen untersuchten Rezeptorsubtypen weniger positive Zellen zu finden. Grundsätzlich waren im NTS allerdings wesentlich kleinere Neuronen mit weniger Cytoplasma vorhanden, verglichen mit den Neuronen der ventralen Areale. Des Weiteren wurde in nur wenigen Fällen eine Kernfärbung mit Hämalaun an die Antikörperfärbung angeschlossen, so dass sich keine genaue Aussage treffen lässt, wie in der VRG das Verhältnis von positiven zu negativen Zellen ist und ob dort tatsächlich weniger AChR-exprimierende Neuronen vorhanden sind.

**PRG**

Die folgenden Abbildungen zeigen positive Färbeergebnisse für Atemzentren im Bereich der Pons. Eingekreist ist jeweils der *Pedunculus cerebellaris superior*, der umgeben ist von dem lateralen bzw. medialen *Nucleus Parabrachialis* und dem Kölliker fuse Nucleus.



**Abb. 47:** Schematische Zeichnung eines Sagittalschnitts des Rattenhirns. Die roten Linien grenzen den Bereich zwischen Bregma -8,76 und -9,48 ein, der den Abbildungen 106 bis 112 im Rat Brain Atlas entspricht.



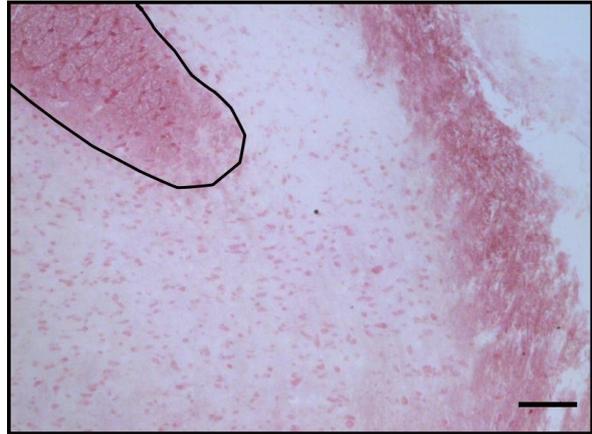
**Abb. 48:** Schematische Zeichnung eines Coronalchnitts des Rattenhirns, gelb eingezeichnet der *Kölliker fuse Nucleus* und der *Nucleus Parabrachialis*.



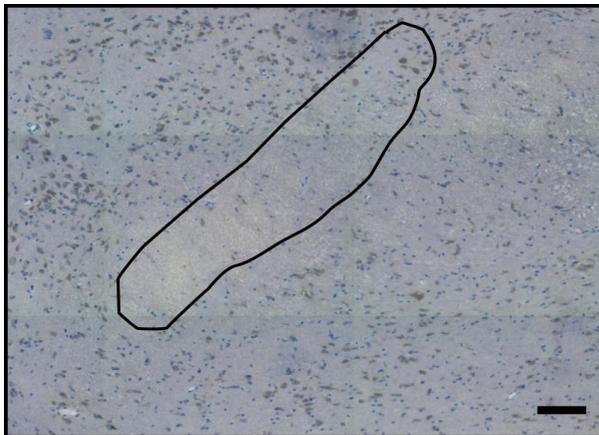
**Abb. 49:** Färbung für nAChR  $\alpha_7$  mit DAB (braun). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 50:** Färbung für mAChR M<sub>2</sub> mit DAB (braun). Balken entspricht 100 µm.



**Abb. 51:** Färbung für mAChR M<sub>3</sub> mit AEC (rot). Balken entspricht 100 µm.



**Abb. 52:** Färbung für mAChR M<sub>35</sub> mit DAB (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Balken entspricht 100 µm (Aufnahme Histoquest).

Zusammenfassend lässt sich über die Färbungen in den Atemzentren sagen, dass jedes Kerngebiet, welches eindeutig zugeordnet werden konnte, sowohl muskarinische AChRs, als auch nikotinische AChRs exprimierende Zellen enthält. Anhand der Aufnahmen wurde der Eindruck gewonnen, dass die DRG und die PRG wesentlich mehr positive Zellen enthalten. Aufgrund der Größe der Zellkörper kann es aber auch durchaus sein, dass in den Bereichen der VRG grundsätzlich weniger Neuronen vorhanden sind.

### 5.1.3.3 HistoQuest

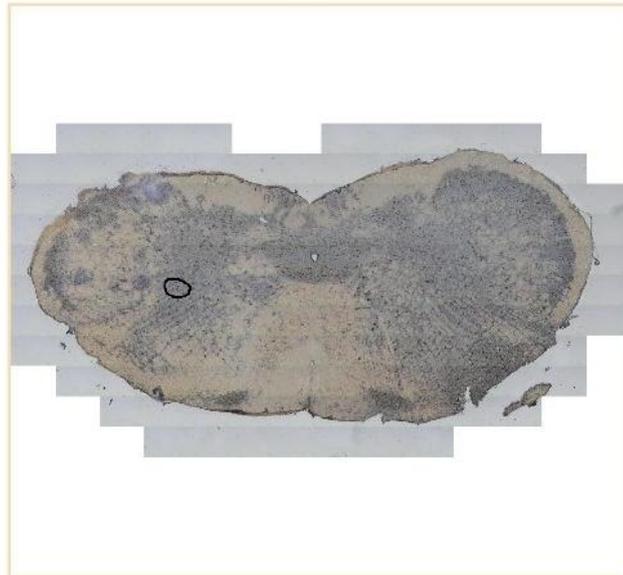
Die sich gegen Ende des Projekts ergebende Möglichkeit, ein HistoFAX mit HistoQuest-Software zur Analyse zu nutzen, wurde für einige gut erhaltene Schnittserien genutzt. Mit Hilfe der Software war es möglich, eine genaue Aufstellung über die positiven Zellen in vorher mit Hilfe des Rat Brain Atlases definierten regions of interest (ROIs) zu erhalten. Des Weiteren konnten alle Objektträger auf diesem Wege digitalisiert und archiviert werden. Die Software speicherte sämtliche Schnitte eines Objektträgers als Übersicht wie in Abb. 53 zu

erkennen und nutzt eine stärkere Vergrößerung zur Detailaufnahme, so dass im Anschluss ein gezieltes Zoomen in einzelne Bereiche des Schnitts möglich ist. In dem folgenden Beispiel wurde die Kernregion des *Nucleus retro-ambiguus* (RAmb) für die Färbung mit dem M35 Antikörper ausgewertet.

### 7 - Region 002: RAmb

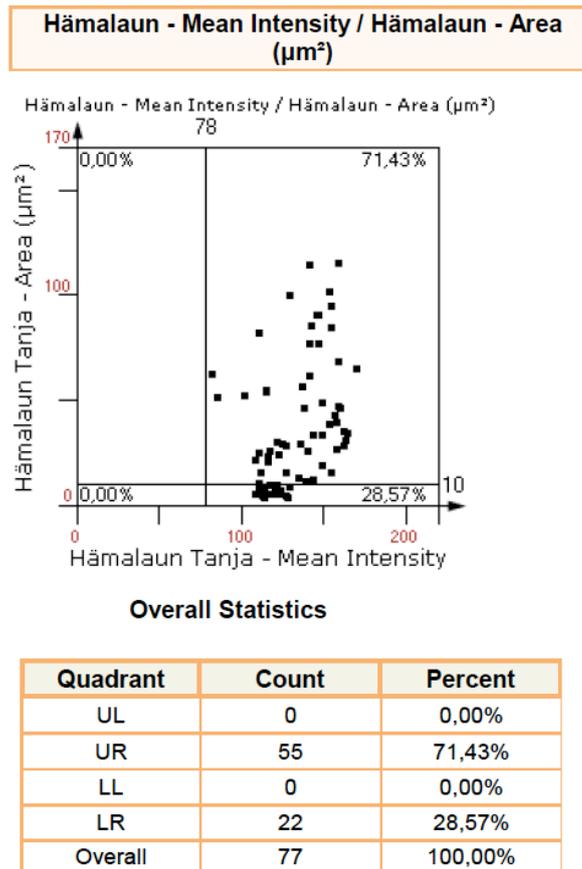
Area:

0,053506 mm<sup>2</sup>



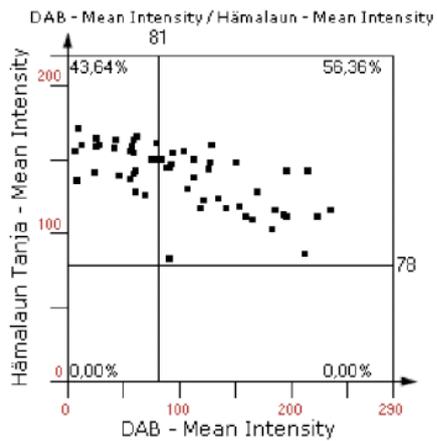
**Abb. 53:** Übersichtsaufnahme eines Coronalchnitts des Rattenhirns, angefärbt sind die mACHRs mit dem M35 Antikörper, visualisiert mittels DAB (braun) und einer Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Die eingekreiste Region entspricht dem RAmb mit einer Fläche von 0,053mm<sup>2</sup>.

Abb. 54 veranschaulicht, die durch die HistoQuest Software erhaltenen Ergebnisse. Dargestellt ist ein Scattergramm in welchem die Größe der Hämalaun-gefärbten Zellen gegen die Farbintensität aufgetragen wurde. Jeder Punkt in dem Scattergramm entspricht einem Zellkern in der untersuchten Region und kann individuell in der Region dargestellt werden. So lässt sich anhand der Struktur vor der Auswertung manuell bestimmen, welche Signale erfasst und gezählt werden sollen. In diesem Beispiel wurden sehr kleine Kerne ausgeschlossen, da sie im Gewebe Endothelzellen der Kapillaren im Hirn entsprachen und daher für die weitere Analyse der positiven Neuronen nicht von Interesse waren.



**Abb. 54:** Scattergramm und Ergebnisse für die Anzahl der Zellkerne im RAmb

Von Interesse und für die weitere Auswertung entscheidend in dieser Auswertung ist der obere rechte Quadrant (UR) mit einem Count von 55, was der Anzahl an Zellkernen im RAmb entspricht. Die 55 Hämalaun-gefärbten Zellkerne aus dem Skattergramm in Abb. 54 wurden nun auf Grund der Cytoplasma-Färbung für DAB weiter unterteilt. In dem Skattergramm aus Abb. 55 nimmt die Hämalaun-Intensität von unten nach oben zu, die DAB Intensität von links nach rechts. Die Einteilung in die Quadranten erfolgte anhand der Darstellung der einzelnen Zellen in dem histologischen Präparat. Das abschließende Ergebnis für diese Region bedeutet, dass von 55 im RAmb angeschnittenen Zellkernen 31 eine DAB Färbung des Cytoplasmas aufwiesen und damit einen muskarinischen Rezeptorsubtyp exprimieren.



Overall Statistics

| Quadrant | Count | Percent |
|----------|-------|---------|
| UL       | 24    | 43,64%  |
| UR       | 31    | 56,36%  |
| LL       | 0     | 0,00%   |
| LR       | 0     | 0,00%   |
| Overall  | 55    | 100,00% |

Abb. 55: Scattergramm und Ergebnistabelle für die Anzahl positiver Zellen mit braunem Cytoplasma (oben rechter Quadrant UR)

### 5.1.4 Co-Färbungen

Um zu testen, ob die Neuronen, die durch Acetylcholin beeinflusst werden, auch einem anderen Transmittersystem unterworfen sind, wurden Co-Färbungen mit den zuvor getesteten Antikörpern und einem für den Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>1A</sub> spezifischen Antikörper durchgeführt. Die nachfolgenden Bilder zeigen exemplarische Aufnahmen aus den Atemzentren des Rattenhirns. Es wurden sämtliche Kernregionen untersucht, die auch schon bei den Einzel-färbungen von Interesse waren.

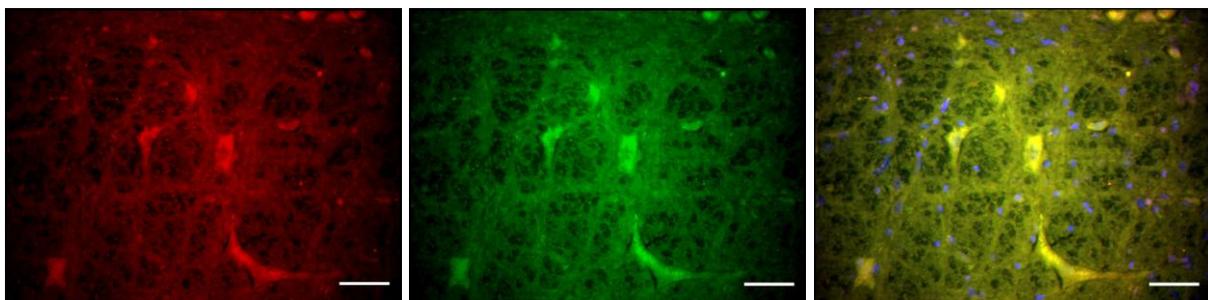
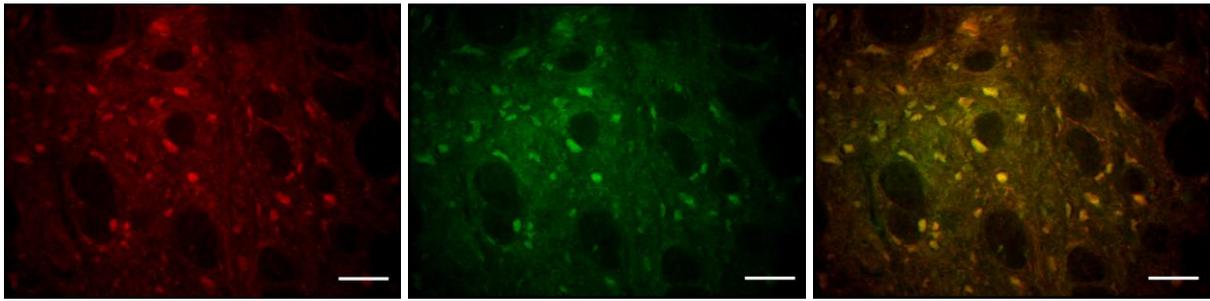
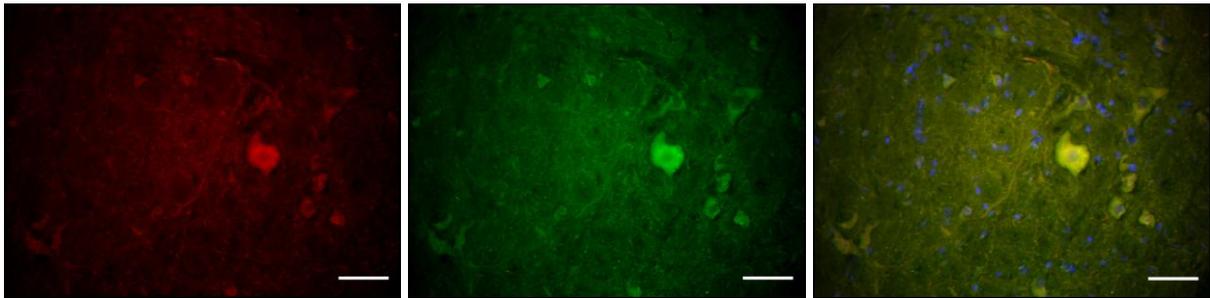


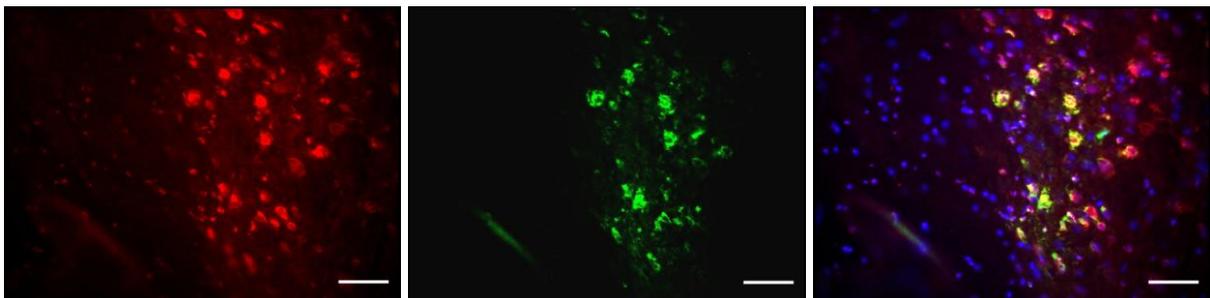
Abb. 56: Von links nach rechts: Färbung für 5-HT<sub>1A</sub> mit Cy3-markiertem Streptavidin (rot); Färbung für M35 mit Cy2 (grün); Overlay mit Kernfärbung (DAPI/blau); Balken entspricht 50 µm.



**Abb. 57:** Färbung für M1 mit Cy3 (rot); Färbung für 5-HT<sub>1A</sub> mit Cy2 (grün), Overlay; Balken entspricht 100 µm.



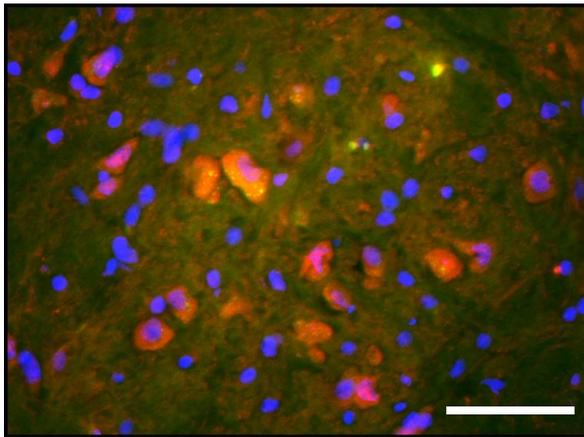
**Abb. 58:** Färbung für M<sub>3</sub> mit Cy3 (rot); Färbung für 5-HT<sub>1A</sub> mit Cy2 (grün), Overlay mit Kernfärbung (DAPI/blau); Balken entspricht 100 µm.



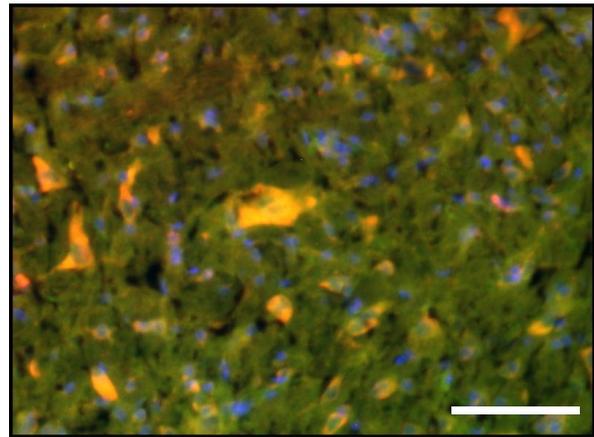
**Abb. 59:** Färbung für nAChR  $\alpha_7$  mit Cy3 (rot); Färbung für 5-HT<sub>1A</sub> mit Cy2 (grün); Overlay mit Kernfärbung (DAPI/blau); Balken entspricht 100 µm.

Für alle getesteten Antikörperkombinationen wurde jeweils ein vollständiges Overlay beobachtet. So ließen sich keine Zellen finden, die nur für einen Rezeptor positiv angefärbt wurden. Da der 5HT<sub>1A</sub> Antikörper ebenso wie der M<sub>2</sub> und der nAChR  $\beta_2$  Antikörper im Kaninchen hergestellt wurden, waren diese Kombinationen nicht möglich.

Da durch die vorangegangenen Ergebnisse die Vermutung bestand, dass auch verschiedene Acetylcholin-Rezeptoren co-lokalisiert sein könnten, wurden auch mit den AChR Antikörpern untereinander Co-Färbungen durchgeführt.



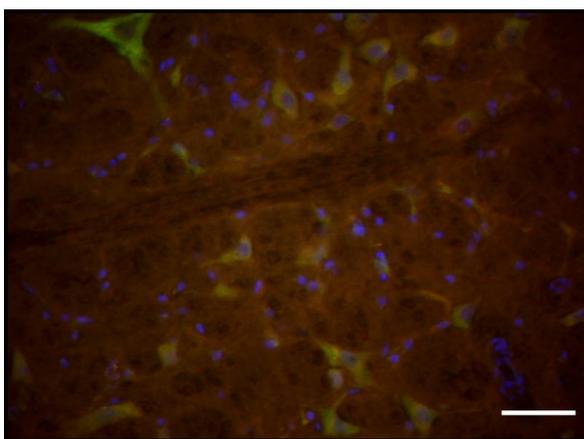
**Abb. 60:** Co-Färbung für die mAChRs  $M_1$  (mit Cy3) und M35 (mit Cy2). Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$



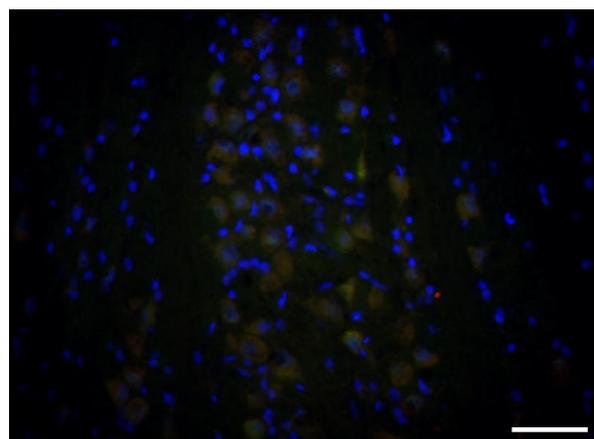
**Abb. 61:** Co-Färbung für die mAChRs  $M_1$  (mit Cy3) und  $M_2$  (mit Cy2). Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$

Abb. 60 zeigt beispielhaft eine Co-Färbung für einen spezifischen muskarinischen AChR  $M_1$  mit dem M35 Antikörper, der unspezifisch an alle Subtypen bindet. Es war zu erwarten, dass alle  $M_1$  positiven Zellen mit M35 co-lokalisieren. Allerdings gab es keine M35, in diesem Fall Cy2 positiven grünen Zellen, die nicht auch positiv für  $M_1$  waren. Die Ergebnisse in Abschnitt 5.1.3 zeigen, dass  $M_1$  nicht der einzige Subtyp ist, der in den Atemzentren der Ratte vertreten ist, was darauf hindeutet, dass tatsächlich, wie auch schon nach den ersten Auswertungen der Verteilungsmuster vermutet, mehrere AChRs von einzelnen Neuronen exprimiert werden. Abb. 61 zeigt eine Co-Färbung für  $M_1$  und  $M_2$  und es zeigt sich auch hier eine komplette Co-Lokalisation der positiven Signale.

Für die nikotinischen AChRs wurde ebenfalls überprüft, ob die beiden untersuchten Untereinheiten co-exprimiert werden.



**Abb. 62:** Co-Färbung für die nAChRs  $\alpha_7$  (Cy3) und  $\beta_2$  (Cy2). Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 63:** Co-Färbung für  $M_1$  (mit Cy2) und  $\alpha_7$  (mit Cy3). Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Wie in Abb. 62 zu sehen ist, gab es auch bei den beiden nikotinischen Untereinheiten eine Co-Lokalisation der Signale. Allerdings fiel die Fluoreszenzfärbung für  $\alpha_7$  wesentlich schwächer aus als für  $\beta_2$ .

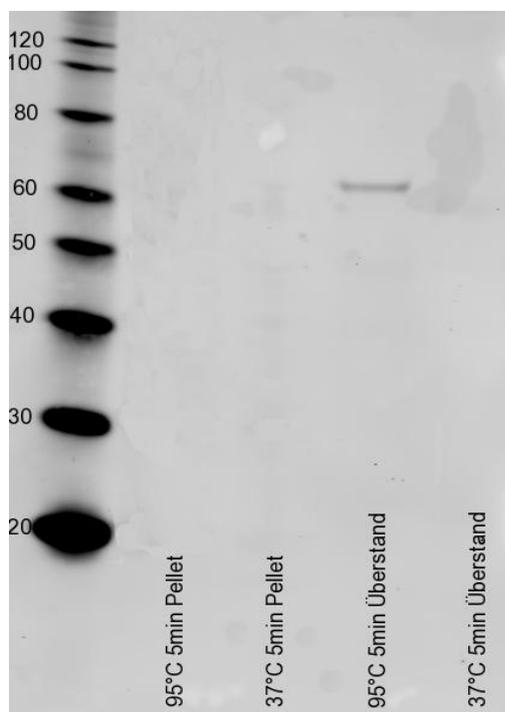
In einem letzten Ansatz sollte überprüft werden, ob auch nikotinische und muskarinische Rezeptoren in einer Zelle co-exprimiert werden. Wie in Abb. 63 zu sehen, überlagerten sich auch hier die roten und grünen Signale vollkommen.

## 5.2 Western Blot

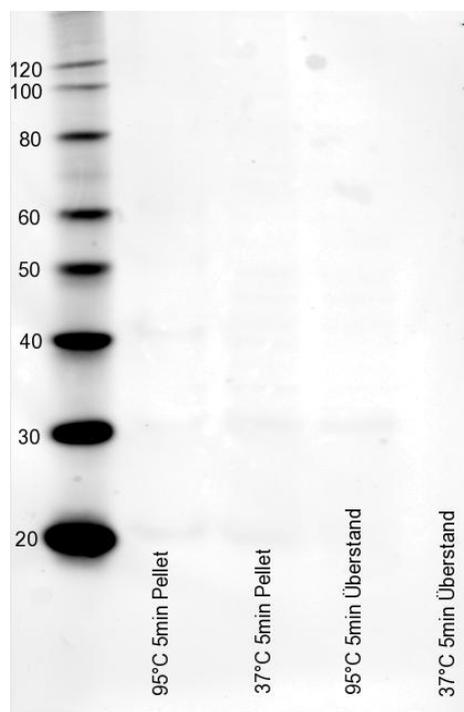
Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen und um anhand der detektierten Proteingröße Rückschlüsse auf den Rezeptor-Subtyp zu erhalten, wurden Western Blots durchgeführt.

Die Auswertung der Blots erfolgte am Odyssey, mittels Infrarotfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern bzw. Infrarotfarbstoff-gekoppeltem Streptavidin. Die Aufnahmen wurden anschließend in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt.

Abb. 64 zeigt das Ergebnis für den M35 Antikörper, aufgetragen wurden jeweils 5 µg pro Spur.



**Abb. 64:** Western Blot für mAChR M35, links aufgetragen ist der Marker.



**Abb. 65:** Negativkontrolle für mAChR M35, Inkubation erfolgte ohne Primärantikörper.

Obwohl M35 sämtliche Subtypen der muskarinischen Rezeptoren detektiert und mit den benutzten polyklonalen Antikörpern für M<sub>1</sub> bis M<sub>3</sub> positive Färbeargebnisse erzielt wurden, lieferte der Western Blot nur eine Bande, entsprechend einem Protein der Größe zwischen 60 und 70 kilo Dalton (kDa). Die erwarteten Größen der einzelnen Subtypen sind 51 kDa für M<sub>1</sub>, 52 kDa für M<sub>2</sub>, 66 kDa für M<sub>3</sub>, 53 kDa für M<sub>4</sub> und 60 kDa für M<sub>5</sub>, so dass es sich bei dem detektierten Protein vermutlich um M<sub>3</sub> handelt.

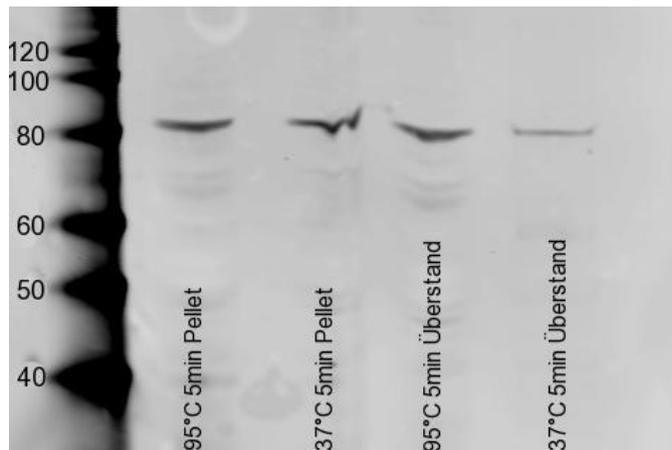


Abb. 66: Western Blot für nAChR  $\beta_2$

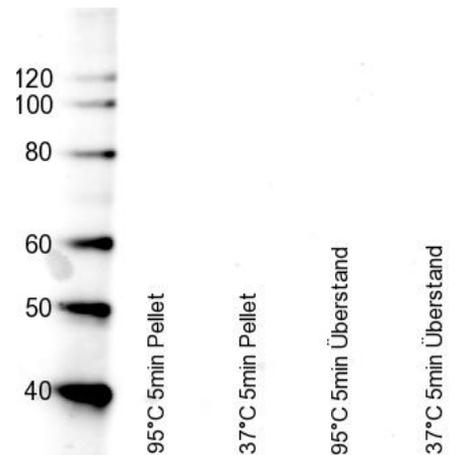


Abb. 67: Negativkontrolle, Inkubation ohne Primärantikörper

Für die  $\beta_2$  Untereinheit des nAChRs konnte mit Hilfe des Chemicon Antikörpers eine Proteinbande detektiert werden, die in etwa der zu erwartenden Größe von 85 kDa entspricht. Die Bande fand sich in beiden Fraktionen, sowohl im Pellet als auch im Überstand und war unabhängig von der Temperatur, mit der die Proben vor der SDS-Gelelektrophorese behandelt wurden.

Für die anderen Antikörper konnte auch mit einem zusätzlichen Amplifikationsschritt, durch den Einsatz biotinylierter Sekundärantikörper und IR-markiertem Streptavidins, keine Ergebnisse erzielt werden. Abb. 67 zeigt beispielhaft ein Ergebnis, welches mit dem Einsatz infrarot-markiertem Streptavidins erzielt wurde.

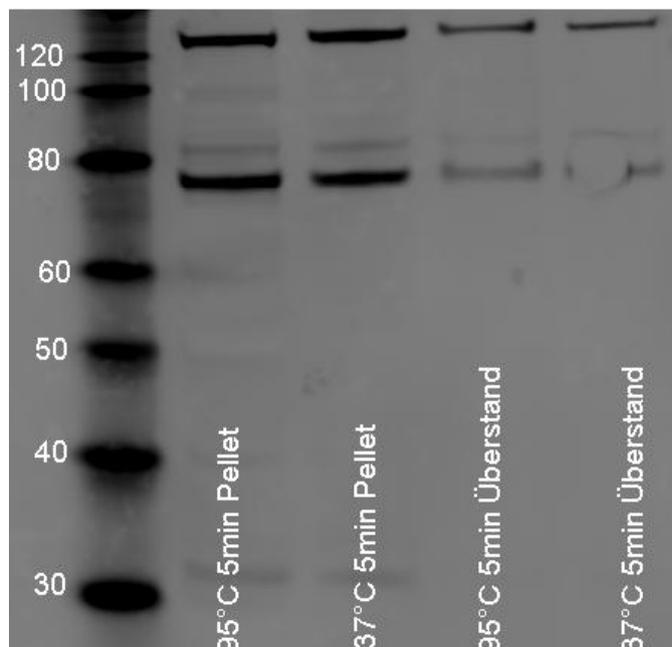


Abb. 68: Western Blot für nAChR  $\alpha_7$

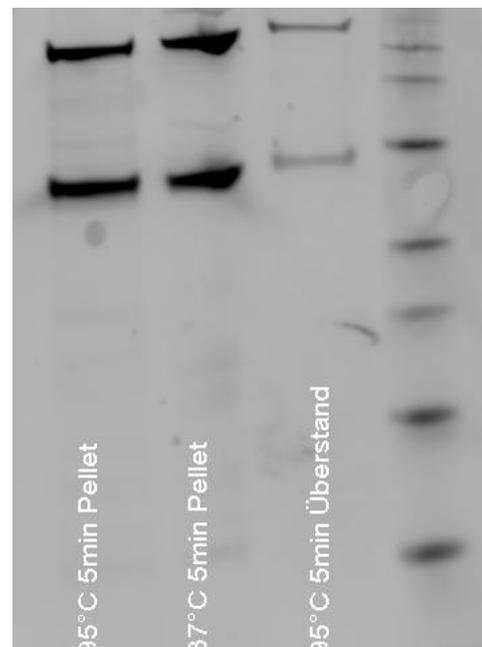


Abb. 69: Negativkontrolle für  $\alpha_7$

Auf dem Western Blot, inkubiert mit dem monoklonalen nAChR  $\alpha_7$ , lässt sich jeweils im Protein-Pellet eine einzelne Bande bei ca. 32 kDa erkennen, was jedoch nicht der erwarteten

Größe der Untereinheit von 56 kDa entspricht. Die anderen Banden entsprechen in ihrer Größe biotinylierten Carboxylasen, wie sie im Hirn zu finden sind. Sichtbar gemacht werden sie nicht durch einen spezifisch gebundenen Antikörper, sondern durch das Infrarot-markierte Streptavidin, was auch ihr Vorhandensein in der Negativkontrolle erklärt.

## 5.3 Perfundierte Hirnstammpräparation

Mit Hilfe der perfundierten Hirnstammpräparation wurden rezeptoraktive Wirkstoffe und ein Organophosphat auf ihre Wirkung auf das zentrale Atemmuster der Ratte untersucht. Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 2 zusammengestellt und orientieren sich an bislang veröffentlichten Studien oder Erfahrungen aus der eigenen Arbeitsgruppe. Gab es keine Anhaltspunkte für die zu verwendende Konzentration, wurde die Substanz kumulativ der Perfusionsflüssigkeit zugegeben, bis Effekte zu beobachten waren.

### 5.3.1 Rezeptoraktive Wirkstoffe

#### TMPH

Die Blockierung der neuronalen nikotinischen Rezeptoren mit dem nicht-kompetitiven Rezeptor-Antagonisten TMPH wurde in  $n = 5$  Experimenten durchgeführt. TMPH wurde kumulativ bis zu einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  in die Perfusionslösung gegeben. Die Atemparameter wurden im Anschluss daran bestimmt und mit Kontrollwerten verglichen.

Während die mittlere Inspirationsdauer  $T_i$  unter Kontrollbedingungen  $0,69 \pm 0,06$  Sekunden (s) betrug, kam es zu einer geringfügigen Verlängerung der  $T_i$  nach der Applikation von TMPH auf  $0,83 \pm 0,19$  s. Parallel war jedoch eine gravierende Verlängerung von  $T_{\text{tot}}$  zu beobachten. Die durchschnittliche Zykluslänge unter Kontrollbedingungen betrug  $3,34 \pm 0,52$  s und verlängerte sich auf  $13,23 \pm 2,09$  s, gemessen 5 min nach TMPH-Zugabe in den Perfusionskreislauf. Zeitgleich kam es zu einer Abnahme der Atemfrequenz, was auf Grund unveränderter Inspirationsdauer zu einem Abfall des Atemzugvolumens ( $V/\text{min}$ ) um 80 % führte.

Abb. 70 fasst die prozentuale Abweichung der Atemparameter von den Kontrollwerten grafisch zusammen. Der Anstieg der Expirationszeit und der Zykluslänge 5 min nach Zugabe von TMPH auf ca. 400 % ist statistisch signifikant mit p-Werten von 0,0214. Der Blutdruck bleibt während der Versuchsreihe mit TMPH konstant bei ca. 60 mmHg.

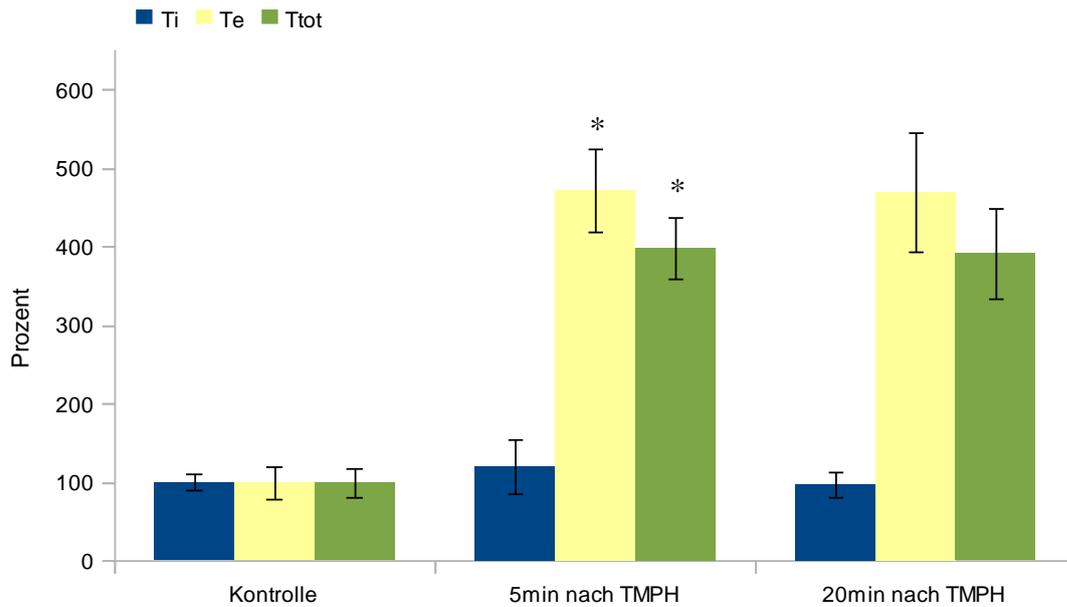


Abb. 70: Atemparameter im Vergleich zur Kontrollaktivität nach Applikation von 50 µM TMPH

### DHβE

Der kompetitive Antagonist DHβE ist selektiv für die neuronale α<sub>4</sub>-Untereinheit des nikotinischen AChR. Die n = 4 Versuche wurden mit einer Konzentration von 40 µM in der Perfusionsflüssigkeit durchgeführt. Die Atemparameter wurden ebenfalls 5 min und 20 min nach Erreichen der Gesamtkonzentration gemessen.

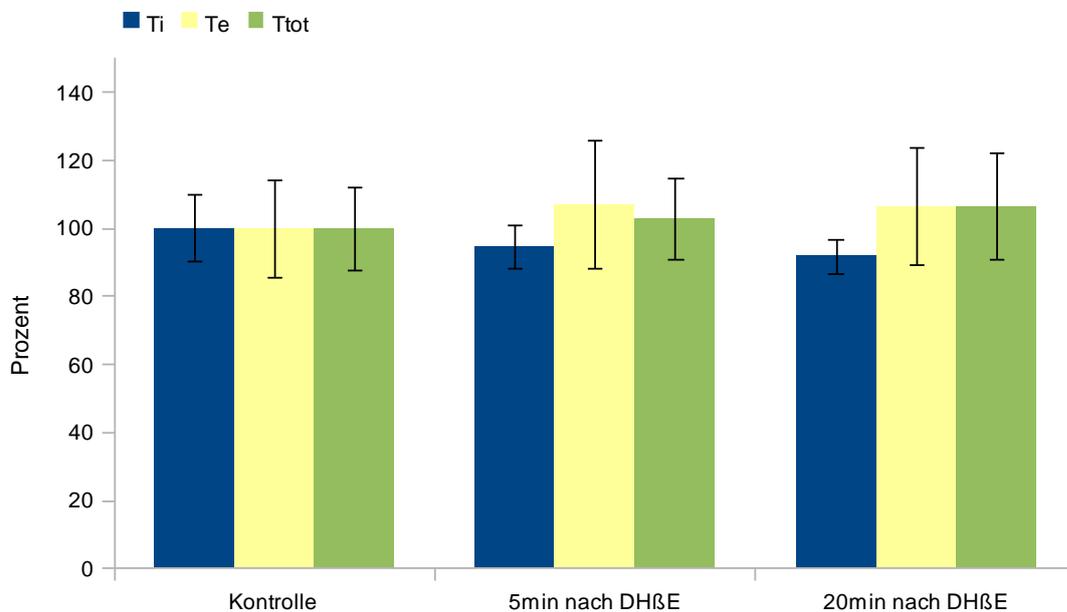


Abb. 71: Atemparameter im Vergleich nach der Applikation von 40 µM DHβE.

Weder bei der Inspirationsdauer, noch bei der Zykluslänge waren Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollwerten zu erkennen. Die T<sub>i</sub> reduzierte sich um ca. 7 % von 0,7 ± 0,059 s auf 0,66 ± 0,026 s bzw. 0,64 ± 0,026 s, gemessen 5 bzw. 20 min nach der letzten DHβE Zugabe.

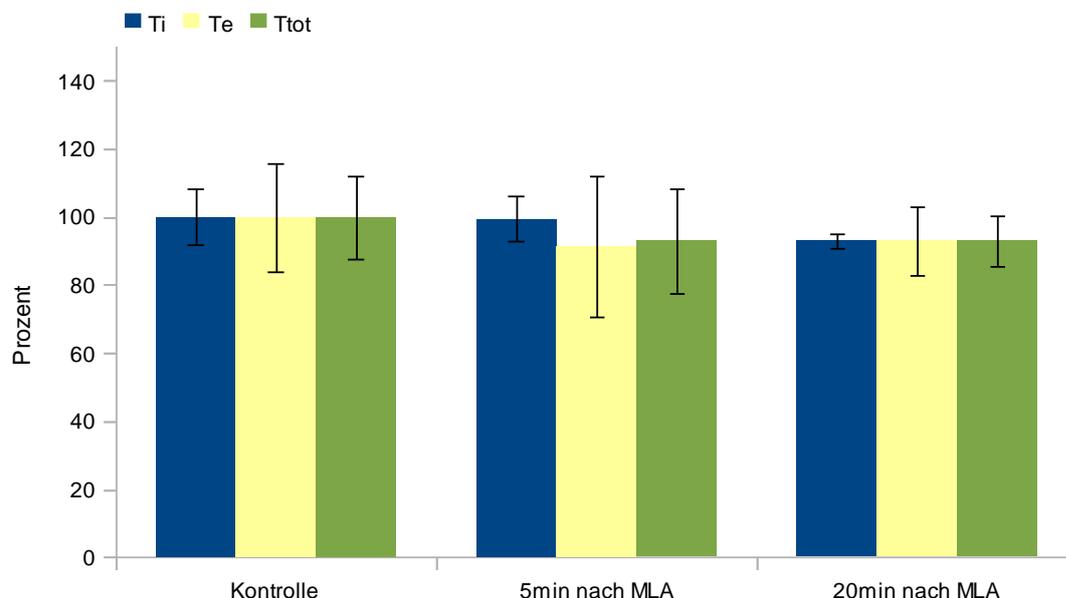
Die Zykluslänge blieb mit einer Erhöhung um ca. 0,7 % nahezu unverändert (siehe Abb. 71). Der Blutdruck sank nach Zugabe von DH $\beta$ E um 10 % ab und lag damit durchschnittlich bei 53 mmHg.

Nach 20 min war ein Anstieg in der Atemfrequenz zu beobachten und bedingt dadurch eine leichte Zunahme im Atemvolumen (siehe Abb. 73). Aufgrund der großen Abweichungen bei den unterschiedlichen Präparationen, die Atemfrequenz betreffend, war jedoch keine statistisch gesicherte Aussage bei diesem Versuchsumfang möglich.

### MLA

MLA ist ebenfalls ein kompetitiver Antagonist, allerdings im Gegensatz zu DH $\beta$ E selektiv für die neuronale  $\alpha_7$ -Untereinheit. Die Konzentration in der Perfusionslösung betrug 20  $\mu$ M. Das Atemzugvolumen / min war 20 min nach MLA Gabe um 7 % erhöht (siehe Abb. 73). Die Inspirationszeit veränderte sich ebenfalls nur geringfügig. Während sie 5 min nach Erreichen der Gesamtkonzentration an Antagonist mit  $0,71 \pm 0,019$  s identisch zur Kontrollaktivität von  $0,71 \pm 0,059$  s war, konnte nach 20 min eine geringfügige Verringerung auf  $0,66 \pm 0,047$  s beobachtet werden. Ebenso sah es bei  $T_e$  und der Zykluslänge  $T_{tot}$  aus: Es kam bei beiden Parametern zu einer Verringerung um ca. 8%. Der Blutdruck nahm nach MLA Zugabe um ca. 10 % ab und verringerte sich auf durchschnittlich 50 mmHg.

Abb. 72 zeigt die prozentuale Abweichung der Atemparameter nach MLA-Gabe im Verhältnis zu den Kontrollwerten.

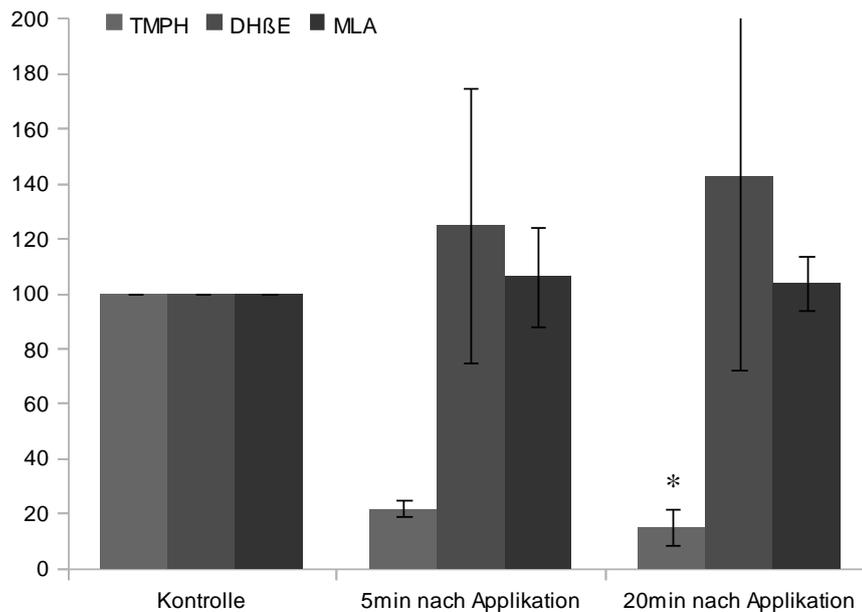


**Abb. 72:** Atemparameter im Vergleich zu Kontrollaktivität nach Applikation von 20  $\mu$ M MLA

Abb. 73 fasst noch einmal die Werte für V/min der getesteten nikotinischen Rezeptor-Antagonisten zusammen. Während der nicht-kompetitive Antagonist TMPH zu einer enormen Verringerung des Atemvolumens (nach 20 min  $p = 0,0106$ ) führt, kommt es nach Blo-

ckade einzelner nikotinischer Untereinheiten mit kompetitiven Antagonisten zu einem leichten Anstieg des Atemvolumens, durch eine leichte Atemfrequenzerhöhung. Die großen Standardabweichungen bei DHβE kommen durch die unterschiedlichen Effekte des Antagonisten auf die Atemfrequenz zu stande.

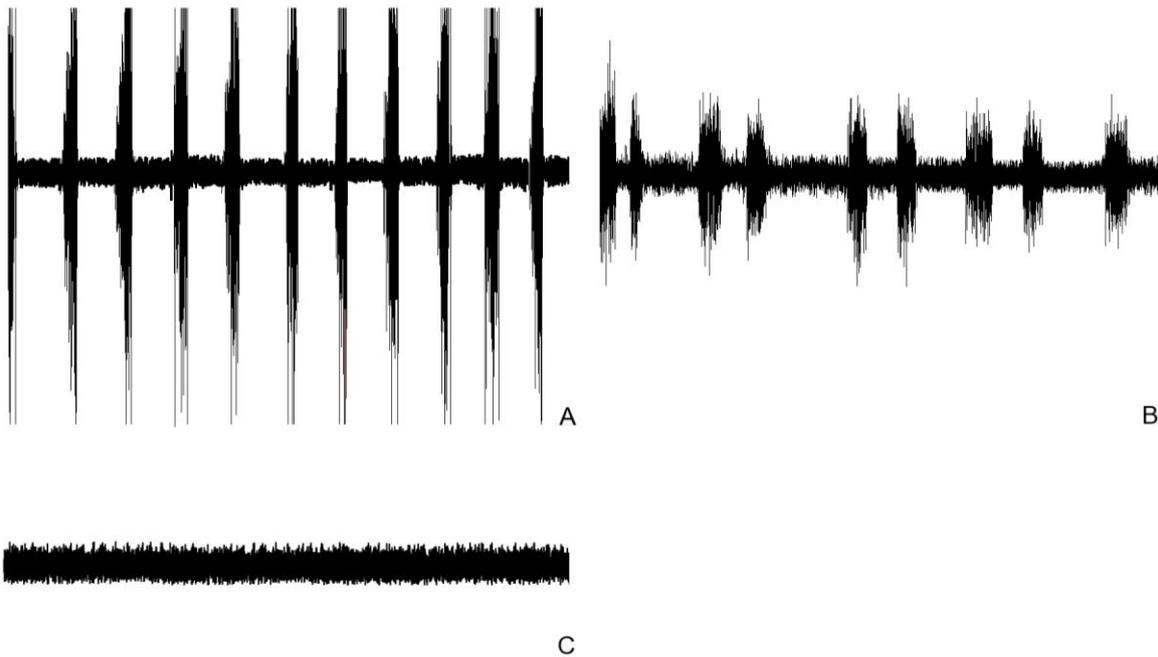
Die Verringerung des Atemvolumens durch TMPH kann zum einen auf die starke Verringerung der Atemfrequenz zurückgeführt werden, zum anderen kommt es zu einem enormen Anstieg der Expirationszeit bei gleichbleibender Inspirationszeit (siehe Abb. 70).



**Abb. 73:** Mittleres Atemzugvolumen pro Minute nach Applikation der verschiedenen Antagonisten. Die Werte sind jeweils prozentuale Angaben im Verhältnis zur Kontrolle.

### Lobelin

Der nikotinische Agonist Lobelin wurde kumulativ bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M in die Perfusionsflüssigkeit verabreicht. Bereits zwei Minuten nach Erreichen der Endkonzentration waren gravierende Auswirkungen auf die untersuchten Atemparameter feststellbar. Im Vergleich zu den Kontrollwerten kam es zu einer Zunahme der Atemfrequenz, während sich der Herzschlag um 50 % verringerte. Parallel verringerte sich die Amplitude der PNA stark (siehe Abb. 74 B), so dass sich nach 5 min keine *N. Phrenicus* Aktivität mehr feststellen ließ (Abb. 74 C).



**Abb. 74:** Die Abbildung zeigt beispielhaft die PNA über 30 s nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Lobelin. (A) Phrenicus Aktivität vor Zugabe von Lobelin, (B) Aktivität 2 min nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  des nikotinischen Agonisten (C), 5 min nach Applikation ist keine PNA mehr messbar.

### Pilocarpin

Der kompetitive muskarinische Agonist Pilocarpin wurde kumulativ zur Perfusionsflüssigkeit gegeben und bei einer Gesamtkonzentration von 320  $\mu\text{M}$  traten die im Folgenden beschriebenen Effekte auf.

Pilocarpin führte zu einer um 50 % verminderten Pulsfrequenz bei gleichbleibendem arteriellem Druck und einer Verdopplung der Atemfrequenz. Zwanzig Minuten nach Erreichen der Endkonzentration von 320  $\mu\text{M}$  hatte sich die Expirationszeit um 50% reduziert, während die anderen Atemparameter nicht auffällig verändert waren.

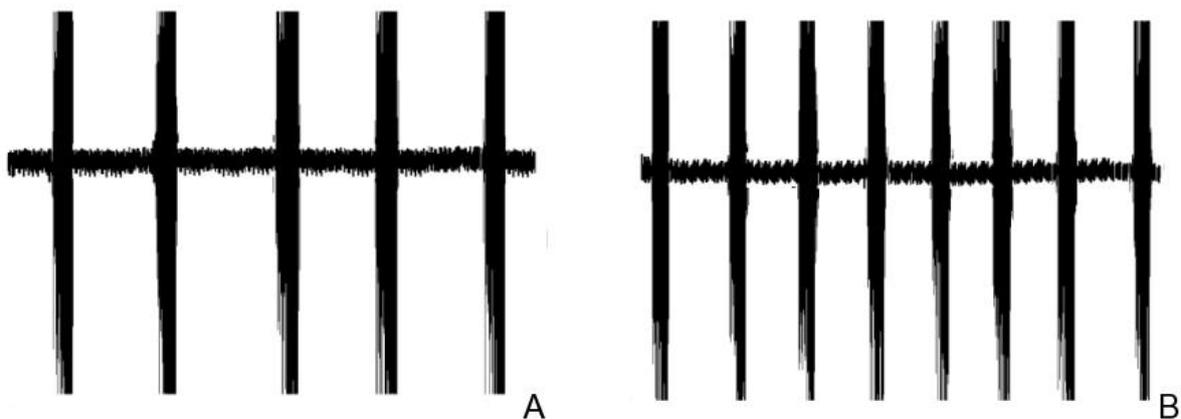
### Telenzepin und AQ-RA 741

Die beiden muskarinischen kompetitiven Antagonisten Telenzepin und AQ-RA 741, hemmen jeweils den  $M_1$  bzw. den  $M_2$  Subtyp. Die Spezifität bei muskarinischen Agonisten und Antagonisten ist allerdings im Vergleich zu den nikotinischen nicht gleichermaßen gegeben, da sich die mAChR in ihren Bindestellen für ACh nur geringfügig unterscheiden. Die Antagonisten sind daher nur in bestimmten Konzentrationen wirklich selektiv. Da es für die perfundierte Hirnstammpräparationen keine Anhaltspunkte für die einzusetzende Konzentration gab, wurden verschiedene Antagonisten kombiniert, um eine generelle Aussage über die Beteiligung muskarinischer Rezeptoren an der Atemgenerierung zu erhalten.

Bei dem hier vorgestellten Versuch zeigten sich nach systemischer Gabe von 25  $\mu\text{M}$  AQ-RA 741 keine Auswirkungen auf die Atemparameter, so dass zusätzlich Telenzepin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in die Perfusionslösung verabreicht wurde.

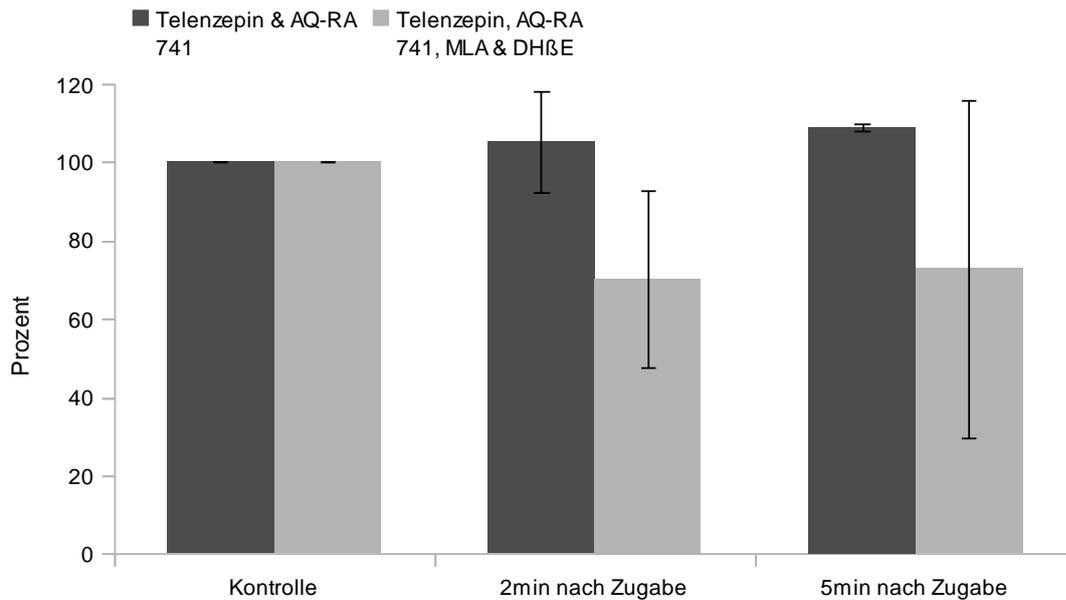
Die Atemparameter änderten sich daraufhin hinsichtlich der Atemfrequenz, die um 35 % anstieg (siehe Abb. 75), sowie Inspirations- und Expirationszeit, die bereits nach 2 min um 15 % absanken. Dies führte trotz steigender Atemfrequenz zu einem konstanten Atemzugvolumen (siehe Abb. 76). Die Veränderung der Atemparameter blieb während des gesamten Versuchsablaufs konstant.

Parallel zu Effekten auf die Atmung nahm die Pulsfrequenz nach Applikation der muskarinischen Antagonisten um 20 % ab, der arterielle Druck blieb hierbei konstant.



**Abb. 75:** Aktivität des *Nervus Phrenicus* jeweils für die Dauer von 30 s. (A) Kontrollaktivität, (B) Aktivität nach Zugabe von 25  $\mu\text{M}$  AQ-RA 741 und 50  $\mu\text{M}$  Telenzepin

Bei zusätzlicher Gabe der nAChR-Antagonisten MLA und DH $\beta$ E, um einen Block nikotinischer und muskarinischer AChR-Subtypen zu simulieren, waren die Auswirkungen auf die Atmung identisch. Inspirations- und Expirationszeit nahmen im Vergleich zur Kontrollaktivität um ca. 20 % ab. Diese Effekte waren auch bei Versuchsende nach 20 min noch zu beobachten. Die Atemfrequenz änderte sich jedoch bei zusätzlicher Gabe von nikotinischen Antagonisten nur geringfügig, so dass es zu einer leichten Abnahme des Atemzugvolumens im Vergleich zur Kontrolle kam (siehe Abb. 76).



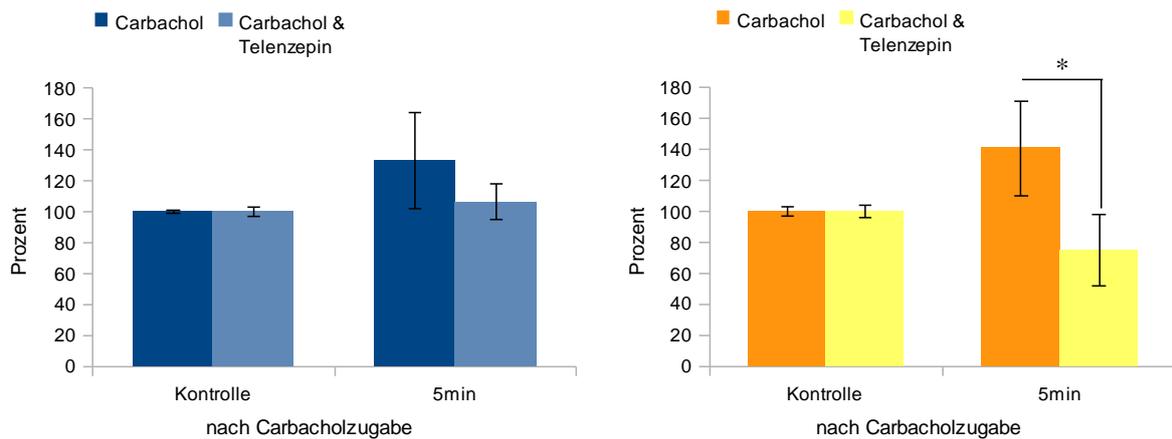
**Abb. 76:** Prozentuale Veränderung des Atemzugvolumens im Verhältnis zu den Kontrollwerten nach Applikation von 50 µM Telencepin, 25 µM AQ-RA 741, 5 µM DHβE und 40 µM MLA.

### Carbachol und Telencepin

Um die Auswirkungen muskarinischer Antagonisten auf das Atemmuster nach vorangegangener Stimulation zu untersuchen, wurde Carbachol dem Perfusat zugesetzt (Endkonzentration 100 µM). Carbachol ist ein Strukturanalogon des Acetylcholins und wie vorherige Experimente zeigten, führt die Zugabe von Carbachol zu einer pathologischen Atmung, gekennzeichnet durch verlängerte Inspirations- und Expirationsphasen, Verlust der rampenförmigen Aktivität des *N. Phrenicus* und Reduzierung des Atemvolumens. Die ersten Reaktionen auf Carbachol ließen sich bereits eine Minute nach Applikation feststellen, waren allerdings nur transient und nach einer weiteren Stunde hatten sich die Atemparameter in der Präparation nahezu vollständig erholt.

Bei den im Folgenden dargestellten Versuchen wurde Telencepin, ein M<sub>1</sub> AChR Antagonist eine Minute nach erfolgter Carbachol-Applikation ebenfalls in das Perfusat injiziert.

Die Herzfrequenz, die nach Carbachol-Gabe auf bis zu 20 % abnahm, erholte sich bereits 2 min nach Telencepin-Zugabe nahezu vollständig. Auch auf die Atmung wirkte sich die Telencepingabe positiv aus. Die erhöhten Inspirations- und Expirationszeiten, die nach Carbachol-Gabe zu beobachten waren (siehe Abb. 77) wurden durch den muskarinischen Antagonisten wieder reduziert. Die T<sub>i</sub> lag 5 min nach Telencepin-Zugabe mit einer 1 %-igen Abweichung wieder beim Ausgangswert. Die Atemzykluslänge und die Expirationszeit unterschieden sich ebenfalls statistisch nicht von den Kontrollwerten, jedoch stark von den nach Carbachol-Zugabe ermittelten Daten. So sank die Expirationszeit von 141 % nach Carbachol-Zugabe durch Telencepingabe auf 77 % ab und liegt somit noch deutlich unter dem Kontrollwert.



**Abb. 77:** Prozentuale Veränderung der Inspirations- (links) und Expirationszeit (rechts) nach Zugabe von Carbachol und nach zusätzlicher Gabe des  $M_1$  AChR Antagonisten Telencepin.

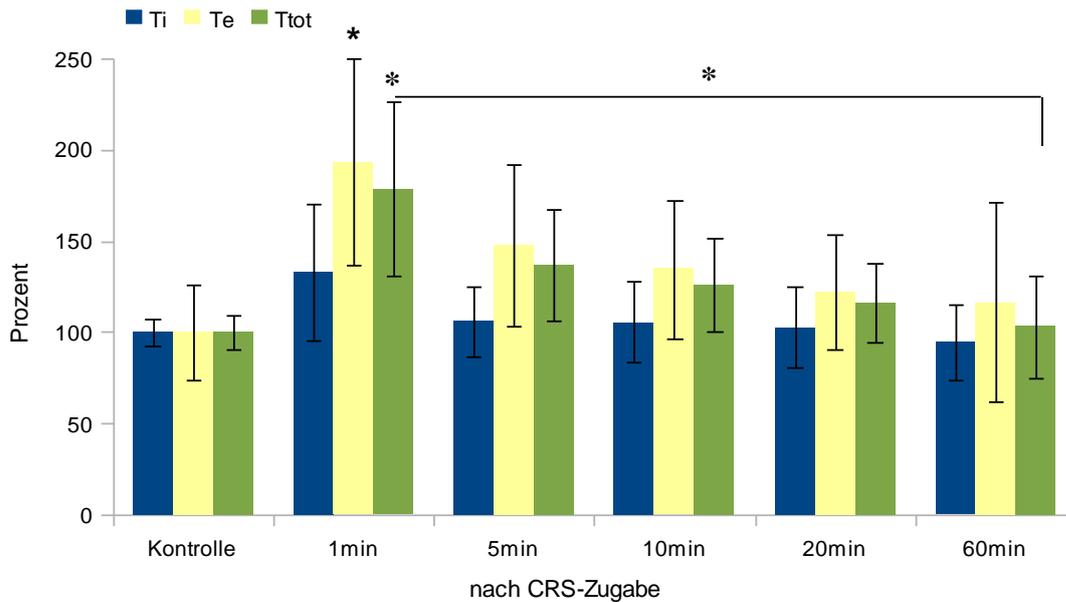
In drei weiteren Versuchen wurde nach der Zugabe von Telencepin erneut Carbachol bis zu einer Endkonzentration von 150  $\mu\text{M}$  verabreicht. Die zuvor beobachteten Effekte des Agonisten blieben bei dieser Versuchsanordnung aus, es zeigten sich weder Auswirkungen auf die Atmung noch auf die Herzfrequenz.

### Carbachol und weitere nikotinische Antagonisten

Um zu testen, ob der positive Einfluss Telencepins auch mit nikotinischen Antagonisten erzielt werden kann, wurde je ein Versuch mit MLA und DH $\beta$ E unternommen. Beide Substanzen zeigten keine Auswirkung auf das Atemmuster nach Carbachol-Zugabe und auch die Herzfrequenz blieb mit nur 30 % des Kontrollwertes auf dem für Carbachol-Vergiftung typischen Niveau.

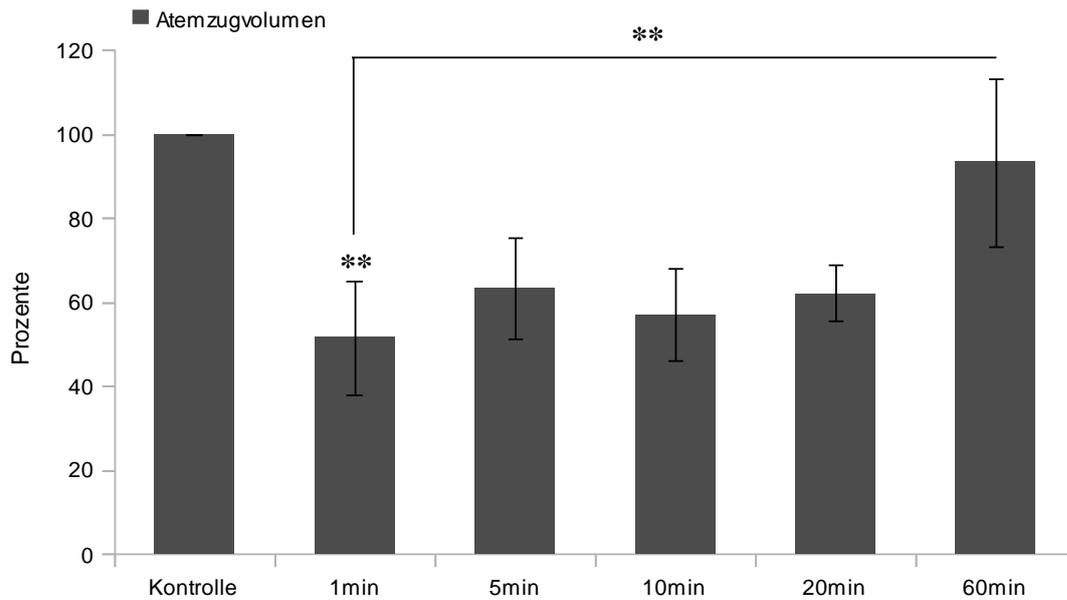
### 5.3.2 Organophosphat

CRS wurde über einen vor dem Doppellumenkatheter angebrachten Dreiwegehahn direkt vor dem Hirnstamm injiziert. Die zu verabreichende Menge wurde auf eine 1 ml-Spritze aufgezogen und über 30 s in den Kreislauf injiziert. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden bei einer Konzentration von 1,6  $\mu\text{M}$  CRS im Perfusionskreislauf erzielt. Als direkte Folge der CRS-Injektion kam es zu einer Apnoephase ohne PNA, die mit durchschnittlich 11,83 s deutlich über der Zeit einer normalen Expirationsphase lag (3,29 s). Danach setzte die Aktivität wieder ein und es zeigten sich die in Abb. 78 dargestellten Effekte.



**Abb. 78:** Vergleich der Atemparameter nach CRS-Zugabe über einen Zeitraum von 60 min.

Durch die Injektion von CRS kam es zu einem ca. 50 %-igen Anstieg sowohl von Inspirations- als auch Expirationszeit und resultierend daraus ein Anstieg der Gesamtzykluslänge ( $T_{tot}$ ). Die beobachteten Effekte waren allerdings transient und nach ca. einer Stunde waren die Atemparameter wieder nahezu identisch zu den Kontrollwerten. Abb. 78 zeigt eine statistisch signifikante Abweichung der Expirationszeit sowie der Gesamtzyklusdauer 1 min nach Zugabe von CRS. Sechzig Minuten später sind beide Werte wieder abgesunken, die Gesamtzykluslänge unterscheidet sich signifikant von dem Wert direkt nach der Vergiftung und befindet sich wieder bei 100 %. Begleitet werden die Veränderungen der Atemparameter durch ein pathologisches Aktivitätsmuster des *N. phrenicus*. Die rampenförmig ansteigende Aktivität, die unter Kontrollbedingungen zu beobachten ist, ist einer abfallenden Aktivität während der Inspirationszeit gewichen. Hierdurch bedingt und durch eine Frequenzverringernach CRS-Zugabe ergibt sich ein reduziertes Atemzugvolumens wie in Abb. 79 dargestellt. Auch diese Effekte sind nur transient und nach 60 min hat das Atemzugvolumen wieder einen Wert von über 90 % des Kontrollvolumens erreicht.

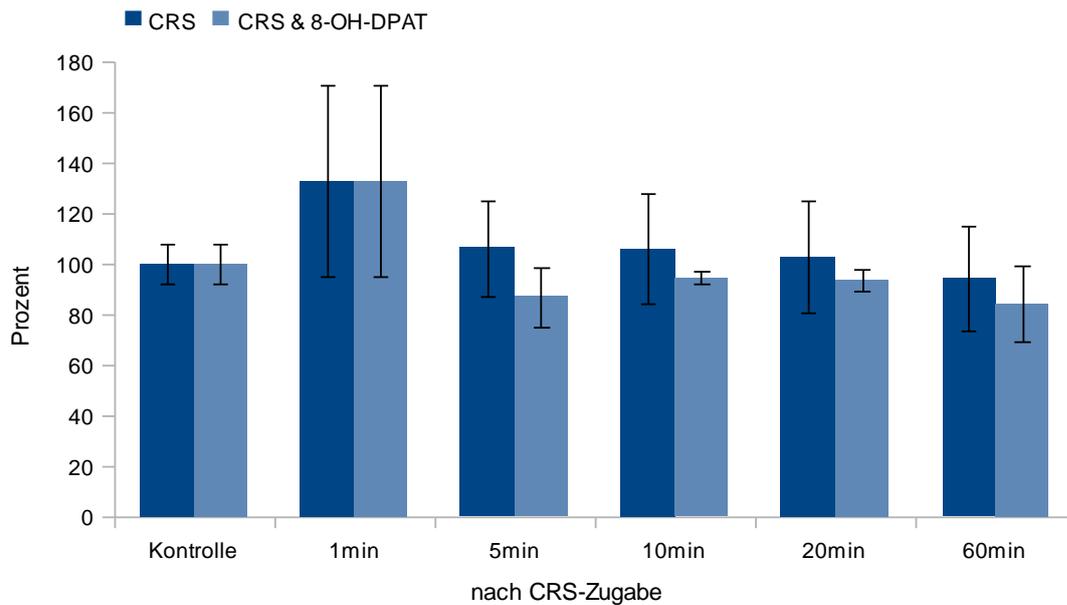


**Abb. 79:** Veränderungen des Atemzugvolumens nach CRS-Zugabe über einen Zeitraum von 60 min.

Auf den arteriellen Blutdruck wirkte sich die CRS-Vergiftung zu keinem Zeitpunkt aus. Der durchschnittliche Druck betrug 56 mmHg über den gesamten Versuchsablauf. Bei der Pulsfrequenz kam es zu einer Verringerung um 20 %, die direkt nach Applikation des Giftes eintrat. Im Gegensatz zu den Atemparametern blieb die Herzfrequenz auch nach 60 min weiterhin verringert.

### 5.3.2.1 CRS und 8-OH-DPAT

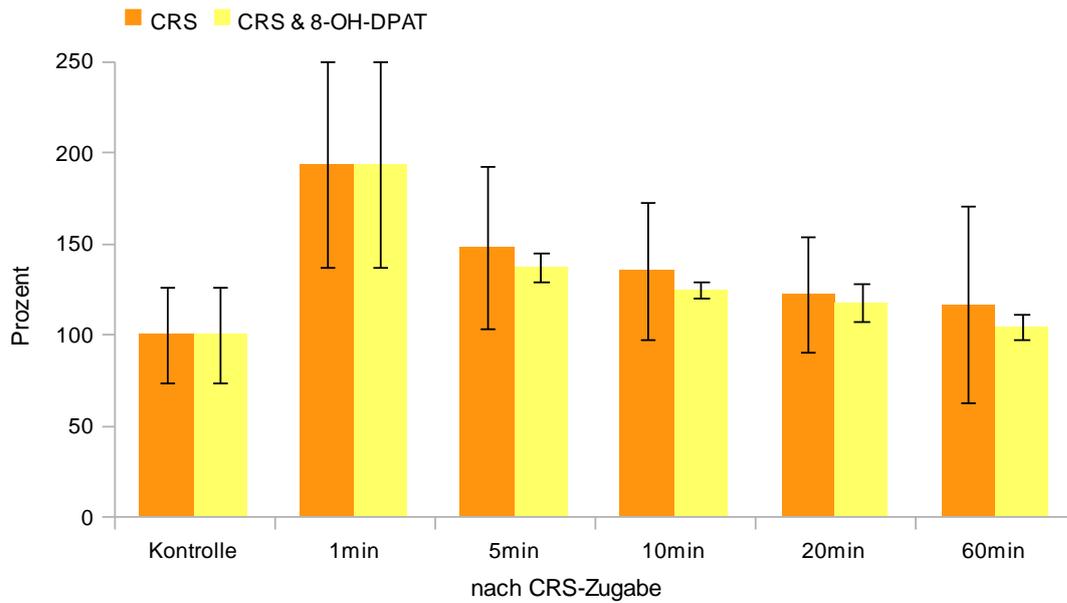
Bei dem im Folgenden dargestellten Versuch wurde ebenfalls, nach Aufnahme der Kontrollaktivität, CRS über einen Dreiwegehahn direkt vor den Hirnstamm appliziert. Eine Minute später wurden die Atemparameter bestimmt, bevor 2 min nach CRS-Zugabe die Injektion von 8-OH-DPAT in den Perfusionskreislauf erfolgte. Eine Minute nach Zugabe des Serotoninrezeptor-Agonisten wurden die Atemparameter ausgewertet, zu diesem Zeitpunkt befand sich CRS bereits 3 min im Perfusionskreislauf (siehe Abb. 8 für eine genaue Darstellung des zeitlichen Ablaufs). Die folgenden Abbildungen fassen die Ergebnisse vergleichend zusammen um den Einfluss des 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor-Agonisten nach CRS-Vergiftung darzustellen.



**Abb. 80:** Vergleich der Inspirationszeiten nach Zugabe von CRS und bei zusätzlicher Gabe des 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT.

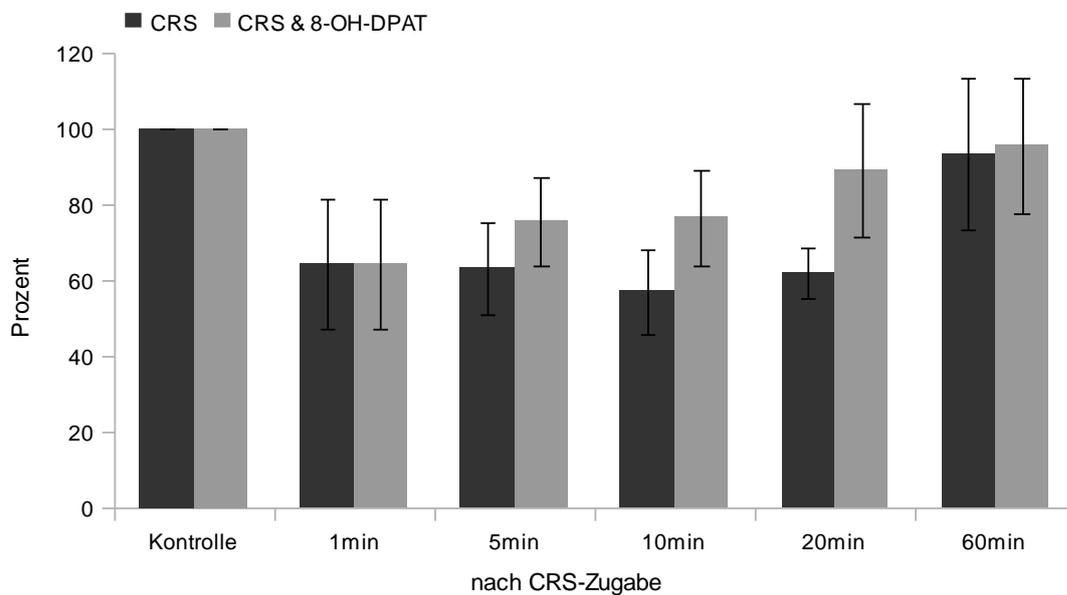
Wie in Abb. 80 zu erkennen, war die Inspirationszeit 1 min nach Zugabe von 8-OH-DPAT immer noch ca. 40 % erhöht im Vergleich zum Kontrollwert. Nach 5 min hatte sich, durch Zugabe des Agonisten, die  $T_i$  allerdings auf 90 % des Ausgangswertes verringert. Dieser Trend setzte in den folgenden 55 min des Auswertungszeitraums fort. Während sich die Inspirationszeit nach CRS-Vergiftung wieder dem Kontrollwert annähert, blieb sie nach 8-OH-DPAT-Gabe leicht verringert. Die Unterschiede zwischen den Inspirationszeiten waren allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Beim Vergleich der Expirationszeiten in Abb. 81 bietet sich ein ähnliches Bild. Es kommt sowohl mit als auch ohne Gabe des Serotonin-Agonisten 5 min nach CRS-Zugabe zu einer Reduzierung der durch das Organophosphat erhöhten Expirationszeit. Die  $T_e$  war nach Gabe von 8-OH-DPAT jedoch durchschnittlich 10 % kürzer während der gesamten 60 min.



**Abb. 81:** Vergleich der Expirationszeiten nach Zugabe von CRS und bei zusätzlicher Gabe des 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT.

Abb. 81 zeigt die Auswirkungen der Gabe des Serotonin-Agonisten auf das Atemzugvolumen. Nach OP-Vergiftung kam es zu einer Reduktion auf 60 %, es erholte sich bei Gabe von 8-OH-DPAT in den Perfusionskreislauf schneller, wie auch schon für die Inspirations- und Expirationszeit beobachtet (siehe Abb. 80 und 81).



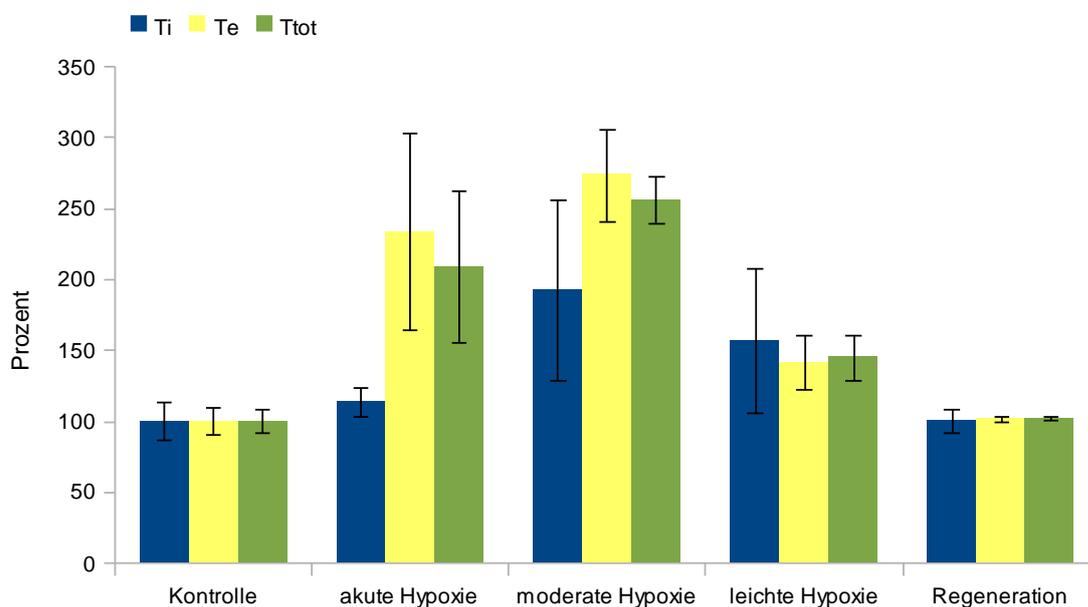
**Abb. 82:** Vergleich des Atemzugvolumens nach Zugabe von CRS und bei zusätzlicher Gabe des 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT.

Mit und ohne Agonist kehren die Werte jedoch 60 min nach CRS-Vergiftung auf das Niveau der Kontrollbedingungen zurück.

Die zusätzliche Gabe von 8-OH-DPAT wirkte sich nicht auf den arteriellen Druck oder die Pulsfrequenzveränderungen, die nach CRS-Vergiftung beobachtet wurden, aus.

### 5.3.2.2 CRS-Vergiftung und Hypoxie

Um einen Kollaps der Peripherie in der perfundierten Hirnstammpräparation zu simulieren, wurde ein Hypoxieprotokoll angewandt, welches durch Regulation der externen Pumpe zur Sauerstoffunterversorgung des Hirnstammes führt. Der genaue Ablauf ist in Abschnitt 4.3.4.2 beschrieben. Abb. 83 zeigt, wie sich die Atemparameter bei Anwendung des Hypoxieprotokolles verändern. Als Perfusionslösung diente in diesem Experiment ACSF, ohne Zugabe jeglicher rezeptoraktiver Wirkstoffe, was im Folgenden als Normalbedingung bezeichnet wird.

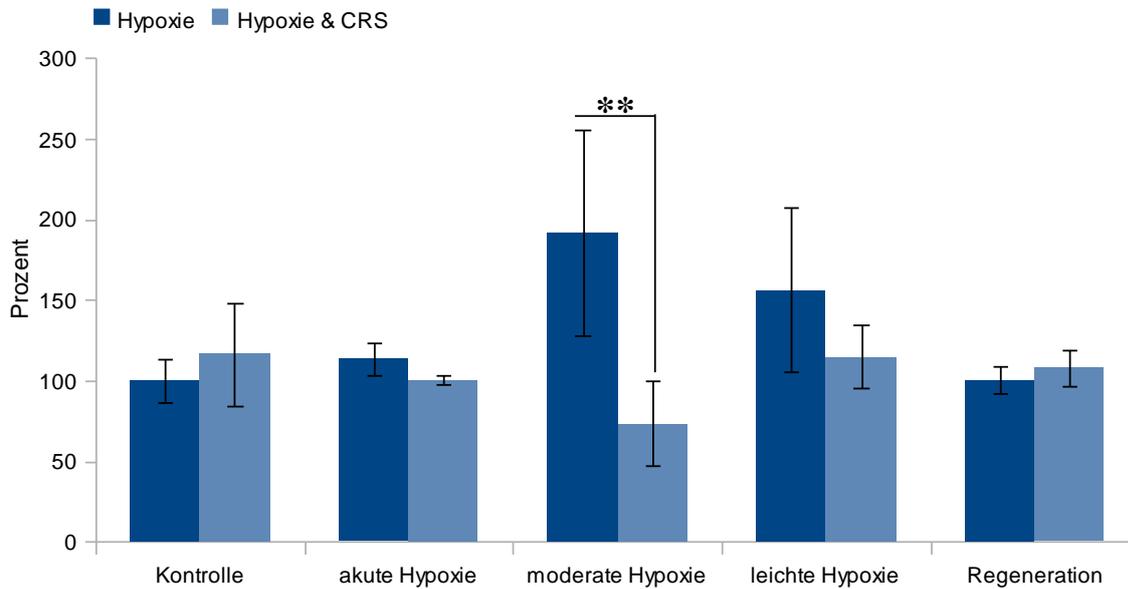


**Abb. 83:** Darstellung der Atemparameter bei Anwendung des Hypoxieprotokolls.

Es zeigt sich, dass es bereits während der akuten Hypoxie (1 min ohne Pumptätigkeit) zu einer Verdopplung der Expirationszeit kommt. Während der Phase der moderaten Hypoxie (3 min mit 50 % verringerter Pumpleistung) steigt die Expiration weiter an, ebenso die Inspiration, es kommt zu einer drastisch verringerten Atemfrequenz. Während der leichten Hypoxie (3 min bei 75 % der Ausgangspumpleistung) normalisieren die Atemparameter sich wieder und in der Regenerationsphase, 20 min nach Ende der leichten Hypoxie, befinden sich die Atemparameter wieder auf dem Ausgangsniveau. Die längste Apnoephase ohne PNA beträgt bei Normalbedingungen 15,5 s.

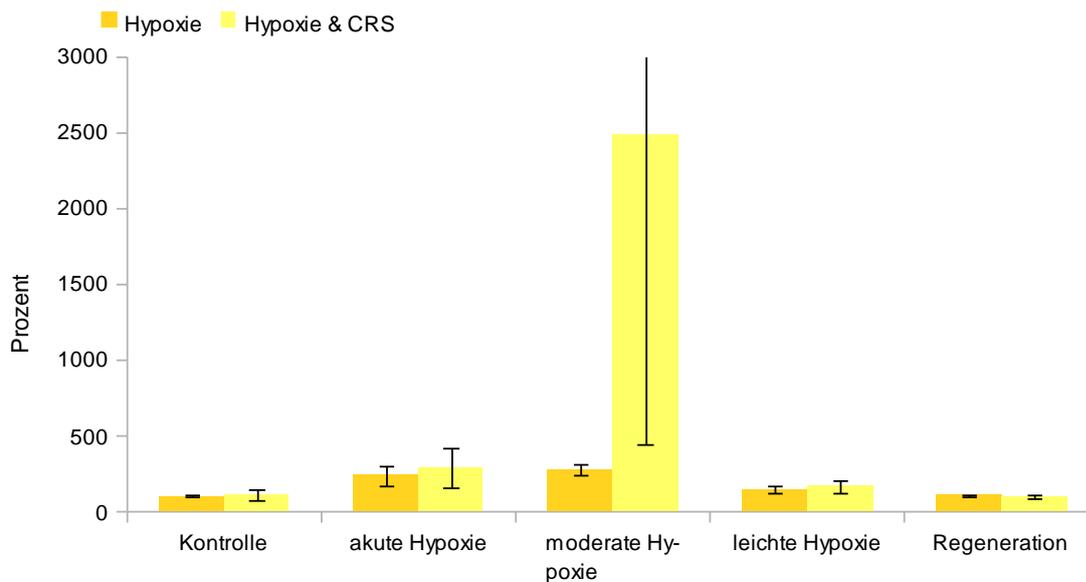
Um die Auswirkungen einer kollabierenden Peripherie auf die Atmung nach Organophosphatvergiftung zu untersuchen, wurde CRS wie in den vorangegangenen Experimenten über einen Dreiwegehahn appliziert und 2 min später wurde das Hypoxieprotokoll gestartet. Die

folgenden Abbildungen zeigen den kombinierten Effekt von CRS und Hypoxie auf die Atemparameter.



**Abb. 84:** Inspirationsdauer bei Anwendung des Hypoxieprotokolls im Vergleich zur Inspirationszeit nach vorangegangener CRS-Vergiftung und gleichzeitiger Hypoxie.

Wie aus Abb. 84 ersichtlich gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Inspirationszeiten während moderater Hypoxie. Während es unter Normalbedingungen, ohne Zusatz rezeptoraktiver Substanzen oder Giften im Perfusat, zu einer Verdopplung der  $T_i$  kommt, verringert sich die Inspirationszeit durch vorangegangener CRS-Intoxikation auf etwa 80 %.



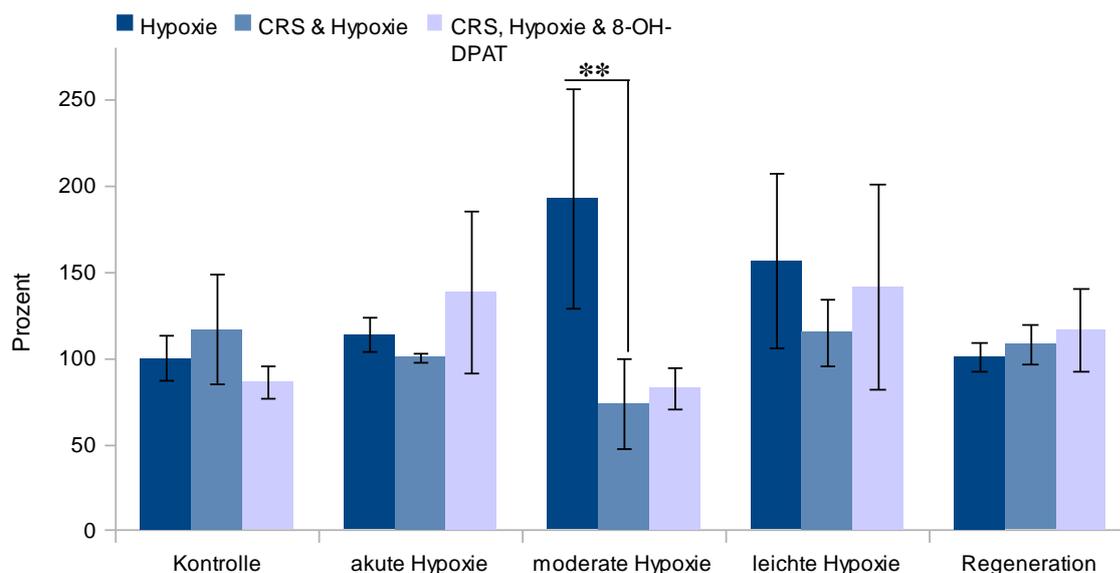
**Abb. 85:** Darstellung der Expirationsdauer bei Anwendung des Hypoxieprotokolls im Vergleich zur Expirationszeit nach vorangegangener CRS-Vergiftung.

Die in Abb. 85 dargestellten Ergebnisse sind, sind durch große Abweichungen in den gemessenen Werten während der moderaten Hypoxiephase gekennzeichnet. Es kommt bei allen Versuchen zu einem deutlichen Anstieg der Expirationszeit, diese schwankt allerdings zwischen 100 und 3000 %. Erklärbar ist dies durch extrem lange Phasen ohne jegliche PNA, die als Apnoephasen bezeichnet werden und mit 182,6 s um das 12 fache höher sind als unter Normalbedingungen.

Die Kombination aus simuliertem Herzstillstand und ungenügender Sauerstoffversorgung zusammen mit einer OP-Vergiftung führt zu einem ca. 3 min andauernden Atemstillstand, der zum Teil noch während der moderaten Hypoxie persistierte.

### 5.3.2.3 CRS-Vergiftung, Hypoxieprotokoll und 8-OH-DPAT

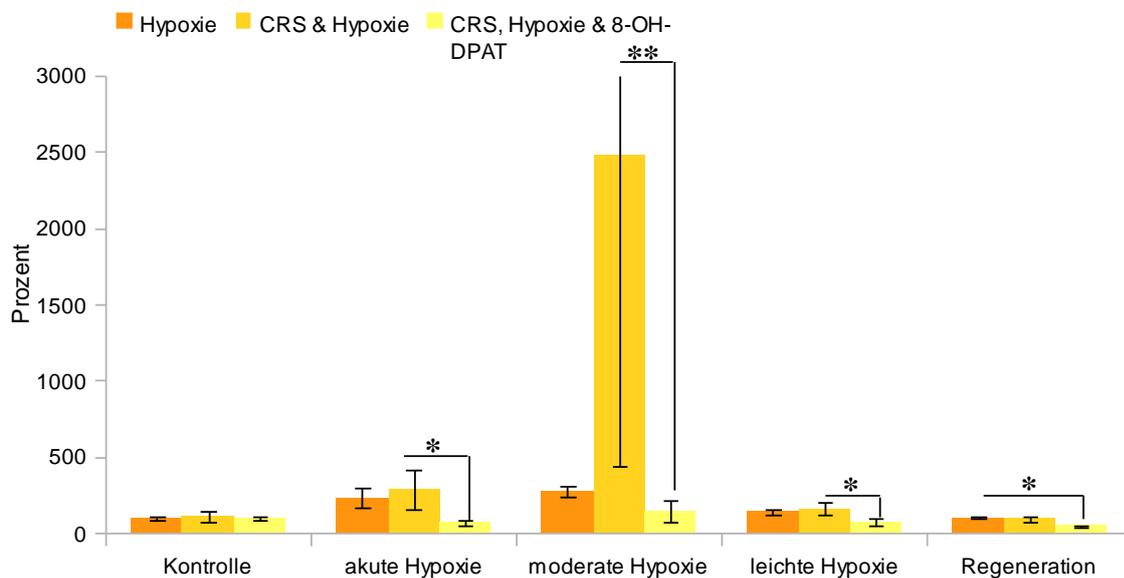
Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich der CRS-Effekt auf die Atmung durch einen simulierten peripheren Kollaps intensivieren lässt, wurde im Folgenden untersucht, wie sich die Gabe von 8-OH-DPAT hierauf auswirkt. Abb. 86 zeigt eine Gegenüberstellung der Effekte auf die Inspiration bei Anwendung des Hypoxieprotokolls.



**Abb. 86:** Inspirationsdauer während des Hypoxieprotokolls im Vergleich zu Hypoxie nach Vergiftung mit CRS und bei zusätzlicher Gabe eines Serotoninrezeptor-Agonisten.

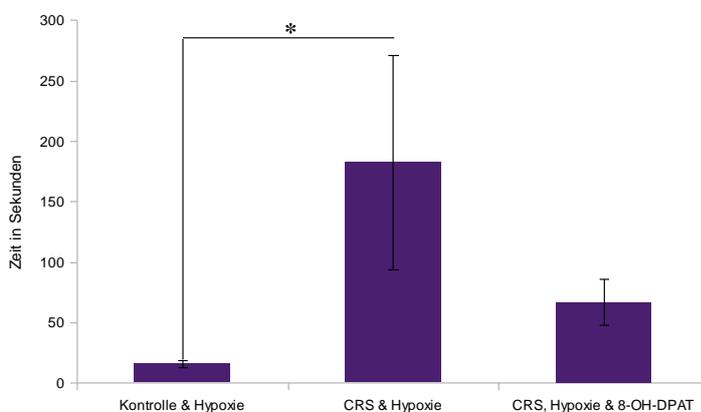
Wie aus Abb. 86 ersichtlich wird, unterscheiden sich die Hypoxieeffekte auf die Inspirationszeit bei zusätzlicher Gabe eines 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Agonisten nicht signifikant von den Werten nach CRS-Vergiftung. Während es in der Phase akuter Hypoxie zu einer erhöhten Inspirationsdauer kam, fiel die T<sub>i</sub> von 140 % auf knapp 90 % während der moderaten Hypoxie. Dieser Effekt ist auch bei alleiniger CRS-Vergiftung zu beobachten, während die Inspirationszeit

unter Normalbedingungen während der auf 50 % reduzierten Pumpleistung weiterhin ansteigt. Die Ergebnisse für die durchschnittliche Expirationszeit sind in Abb. 87 dargestellt.



**Abb. 87:** Expirationsdauer während des Hypoxieprotokolls, nach Vergiftung mit CRS und bei zusätzlicher Gabe eines Serotoninrezeptor-Agonisten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die Inspirationszeit unterschieden sich die Werte für  $T_e$  mit und ohne Serotoninrezeptor-Agonist nach CRS-Vergiftung deutlich voneinander. Während der akuten Hypoxiephase kam es zu einer Abnahme der Expirationszeit auf 70 % des Wertes, der unter Normalbedingungen gemessen wurde. Dieser Trend setzt sich während der gesamten Versuchslaufzeit fort. Selbst in der 20 minütigen Regenerationsphase blieb die Expirationszeit bei nur 50 %, verglichen mit dem  $T_e$ -Wert unter Normalbedingungen. Auch auf die Apnoephase, die zu Beginn des Hypoxieprotokolls in allen Versuchsansätzen eintrat, wirkte sich die zusätzliche Gabe von 8-OH-DPAT aus (siehe Abb. 88).



**Abb. 88:** Apnoephasen während des Hypoxieprotokolls im Vergleich.

Während die Phase ohne *N. phrenicus* Aktivität bei der Vergiftung mit CRS annähernd 3 min betrug, wurde sie durch die Gabe von 8-OH-DPAT in den Perfusionskreislauf auf ca. 1 min reduziert.

## 6 Diskussion

### 6.1 Verteilungsmuster der AChR Subtypen

#### 6.1.1 Muskarinische Acetylcholin Rezeptoren

Die Verteilung der Acetylcholin-Rezeptoren im Körper, vor allem von Säugetieren, wird seit vielen Jahren mit verschiedenen Techniken auf der physiologischen und molekularen Ebene untersucht. So konnten bereits in den 80er Jahren durch Radioligandenbindung in Schnitten des Gehirns männlicher Ratten, Bindestellen der muskarinischen AChR in bestimmten Regionen des Hirnstamms nachgewiesen werden (Wamsley et al., 1981). Durch molekularbiologische Methoden wie die Gruppe um Buckley 7 Jahre später die mRNA für die soeben identifizierten und klonierten  $M_1$ - $M_4$  Subtypen, ebenfalls im Rattenhirn, nach (Buckley et al., 1988). Anfang der 90er Jahre wurden schließlich erste Versuche mit selektiven Antikörpern unternommen und es konnte mittels Immunpräzipitation gezeigt werden, dass sämtliche muskarinische Subtypen im Hirnstamm der Ratte präsent sind (Levey et al., 1991). Es folgten zahlreiche Publikationen zur Verteilung bestimmter Subtypen, eine genaue Charakterisierung der Verteilungsmuster mit Hinblick auf bestimmte physiologische Funktionen, wie der Atmung, ist für die Ratte bislang allerdings nicht erfolgt.

Die hier vorgestellte Arbeit zeigt nun erstmalig, das Vorhandensein muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren in den mit Atmung assoziierten einzelnen Kerngebieten der VRG, DRG und PRG unter Anwendung einer einheitlichen Methode und in einer Spezies.

Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen in perfundierten Rattenhirnschnitten durchgeführt. Der monoklonale Antikörper M35, der durch die Gruppe um Luiten charakterisiert und als unselektiv gegenüber den verschiedenen muskarinischen AChR Subtypen beschrieben wurde (Carsi-Gabrenas et al., 1997; van der Zee and Luiten, 1999) kam hauptsächlich zum Einsatz. Mit diesem Antikörper wurden positive Neuronen in jedem untersuchten Areal festgestellt, die Anzahl der angefärbten Zellen war für die DRG und die PRG besonders hoch. Auf Grund der mit der HistoQuest Software ausgewerteten Schnitte, liegt die Vermutung nah, dass auch in den verschiedenen Kompartimenten der VRG ca. 50% der vorhandenen Zellen positiv sind. Die Zelldichte scheint nicht vergleichbar zu sein mit z. B. dem *Nucleus Parabrachialis* oder dem *Nucleus Tractus Solitarius*.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Mallios et al. bei der Untersuchung der Atemzentren der Katze mit radioaktiv markierten Sonden für  $M_1$ - $M_3$  erhalten. Sie beschreiben eine heterogene Verteilung der einzelnen Subtypen in den analysierten Hirnstammarealen mit den meisten Signalen im Bereich des NTS und dem lateralen Nucleus parabrachialis. In der VRG sind laut ihren Beobachtungen, ebenfalls nur wenige mAChRs lokalisiert (Mallios et al., 1995).

Die Gruppe um Wamsley untersuchte ebenso den Hirnstamm der Ratte und fand Bindestellen für das radioaktiv-markierte Quinuclidinyl Benzilat (BZ), einen muskarinischen kompetitiven Antagonisten, in verschiedenen Arealen. Die beschriebenen Kerngebiete sind sehr gut vergleichbar mit den unter 4.1.3 vorgestellten Antikörperfärbungen. So wurden Anreicherungen radioaktiver Isotope in *Nucleus Facialis*, *Nucleus Tractus Solitarius*, *Nucleus spinalis nervi trigemini* und im *Nucleus Parabrachialis* gefunden (Wamsley et al., 1981). Die mit dem monoklonalen M35 Antikörper erhaltenen Ergebnisse passen daher in den wissenschaftlichen Kontext und zu Ergebnissen, die in anderen Spezies erzielt wurden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen mit Subtyp-spezifischen Antikörpern für  $M_1$ - $M_3$  lieferten ein nicht voneinander zu unterscheidendes Expressionsmuster. Die Vermutung, dass sich ein Subtyp als vorherrschend darstellen würde, wurde nicht bestätigt.

Während Buckley et al. hauptsächlich die mRNA des  $M_2$  Rezeptors im Hirnstamm nachwiesen (Buckley et al., 1988) und auch Levey mit Immunpräzipitation mehrheitlich  $M_2$  aus dem Hirnstamm anreicherte (Levey et al., 1991), zeigten die in dieser Arbeit vorgestellten Antikörperfärbungen in den Atemzentren der Ratte nicht diese Tendenz. Mit Doppelmarkierungen wurde daher versucht, den subjektiv gewonnenen Eindruck eines ähnlichen Expressionsmusters zu verifizieren.

Auf Grund der Wirtsspezies der verwendeten Antikörper war es möglich, M35 jeweils mit den Antikörpern für  $M_1$ - $M_3$ , zu kombinieren. Hier zeigte sich, wie auch bei der Kombination von  $M_1$  mit  $M_3$  ein vollständiges Overlay der Signale (siehe Abb. 60 und 61). Die hieraus gewonnene Erkenntnis lässt darauf schließen, dass die Neuronen in den Atemzentren der Ratte verschiedene muskarinische AChRs co-exprimieren.

Für intrinsische Neuronen im Ratten- und Meerschweinchen-Herz, sowie für striatale Neuronen im Rattenhirn ist diese Co-Expression verschiedener mAChR Subtypen in ein- und derselben Zelle auf Ebene der mRNA nachgewiesen worden (Bernard et al., 1992; Hassall et al., 1993). Auch wenn das Vorhandensein von mRNA noch nicht die Präsenz funktioneller Proteine bedeutet, erscheinen die hier gezeigten Ergebnisse daher durchaus plausibel.

Die muskarinischen Subtypen unterscheiden sich in den Signalwegen, die sie bei Bindung ihres Liganden initiieren.  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  aktivieren über G-Proteine der  $G_{q/11}$  Familie Phospholipase C (PLC) und initiieren so den Phosphoinositid-Stoffwechsel. Im Gegensatz dazu inhibieren  $M_2$  und  $M_4$  über G-Proteine der  $G_i/G_o$  Familie die Bildung der Adenylylcyclase und damit die Umwandlung von ATP zu cAMP (Nathanson, 2008). Während  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  also eine stimulierende Wirkung auf die Signaltransduktion vom Zelläußeren ins Zellinnere ausüben, inhibieren  $M_2$  und  $M_4$  die Signalweiterleitung. Weitere Diversität innerhalb der Gruppe der mAChRs kommt durch die unterschiedliche Verteilung des Rezeptors auf der Zelloberfläche zustande. So scheinen  $M_1$  Rezeptoren meist postsynaptisch und  $M_2$  Rezeptoren

ren meist präsynptisch exprimiert zu werden (Levey et al., 1991; Nathanson, 2008), aber auch das ist abhängig von Gewebe und Zelltyp. So wurden bislang sowohl Funktionen für mAChRs als Autorezeptoren, die präsynaptisch exprimiert die Synthese und Freisetzung von ACh regulieren, beschrieben, wie auch als Heterorezeptoren, die postsynaptisch exprimiert, die Freisetzung anderer Transmitter beeinflussen (Nathanson, 2008; Rouse et al., 2000).

Durch diese Vielfalt an Funktionen, die den muskarinischen Acetylcholin Rezeptoren zugeschrieben wird, ist es also durchaus vorstellbar, dass, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, verschiedene Subtypen in einem Neuron exprimiert werden, um dort verschiedene Signalkaskaden zu initiieren.

Auf den in Abschnitt 5.1.3 gezeigten Bildern, lässt sich das positive Signal nicht nur in der Plasmamembran, wie bei einem membranständigen Rezeptor zu erwarten, finden, sondern auch im Cytoplasma. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die unspezifische Bindung sowohl der Primärantikörper, wie auch der markierten Streptavidine, die an möglicherweise vorhandenes endogenes Biotin binden. Letzteres wurde überprüft, indem Gewebeschnitte ohne vorherige Antikörperbehandlung direkt mit markiertem Streptavidin inkubiert wurden. Im Anschluss konnten keine gefärbten Zellen entdeckt werden. Des Weiteren wurde auch bei Verwendung eines Biotin-Block-Schrittes kein anderes Färbeergebnis erzielt. Dass die Cytoplasmafärbung auf endogenes Biotin zurückzuführen ist, scheidet daher als Erklärung aus.

Das Phänomen der Cytoplasmafärbung für mAChRs wurde allerdings auch schon von anderen Gruppen für verschiedene Subtypen im ZNS beschrieben (Levey et al., 1991). So fand sich der M<sub>4</sub> Rezeptor in cholinergen Interneuronen hauptsächlich cytoplasmatisch (Bernard et al., 1999). Auch M<sub>2</sub> wurde in Neuronen des *Nucleus basalis magnocellularis* zu 50% in intrazellularen Kompartimenten gefunden. Eine mögliche Erklärung für das tatsächliche Vorhandensein des Rezeptors im Cytoplasma ist, dass es lokal zu dem Zeitpunkt entweder zur Synthese, zum Transport oder zur Internalisation des Rezeptors kommt (Nathanson, 2008).

Wo der Rezeptor hauptsächlich lokalisiert ist, scheint von Subtyp, dem Zelltyp in dem er exprimiert wird, und vom Alter des Versuchstieres abhängig zu sein. So konnten Decossas et al. zeigen, dass mit zunehmendem Alter in Ratten die Anzahl an M<sub>2</sub> mAChRs in unterschiedlichem Maße im Cytoplasma oder in der Zellmembran abnimmt, je nach Hirnareal (Decossas et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die mit mAChR Antikörpern erlangten Ergebnisse vollständig in den wissenschaftlichen Kontext eingliedern lassen und in keinem Widerspruch zu den bisher veröffentlichten Erkenntnissen auf dem Gebiet stehen. Eine genauere Analyse, ob in den Atemzentren tatsächlich verschiedene mAChRs von einzelnen

Neuronen exprimiert werden, könnte mittels *in-situ* Hybridisierung oder single cell RT-PCR weiter untersucht werden.

### 6.1.2 Nikotinische Acetylcholin Rezeptoren

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist der typische Rezeptor der neuro-muskulären Endplatte. Hier befindet er sich post-synaptisch und leitet so die eintreffenden Signale der Motoneuronen an den Muskel weiter (Zouridakis et al., 2009). 1972 benutzte die Gruppe um Bosmann  $\alpha$ -Bungarotoxin, ein Schlangengift, welches selektiv an den peripheren nikotinischen AChR band, im ZNS und zeigte so das Vorhandensein von nAChRs im Gehirn von Meerschweinchen (Bosmann, 1972; Morley et al., 1979). In den 80er Jahren gelang es Clarke, Patrick und Heinmann Einsicht auf molekularer Ebene in die Diversität der nikotinischen Rezeptoren im Gehirn zu erlangen (Boulter et al., 1987; Boulter et al., 1986; Goldman et al., 1987; Goldman et al., 1986; Patrick et al., 1987). Mittlerweile wurde eine Vielzahl an neuronalen nAChRs gefunden, die sich aus verschiedenen Untereinheiten zu Pentameren zusammensetzen. So wurden bis jetzt Homomere ( $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_9$  und  $\alpha_{10}$ , Heteromere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ( $\alpha_4\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta_4$  und  $\alpha_4\alpha_2\beta_3$ ) und Heteromere, die nur aus  $\alpha$ -Untereinheiten bestehen ( $\alpha_7\alpha_8$  und  $\alpha_9\alpha_{10}$ ), beschrieben (Zouridakis et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei häufigsten im ZNS vorkommenden nAChRs untersucht, zum einen das  $\alpha_7$  Homomer und das Heteromer bestehend aus  $\alpha_4$  und  $\beta_2$  Untereinheiten. Letzteres wurde mit einem Antikörper gegen die  $\beta_2$ -Untereinheit lokalisiert, deren Vorkommen bislang nur für diesen Subtypen beschrieben wurde.

Bei den Färbungen ergab sich dasselbe Bild wie für die muskarinischen AChR Subtypen.

Es fanden sich positive Zellen in jedem untersuchten Kerngebiet, das mit Atmung assoziiert wird. Ebenso wie für die muskarinischen AChRs waren vor allem positive Neuronen im PRG und in der DRG zu finden. Auch in den motorischen Kerngebieten waren, wie schon Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Wada et al., 1989; Zaninetti et al., 1999) zeigten, beide Untereinheiten vorhanden. Mit immunhistochemischen Methoden hatten Dehkordi et al.  $\alpha_7$  und  $\alpha_4$  Untereinheiten in der rostralen ventralen Medulla und der caudalen Pons nachgewiesen. In Bereichen, die in etwa der parafacialen respiratorischen Gruppe entsprechen, sowie im NTS und in der rostralen VRG fanden sie positive Zellen (Dehkordi et al., 2004; Dehkordi et al., 2007), was ebenfalls den hier vorgestellten Ergebnissen entspricht.

Die Überprüfung der Spezifität der beiden benutzten Antikörper mittels Western Blot führte nur für den die  $\beta_2$  Untereinheit detektierenden Antikörper zu einem Ergebnis. Die Proteinbande entsprach der zu erwartenden Größe von 85 kDa und fand sich sowohl im Überstand als auch im Pellet nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Aufreinigung.

Für den monoklonalen Antikörper, der an die  $\alpha_7$  UE binden sollte, fand sich auch nach einem zusätzlichen Amplifikationsschritt keine Bande.

Wie in Abschnitt 5.1.4 dargestellt, wurde anhand von Co-Färbungen festgestellt, dass, ähnlich den muskarinischen AChRs, auch die beiden überprüften nikotinischen Untereinheiten co-exprimiert werden. Selbiges wurde auch schon für cholinerge Neuronen des medialen Septums mittels Doppel-*in-situ* Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen (Azam et al., 2003), sowie für Neuronen des Hippocampus (Sudweeks and Yakel, 2000; Zarei et al., 1999). Die Präsenz beider Untereinheiten in einer Zelle spricht zum einen für das Vorhandensein des  $\alpha_7$  Homomers sowie des  $\alpha_4\beta_2$  Heteromers, lässt aber auch die Vermutung zu, dass es eine Kombination aus  $\alpha_7$  und  $\beta_2$  gibt, die ebenfalls einen funktionellen heteromeren Rezeptor formt (Azam et al., 2003; Khiroug et al., 2002), *in-vivo* jedoch bislang nicht nachgewiesen werden konnte.

### 6.1.3 Co-Färbungen

Durch die sehr ähnlichen Expressionsmuster der untersuchten nAChRs und mAChRs lag die Vermutung nahe, dass nicht nur verschiedene nikotinische UE und muskarinische Subtypen co-exprimiert werden, sondern in einer Zelle sowohl muskarinische als auch nikotinische Rezeptoren zur Signalweiterleitung genutzt werden. Um dies zu überprüfen wurden Co-Färbungen mit nikotinischen und muskarinischen AChR Antikörpern durchgeführt, die, wie beispielhaft in Abb. 62 und 63 gezeigt, darlegen, dass sowohl der G-Protein-gekoppelte Rezeptor, wie auch der ligandengesteuerte Ionenkanal in einem Neuron co-exprimiert werden. Dieses Phänomen ist auch für andere Hirnbereiche beschrieben worden. So wird im Hippocampus und im Cortex die Acetylcholin-Ausschüttung durch die Kontrolle co-exprimierter muskarinischer und nikotinischer präsynaptischer Autorezeptoren reguliert.

Während die muskarinischen Rezeptoren auch als negative Autorezeptoren bezeichnet werden und die ACh-Ausschüttung inhibieren (Vannucchi and Pepeu, 1995), steigern die nikotinischen AChRs in denselben Neuronen die Freisetzung des Neurotransmitters und werden daher auch als positive Autorezeptoren bezeichnet (Rowell and Winkler, 1984) (Araujo et al., 1988; Azam et al., 2003).

Auch in Zellen des *Corpus Striatum* konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_4\beta_2$  und  $M_4$  zusammen exprimiert werden und gegenteilige Effekte auf die GABA-Ausschüttung ausüben. So ruft die Aktivierung des nikotinischen Rezeptors die GABA-Freisetzung hervor, die durch die Aktivierung des muskarinischen Rezeptors inhibiert wird (Grilli et al., 2009).

Da es sich bei den nikotinischen AChRs, im Gegensatz zu den G-Protein-gekoppelten mAChRs, um ligandengesteuerte Ionenkanäle handelt, ermöglichen sie nach Öffnung der Kanalpore einen Kationenfluss entlang des elektro-chemischen Gradienten und damit eine wesentlich schnellere Signalweiterleitung als mAChRs über den G-Protein ge-

koppelten Signalweg. Auf Grund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, ergibt sich die Hypothese, dass in den Atemzentren der Ratte unterschiedliche Signalkaskaden durch muskarinische und nikotinische AChRs aktiviert werden. Es ergibt sich eine enorme Vielfalt an initiierten Signalkaskaden aus dem Vorhandensein sowohl verschiedener muskarinischer wie auch nikotinischer Subtypen in einer einzelnen Zelle.

Mit 15 verschiedenen Rezeptorsubtypen, die zudem noch prä- oder postsynaptisch lokalisiert sein können, wird Serotonin die Beteiligung an einer Vielzahl von Körperfunktionen zugeschrieben wie Appetit, Schmerz, synaptische Plastizität, Schlaf, Thermoregulation und Atmung. Der hier untersuchte 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor erlangte klinische Bedeutung durch pharmakologische Untersuchungen, bei denen festgestellt wurde, dass Rezeptor Agonisten gegen Angst und Beklemmungsgefühle wirken, während Antagonisten die Wirkung von Serotonin-Wiederaufnahmehemmern beschleunigen (Artigas et al., 1996).

Seit den 80er Jahren wurde gezeigt, dass die Neuronen der Atemzentren im Gehirn von der kleinen Population Serotonin-sekretierender Zellen in den *Raphé Nuclei* des Hirnstamms innerviert werden (Connelly et al., 1989; Hodges and Richerson, 2008; Holtman et al., 1984; Steinbusch, 1981; Voss et al., 1990). Mittlerweile ist der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor im respiratorischen Netzwerk gut untersucht. So führt die Applikation von Serotonin in respiratorischen Neuronen zu einer verringerten Erregbarkeit (Bonham, 1995; Lalley et al., 1994a; Lindsay and Feldman, 1993) und es konnte gezeigt werden, dass Atemstörungen durch Serotonin-Agonisten behoben werden können (Feldman et al., 1992; Lalley et al., 1994b; Manzke, 2004; Sahibzada et al., 2000; Wilken et al., 1997). Eine Co-Lokalisation von 5-HT<sub>1A</sub> und  $\mu$ -Opioid Rezeptoren für Neuronen des PräBötzinger Komplexes konnte bereits gezeigt werden, außerdem, dass 80% der Zellen im PräBötzinger Komplex den Serotonin-Rezeptor exprimieren (Manzke, 2004). Die hier präsentierten Daten, die ergeben, dass 5-HT<sub>1A</sub> in allen Atemzentren der DRG, VRG und PRG exprimiert wird, waren daher durchaus zu erwarten. Die Co-Lokalisation von muskarinischen wie auch nikotinischen Untereinheiten mit dem 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor ist für den Hirnstamm allerdings zuvor noch nicht bewiesen worden.

Für den 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor, der im Gegensatz zu dem 5-HT<sub>1A</sub> zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen gehört, wurde in striatalen Neuronen ebenfalls eine Co-Lokalisation mit der nikotinischen  $\alpha_4$  Untereinheit und eine wechselseitige Regulierung beschrieben. (Dougherty and Nichols, 2009; Nayak et al., 2000).

Die Neuronen im respiratorischen Netzwerk scheinen einer sehr komplizierten Verschaltung unterworfen zu sein, da sie, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, nicht nur Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter exprimieren, sondern durch unterschiedliche Subtypen und Lokalisation der Rezeptoren in der Zelle eine enorme Vielfalt an Signalübertragungsmöglichkeiten aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich zu den immunhistochemischen Untersuchungen sagen, dass klar gezeigt werden konnte, dass wichtige nikotinische und muskarinische Subtypen sowohl in VRG und DRG als auch in den pontinen Atemzentren zu finden sind. Vor dem medizinischen Hintergrund dieser Arbeit lässt sich daher klar sagen, dass es Angriffspunkte für Organophosphate in den Atemzentren der Ratte gibt, die zentrale Effekte auf die Atmung nach Vergiftung erklären.

Die Ergebnisse der Co-Färbungen deuten auf einen äußerst komplexen Regelmechanismus, bei dem sowohl nikotinische als auch muskarinische Rezeptoren eine Rolle spielen und nicht nur die Transmitter-Freisetzung sondern auch die Rezeptor-Regulierung beeinflussen. In diesem Zusammenhang wäre es durchaus von Interesse mit hochauflösenden Mikroskopieverfahren, wie der konfokalen Laser-Scanning Methode oder Elektronenmikroskopie, einen Einblick in die genaue Lokalisation der Rezeptoren in den Neuronen zu erlangen. Da beide Acetylcholinrezeptortypen prä- und postsynaptisch im ZNS gefunden wurden, ließe sich durch ihre Lokalisation in den Neuronen der Atemzentren ein genauerer Hinweis auf ihre Funktion erhalten. Dass auch der Serotonin Rezeptor 5-HT<sub>1A</sub> mit den AChRs colokalisiert ist, eröffnet eventuell einen neuen Ansatzpunkt bei der Therapie von OP-Vergiftungen und bedarf genauerer Untersuchung mittels physiologischer Experimente.

## **6.2 Effekte rezeptoraktiver Wirkstoffe in der perfundierten Hirnstammpräparation**

Auf Grund der positiven Färbeergebnisse, die das Vorhandensein sowohl muskarinischer als auch nikotinischer AChRs in den Atemzentren der Ratte zeigten, wurden physiologische Experimente mit der perfundierten Hirnstammpräparation durchgeführt. Die Methode ist nicht nur eine Alternative zu Tierversuchen, sondern eröffnet im Vergleich zu *in-vivo* Versuchen die Möglichkeit, die zentralen Effekte auf die Atmung unabhängig vom Herz-Kreislauf-System zu analysieren. Gerade bei dem Einsatz von Acetylcholin-Agonisten und -Antagonisten kommt dem eine besondere Bedeutung zu, da sich die Rezeptoren nicht nur zentral im ZNS befinden, sondern auch in diversen Organen in der Peripherie gefunden wurden. Dadurch dass die Oxygenierung des Gewebes und vor allem des Hirnstamms durch eine externe Pumpe ermöglicht wird, können die beobachteten Effekte klar zentralen Vorgängen im Gehirn zugeschrieben werden.

### **6.2.1 Nikotinische Antagonisten und Agonisten**

Nachdem der Nachweis gelang, dass sowohl die  $\alpha_7$  wie auch die  $\beta_2$  Untereinheit der nikotinischen AChRs in DRG, VRG und PRG exprimiert werden (siehe Abschnitt 5.1.3), wurde mittels physiologischer Experimente versucht einen tieferen Einblick in ihre Funktion bei der Regulierung der Atmung zu erlangen.

Als Antagonisten dienten die beiden Untereinheit-spezifischen kompetitiven Blocker DH $\beta$ E und MLA, sowie der nicht-kompetitive Antagonist TMPH.

Methyllycaconitin (MLA) ist ein selektiver Blocker der  $\alpha_7$  Untereinheit der nikotinischen AChRs (Ward et al., 1990) und wurde in diversen Experimenten verwendet, um den Einfluss Nikotins auf kognitive Funktionen wie Lernen oder Gedächtnis zu untersuchen (Dani and Bertrand, 2007). Auch im Zusammenhang mit respiratorischen Funktionen sind bereits mehrere Studien durchgeführt worden. So konnten Hatori et al. zeigen, dass durch Applikation von 0,1 – 100  $\mu$ M MLA die Atemfrequenz signifikant verringert wird (Hatori et al., 2006). Im Gegensatz dazu war MLA in einer Arbeit der Feldman-Gruppe ineffektiv, bei der Reduzierung einer erhöhten Atemfrequenz durch vorangegangene Nikotin-Applikation (Shao and Feldman, 2002).

In der perfundierten Hirnstammpräparation wurden nach Aufnahme der Kontrollaktivität 20  $\mu$ M MLA der Perfusionslösung zugesetzt. Es kam jedoch zu keinen signifikanten Auswirkungen auf die Atemparameter (siehe Abb. 72 und 73), obwohl durch die immunhistochemischen Experimente und Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen das Vorhandensein der  $\alpha_7$  Untereinheit in den Atemzentren bewiesen wurde. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben von Effekten mag die Struktur von MLA sein, die darauf hindeutet, dass das Molekül nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig ist. Die zuvor zitierten Arbeiten von Hatori und Shao verwenden Gewebelöcke bzw. isolierte Hirnstamm-Rückenmark-Präparationen, beide werden nicht über ein Gefäßsystem perfundiert und mit Sauerstoff versorgt, sondern durch Diffusion. Die Behinderung durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist daher nicht gegeben. Ob die BHS in der perfundierten Hirnstammpräparation allerdings intakt ist, wurde bislang nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch auch Substanzen wie Carbachol verwendet, die, obwohl nicht BHS-gängig, Effekte erzielten.

Um auszuschließen, dass die  $\alpha_7$  UE bei der zentralen Regulierung der Atmung eine Rolle spielt, sollten daher sowohl Versuche mit höheren MLA Konzentrationen durchgeführt werden, als auch Versuche, bei denen zuvor ein nAChR Agonist gegeben wurde, um möglicherweise die Rezeptoren zu aktivieren. Vergleichbar sind die hier erhaltenen Ergebnisse mit den zuvor zitierten Arbeiten auf Grund der unterschiedlichen Präparationen nur bedingt.

Dihydro- $\beta$ -Erythroidin Hydrobromid (DH $\beta$ E) ist ebenfalls ein kompetitiver Antagonist, allerdings spezifisch für den nikotinischen  $\alpha_4\beta_2$  Subtyp. Auch er fand bereits Anwendung bei Untersuchungen zur Beteiligung des nAChRs an der zentralen Atemregulierung. So nutzte ihn die Gruppe um Kuwana bei ihren Experimenten in neugeborenen Ratten und erreichte mit dem Einsatz von 20  $\mu$ M eine Verringerung der Atemfrequenz (Hatori et al., 2006). Shao und Feldman konnten ebenfalls mit DH $\beta$ E die durch Nikotin gestiegene Atemfrequenz, in

medullären Blockpräparaten neugeborener Ratten wieder reduzieren (Shao and Feldman, 2002). Die bei den hier vorgestellten Versuchen eingesetzten 40  $\mu\text{M}$  führten zu keinen ausgeprägten Effekten auf die Atemparameter (siehe Abb.71 und 73). Dass die Substanz jedoch die BHS überwinden kann, konnten Damaj et al. bei Experimenten an Mäusen zeigen. DH $\beta$ E konnte einige, durch Nikotin hervorgerufene, zentral induzierte Verhaltensänderungen aufheben (Damaj et al., 1995). Dass die Substanz die nikotinischen AChRs im Hirnstamm nicht erreicht, ist also sehr unwahrscheinlich.

Die Literatur zu DH $\beta$ E und dessen Auswirkungen auf die Atmung liefert allerdings auch widersprüchliche Ergebnisse. Während Hatori et al. einen Effekt auf die Atemfrequenz beobachteten, wandten Murakoshi et al. dieselbe Präparation an und erzielten mit DH $\beta$ E keine Reduzierung der zuvor durch ACh gesteigerten Atemfrequenz (Murakoshi et al., 1985). Es bleibt daher zu überprüfen, ob DH $\beta$ E in höheren Konzentrationen oder nur nach vorheriger Stimulation der AChRs Wirkung in der perfundierten Hirnstammpräparation zeigen kann.

TMPH ist der einzige getestete nicht-kompetitive Antagonist und wurde erstmalig 2005 beschrieben. Ihm wird eine höhere Affinität für heteromere Subtypen zugesagt, vor allem wenn sie aus  $\alpha_3/\alpha_4$  und  $\beta_2/\beta_4$  zusammengesetzt sind (Papke et al., 2005). In Mäusen wurde von selbiger Arbeitsgruppe gezeigt, dass TMPH die BHS durchdringt, aber nur einige der zuvor durch Nikotin hervorgerufenen Effekte blockiert, also auch *in-vivo* eine gewisse Selektivität besitzt (Damaj et al., 2005). In ihrem Versuch setzten sie dabei 1-5 mg TMPH pro kg Körpergewicht ein, was bei den hier verwendeten Ratten 100-500  $\mu\text{g}$  in 6 ml Blutvolumen entspräche. Bei der perfundierten Hirnstammpräparation befindet sich der Antagonist jedoch in der Perfusionsflüssigkeit, die mit 200 ml ein Vielfaches des normalen Blutvolumens darstellt. Die dem Perfusat zugesetzten 3 mg entsprechen daher in etwa derselben Konzentration in der zirkulierenden Flüssigkeit. Während die Gruppe um Papke jedoch keine Auswirkungen auf die Atmung in ihrem Versuch bei Mäusen beschreibt, waren die Effekte auf die Atemparameter bei der WHBP mit Ratten enorm. Während die Expirationsdauer signifikant um das Vierfache anstieg, kam es zu einem enormen Abfall der Atemfrequenz und dadurch zu einer Reduzierung des Atemvolumens um 80 % (siehe Abb. 70 und 73).

Dass die Aktivierung der  $\alpha_4$  UE im PräBötzinger Komplex zu einer Steigerung der Atemfrequenz führt, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Shao and Feldman, 2009; Shao et al., 2008). Dass die Blockade eben dieses Rezeptors eine Verringerung der Atemfrequenz bewirkt passt daher sehr gut zu bislang veröffentlichten Ergebnissen.

Da sowohl DH $\beta$ E als auch TMPH die BHS durchdringen und antagonistisch an denselben nikotinischen UEs binden, lässt sich der enorme Unterschied in der Effektivität der beiden Substanzen nur durch ihre unterschiedlichen Kinetiken erklären. Während es sich bei DH $\beta$ E

um einen kompetitiven Antagonisten handelt, der mit Acetylcholin oder Nikotin konkurrieren muss und durch höhere Konzentrationen vom Rezeptor verdrängt werden kann, ist TMPH ein nicht-kompetitiver Antagonist. Es ist in der Lage, irreversibel an den Rezeptor zu binden und ihn so dauerhaft zu inaktivieren. Auch höhere ACh oder Nikotin-Konzentrationen vermögen diese Hemmung nicht zu reversieren.

Die hier mit nikotinischen Antagonisten in der WHBP erlangten Ergebnisse zeigen also, dass sich eine dauerhafte Blockade nikotinischer AChRs im Hirnstamm, insbesondere des  $\alpha_4\beta_2$  Subtyps, auf die Expirationsdauer und die Atemfrequenz auswirkt. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist soviel ACh vorhanden, dass kompetitive Antagonisten von den nAChRs verdrängt werden können. Die zentral exprimierten nikotinischen AChRs scheinen also kontinuierlich durch endogenes Acetylcholin stimuliert zu werden.

Lobelin ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid der Pflanze *Lobelia inflata*, ist leicht lipophil und fähig die BHS zu überwinden (Reavill et al., 1990). Für Lobelin ist eine stimulierende Wirkung auf die Atmung beschrieben, wodurch es in der Human- und Veterinärmedizin Anwendung findet. Es bewirkt eine Beschleunigung der Atmung und eine Verkürzung der Inspirations- und Expirationszeit über eine Erregung peripherer Chemorezeptoren der Carotis und Aorta. In höheren Konzentrationen ist auch eine direkte Wirkung auf die *Medulla oblongata* beschrieben worden (Bureau et al., 1999; cliniPharm, [www.vetpharm.uzh.ch](http://www.vetpharm.uzh.ch); Frey and Löscher, 2007; Sloan et al., 1988).

Bevor es bei den hier vorgestellten Versuchen in der Präparation zu einem Kollaps der *N. Phrenicus* Aktivität kommt, ist kurzzeitig eine Abnahme der Expirationszeit und eine Erhöhung der Atemfrequenz feststellbar, begleitet durch eine drastische Verringerung der PN-Amplitude während der Inspiration (siehe Abb. 74). Dies sind die mit dem nikotinischen Agonisten zu erwartenden Auswirkungen und sie stehen exakt den Effekten nach Applikation von TMPH, welches die Zunahme der Expirationszeit und eine Erniedrigung der Atemfrequenz bewirkte, gegenüber. Auch die beobachtete Verringerung der Herzfrequenz ist eine für Lobelin beschriebene Wirkung (Sloan et al., 1988). Allerdings finden sich in der Literatur keine Angaben zu einem zentralen Atemkollaps, wie in der Präparation beobachtet.

Die normale Dosisempfehlung zur Wiederherstellung normaler Atemparameter beträgt 0,1 mg/kg, was umgerechnet auf die hier verwendeten Ratten 1,7  $\mu\text{g/ml}$  Blut entsprechen würde. Die hier verwandte Menge beträgt 37,5  $\mu\text{g/ml}$  Perfusionslösung, liegt also ca. 20-fach über dem empfohlenen Wert, allerdings immer noch weit unter der  $\text{LD}_{50}$  von Lobelin, die umgerechnet mit 1,8 mg/ml Blut bzw. Perfusionslösung angegeben ist.

Die Werte lassen sich jedoch von *in-vivo* Versuchen nicht eins zu eins auf die perfundierte Hirnstammpräparation übertragen. Es lässt sich aber anhand der Versuche festhalten, dass die Überstimulation durch Lobelin an den nAChRs zu einem zentralen Atemversagen führt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Beteiligung der nikotinischen AChRs bei der Aufrechterhaltung der gesunden Atmung. Der Einsatz eines Agonisten unter physiologischen Bedingungen führt zu einem kurzzeitigen Frequenzanstieg und einer verkürzten Expiration, bereits nach wenigen Minuten jedoch zu einem Kollaps der *N. Phrenicus* Aktivität.

Der nicht-kompetitive nikotinische Antagonist TMPH reduziert im Gegensatz dazu die Atemfrequenz enorm. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass nikotinische AChRs bei der Regulierung der Atemfrequenz eine entscheidende Rolle spielen und unter physiologischen Bedingungen ständig durch ACh aktiviert werden, so dass es zu einer Verdrängung kompetitiver Antagonisten vom Rezeptor kommt.

### 6.2.2 Muskarinische Antagonisten und Agonisten

Telenzepin ist ein Anticholinergicum, welches Einsatz zur Hemmung vermehrter Magensäureproduktion findet. Auf Grund seiner Struktur kann es die BHS nicht penetrieren. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, wurden in dieser Arbeit auch andere Substanzen verwandt, die nicht BHS-gängig sind, jedoch in der perfundierten Hirnstammpräparation Wirkung erzielten. Es gibt bis lang keine wissenschaftliche Untersuchung, die sich mit der BHS in dieser Präparation beschäftigt und so besteht, auf Grund vorhandener Ergebnisse, die Vermutung, dass die BHS in der perfundierten Hirnstammpräparation nicht intakt ist.

AQ-RA 741 wurde bereits in Neuronen des Hippocampus und Cortex benutzt, um die dort exprimierten mAChR-Subtypen zu klassifizieren (Stillman et al., 1996; Stoll et al., 2009; Stoll et al., 2003). Beide Substanzen zeigten, einzeln in das Perfusat verabreicht, keinen Effekt auf die Atemparameter und wurden daher miteinander kombiniert. Doch auch durch den gleichzeitigen Block des mAChR M<sub>1</sub> und des M<sub>2</sub> Rezeptors ließen sich keine eindeutigen Veränderungen hervorrufen (siehe Abb.75).

Es schloss sich daher ein Versuch mit einem AChR Agonisten an, um die Rezeptoren vor dem Einsatz muskarinischer Antagonisten zu stimulieren. Als Agonist wurde Carbachol verwandt, ein ACh-Analog, welches wesentlich unanfälliger für den Abbau durch AChE ist als Acetylcholin selber.

Auf Grund seiner Struktur (quartanäre Ammoniumverbindung) kann Carbachol die BHS nicht penetrieren, führte aber in den gezeigten Versuchen zu gravierenden Auswirkungen auf die Atemparameter. So kam es zu einem Anstieg von Inspirations- und Expirationszeit, bei gleichzeitig verringertem Atemvolumen durch Abnahme der Frequenz (siehe Abb.77).

Die Kombination dieses ACh-Agonisten, gefolgt von dem M<sub>1</sub> Antagonisten Telenzepin, ermöglichte eine Reversion der Carbachol-Effekte und führte zu der Wiederherstellung normaler Atemparameter.

Ob der Effekt des Telenzepins tatsächlich durch die selektive Blockade von M<sub>1</sub>-Rezeptoren zustande kam, lässt sich auf Grund fehlender Referenzwerte für die einzusetzende Konzentration nicht genau bestimmen. Da sämtliche mAChRs dieselbe Bindetasche aufweisen, unterscheiden sich die bekannten Antagonisten in ihrer Selektivität nur gering und binden ab höheren Konzentrationen sämtliche Subtypen (Servent and Fruchart-Gaillard, 2009). Aus diesem Grund wurde auch darauf verzichtet, diesen Versuch mit AQ-RA 741 zu wiederholen.

Obwohl daher der muskarinische Subtyp, auf den Telenzepin einwirkt, in diesem Versuch nicht genau bestimmt werden kann, zeigt sich, dass die Blockade von mAChRs nach Überstimulation der Rezeptoren zu einer Normalisierung der Atmung führt.

Für Versuche mit einem muskarinischen Agonisten kam Pilocarpin, ein Alkaloid aus den Blättern des *Pilocarpus jaborandi*, eines südamerikanischen Strauches, zum Einsatz. In der Medizin findet es Anwendung als Pupillen verengendes Mittel zur Behandlung bei Glaukomen, wirkt jedoch auch besonders schweißtreibend und speichelflußanregend (cliniPharm, [www.vetpharm.uzh.ch](http://www.vetpharm.uzh.ch)). Der Stoff penetriert die BHS und führte zu einer Atemfrequenzerniedrigung, wie auch für Carbachol beschrieben. Im Gegensatz dazu führt Pilocarpin jedoch wie Lobelin zu einer erhöhten Expirationszeit, welche durch Carbachol, einen unselektiven Agonisten, verringert wird.

Der Effekt nach Stimulation sowohl muskarinischer als auch nikotinischer Rezeptoren auf die Atmung lässt sich daher durchaus, von der selektiven Überstimulation einzelner Subtypen unterscheiden. Auch wenn sich die Effekte eines muskarinischen Agonisten und Carbachol unterschieden, war es dennoch möglich, die Carbachol-Effekte durch einen mAChR Antagonisten zu revidieren.

Deutlich wird durch diese Ergebnisse, dass sowohl muskarinische, als auch nikotinische AChRs an der Regulation der Atmung beteiligt sind und vor allem auf die Frequenz einwirken. Auf ihre genauen Einflüsse kann auf Grund der vorgestellten Ergebnisse nicht geschlossen werden, zumal sich die Aufgaben von mAChRs und nAChRs unter verschiedenen physiologischen Bedingungen unterscheiden. Diese Arbeit gewährt einen Einblick, wie kompliziert die Verschaltung der Neurotransmitter abläuft und wie viele zusätzliche Experimente von Nöten sein werden, um einen genaueren Einblick in die zugrunde liegenden Signalwege zu erlangen.

## 6.3 CRS

Nachdem sowohl das Vorhandensein als auch die Beteiligung muskarinischer und nikotinischer AChRs an der Regulation der Atmung gezeigt werden konnte, wurde zusätzlich der Effekt eines AChE-Hemmers in der perfundierten Hirnstammpräparation untersucht. Durch die Hemmung der Acetylcholinesterase kommt es zur Akkumulation von ACh im synaptischen Spalt und so ebenfalls zu einer Überstimulation der Acetylcholinrezeptoren.

Die hier vorgestellten Versuche wurden mit CRS, einem Organophosphat, durchgeführt, welches auf der einen Seite sehr schnell zu einer irreversiblen Hemmung der AChE führt, zum anderen in, mit ACSF-vergleichbaren, Puffern eine sehr geringe Halbwertszeit von 1,2 min aufweist (Busker et al., 1991). Daher wurde CRS nicht in die Perfusionsflüssigkeit, sondern über einen Dreiwegehahn direkt vor den Hirnstamm appliziert.

Als direkter Effekt konnte zuerst eine Apnoephase von ca. 12 s beobachtet werden, in welcher keine PNA zu messen war. Diese 12 s liegen deutlich über der durchschnittlichen Expirationszeit unter Kontrollbedingungen. Des Weiteren kommt es in den darauffolgenden Minuten zu einem Anstieg der Inspirations- und Expirationszeit, begleitet durch eine Reduktion der Atemfrequenz und eine pathologische Atmung, gekennzeichnet durch den Verlust der rampenförmigen *N. phrenicus* Aktivität. Diese Effekte entsprechen ziemlich genau den beobachteten Auswirkungen die Carbachol in der perfundierten Hirnstammpräparation erzielt. Wie auch bei diesem unselektiven AChR-Agonisten, waren die durch CRS aufgetretenen Effekte nur transient und 60 min nach Applikation kam es zur Regeneration der Atemparameter.

Dies ist eine äußerst interessante Beobachtung, vor dem Hintergrund des zentralen Atemversagens als Todesursache nach Organophosphatvergiftungen. Die hier dargestellten Experimente legen die Vermutung nah, dass es nach Vergiftung mit CRS zwar zu gravierenden Effekten auf die Atmung kommt, der Atemstillstand, wie auch die beobachteten Effekte jedoch nur transient sind und nicht die alleinige Todesursache darstellen.

Zu beobachten ist in der WHBP nur eine kurze Apnoephase von wenigen Sekunden, die jedoch ausreicht, um 98 % der im Hirnstamm vorhandenen AChE zu hemmen, was im Anschluss an diese Versuche mit einem modifizierten Ellman-Assay in den Hirnstamm-Homogenaten getestet werden konnte. Ob die verbleibenden 2 % aktiver AChE ausreichen, um die Signalübertragung durch Acetylcholin in den Atemzentren aufrecht zu erhalten, oder ob es konvergierende Transmittersysteme gibt, die die Überstimulation durch ACh kompensieren, bleibt unklar.

Adams et al. führten in den 70-iger Jahren Experimente an Meerschweinchen durch, die sie mit Soman oder Sarin vergifteten. Direkt nach OP-Intoxikation wurden die Tiere künstlich beatmet und es zeigte sich nach ca. 54 min eine spontane Reaktivierung der Atmung, sichtbar sowohl am Atemstrom als auch an der *in-vivo* abgeleiteten *N. Phrenicus* Akti-

*vität*. Parallel kam es während dieses Zeitraums zum Absinken der AChE-Aktivität auf unter 10 %. Die sich anschließende zusätzliche Soman bzw. Sarinvergiftungen zeigten keine Effekte mehr auf die wiederhergestellte PNA, so dass Adams et al. zu dem Schluss gelangten, dass die Regeneration der Atmung nicht auf der Restaktivität oder der Reaktivierung von AChE beruht (Adams et al., 1976).

Diese spontane Erholung nach künstlicher Beatmung ist vergleichbar mit den in der WHBP erhaltenen Ergebnissen. Auch hier wurde durch das begaste ACSF eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung gewährleistet, so dass sich die Atemparameter über einen Zeitraum von einer Stunde regenerieren konnten.

Auf der Suche nach konvergierenden Transmittersystemen, die eine mögliche Überstimulation durch ACh in den Atemzentren kompensieren könnten, wurden in dieser Arbeit Versuche mit einem Serotoninrezeptor-Agonisten durchgeführt. Nachdem mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden konnte, dass 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren mit muskarinischen und nikotinischen AChR co-exprimiert werden, wurde anhand der perfundierten Hirnstammpräparation ein Effekt auf die Atemparameter nach CRS-Vergiftung untersucht. 8-OH-DPAT, der eingesetzte Agonist, ist bekannt für seine stimulierenden Effekte auf die Atmung nach Opiat-induzierter Atemdepression (Manzke et al., 2009).

Anhand der hier gezeigten Ergebnisse (siehe Abb. 80 bis 82) ist ein geringer Einfluss des Serotoninrezeptor-Agonisten auf die zentrale Atmung nach OP-Vergiftung zu erkennen. Inspirations- und Expirationszeit waren nach 8-OH-DPAT-Gabe im Vergleich zu den erhöhten Werten nach CRS um ca. 10 %. Allerdings blieben die beiden Parameter auch nach 60 min noch unter dem Kontrollniveau. Auch das reduzierte Atemzugvolumen erholte sich nach Gabe des Serotoninrezeptor-Agonists schneller, allerdings waren alle beobachteten Effekte statistisch nicht aussagekräftig. Auch wenn sich die Atemparameter verbessern, wird die Gesamtzeit, die bis zur vollständigen Erholung von  $T_i$ ,  $T_e$  und des Atemzugvolumens benötigt wird, nicht verkürzt.

Ein großer Vorteil der perfundierten Hirnstammpräparation gegenüber konventionellen *in-vivo* Versuchen, ist zum einen der Wegfall narkosebedingter Effekte und zum anderen die kontinuierliche Oxygenisierung des Gewebes durch eine externe Pumpe ohne Beeinflussung durch periphere Störungen. Um dennoch einen Kollaps des Herzkreislaufsystems in der Präparation zu simulieren, um die Kombination peripherer und zentraler Effekte auf die Atmung nach Organophosphatvergiftung zu untersuchen, wurde ein etabliertes Hypoxieprotokoll angewandt. Durch die Reduktion bzw. den Stopp der externen Pumpleistung wird der Weitertransport sauerstoffhaltiger Flüssigkeit durch das Kreislaufsystem unterbrochen.

Die Reaktionen in der WHBP auf diesen Sauerstoffmangel sind unter Normalbedingungen eine sofortige Hypoxieantwort mit verkürzter Inspiration, erhöhter Atemfrequenz sowie PNA-Amplitude. Nach wenigen Sekunden andauernder Sauerstoffunterversorgung verlängern sich Inspirations- und Expirationszeit und es kommt zur Verringerung der Frequenz. Während der leichten Hypoxiephase, in der die Pumpleistung 75 % beträgt, stabilisieren sich die Atemparameter und kehren auf die Ausgangswerte zurück. Während der akuten Hypoxie kommt es zu einer Apnoephase, gekennzeichnet durch ein Ausbleiben der *N. Phrenicus* Aktivität, von 15,5 s und einer rapide verringerten Atemfrequenz.

Wurde das Präparat mit CRS vergiftet und als sekundärer Effekt ein Kollaps der Peripherie mit Hilfe des Hypoxieprotokolls simuliert, verlängerte sich die Apnoephase auf durchschnittlich ca. 3 min, in denen keine PNA zu erkennen war. Erst zum Ende der leichten Hypoxiephase konnten erste Reaktionen des *N. Phrenicus* in der Präparation festgestellt werden. Sie unterschieden sich in ihrer Dauer jedoch stark von  $T_i$  und  $T_e$  unter Normalbedingungen.

Eine mögliche Ursache für die beobachteten Effekte stellt die verlängerte Intoxikationszeit mit CRS, durch die Unterbrechung der Pumpaktivität, dar. Der Hirnstamm ist somit einer längeren Zeit dem Organophosphat ausgesetzt, bevor dieses im Perfusionskreislauf nicht nur hydrolysiert sondern auch weiter verdünnt wird. Allerdings stellen sich auch bei dieser Versuchsanordnung während der Regenerationsphase nahezu normale Atemparameter ein, was für einen Kompensationsmechanismus unter Zuhilfenahme anderer Transmittersysteme spricht.

Diese Ergebnisse lassen sich auch mit Hinblick auf einen massiven Einfluss der Peripherie bei dem Tod durch Atemversagen nach Organophosphatvergiftung deuten. Während bei gleichbleibender Sauerstoffversorgung die Atemzentren in der Lage sind, den Ausfall der AChE zu kompensieren, kommt es durch ein kollabierendes Herzkreislaufsystem zu lang anhaltenden zentralen Ausfällen. Selbst nach dieser mehrminütigen Apnoephase kommt es allerdings zu keinen irreversiblen Schäden an den Neuronen der Atemzentren, so dass sich ein normaler Atemrhythmus während der Regenerationsphase einstellt.

Die Wertigkeit zentraler und peripherer Effekte beim akuten Atemversagen nach OP-Vergiftung wird seit langem untersucht. So finden sich viele Veröffentlichungen die die zentralen Wirkungen auf die Atmung als ursächlich ansehen (Fleming et al., 1991; Gaspari and Paydarfar, 2007; Rickett et al., 1986). Auf Grund der hier vorgestellten Ergebnisse, die mit der perfundierten Hirnstammpräparation erhalten wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass zentrale und periphere Effekte zusammen einen tödlichen Atemstillstand herbeiführen.

Auch bei der Kombination aus Hypoxieprotokoll und CRS-Vergiftung wurde untersucht, ob der Serotoninrezeptor-Agonist 8-OH-DPAT einen Einfluss auf die veränderten Atemparameter ausübt. Dazu wurde 2 min nach CRS-Zugabe 8-OH-DPAT in die Perfusionslösung appli-

ziert und eine weitere Minute später das Hypoxieprotokoll mit einem Stopp der externen Pumpe gestartet.

Während die Inspirationszeit unverändert blieb (siehe Abb. 86), zeigten sich bei der Expirationszeit enorme Unterschiede zwischen den Werten nach alleiniger OP-Vergiftung und bei zusätzlicher Gabe des Serotoninrezeptor Agonisten. Bereits während der akuten Hypoxie verringerte sich die  $T_e$  auf 70 % verglichen mit dem Kontrollwert (siehe Abb. 87). Diese Verringerung setzte sich während des gesamten Versuchs fort und auch während der 20 min Regenerationsphase blieb die Expirationszeit verkürzt. Ein weiterer Effekt zeigte sich auf die Apnoephase, welche nach CRS-Vergiftung für 3 min zu beobachten war. Durch die Gabe von 8-OH-DPAT wurde die Zeit ohne PNA auf ca. 1 min verringert, was zwar immer noch das 4 fache der Zeit unter Normalbedingungen darstellt, allerdings eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur OP-Vergiftung bedeutet. Die Überstimulation der Rezeptoren durch im synaptischen Spalt verbleibendes Acetylcholin scheint daher zu einem gewissen Teil durch Serotonin kompensiert werden zu können.

Dass das cholinerge und das serotonerge System mit einander verschaltet sind, wurde schon für verschiedene ZNS Regionen beschrieben, so konnte mit 8-OH-DPAT im *Nucleus Accumbens* die Konzentration an extrazellulärem ACh verringert werden (Rada et al., 1993), während die Stimulation von 5HT Rezeptoren im Spinalkanal zu einer vermehrten Freisetzung von ACh führte (Kommalage and Hoglund, 2005). Auf Grund der hier gezeigten Daten ist eher ein hemmender Einfluss auf die ACh-Ausschüttung wahrscheinlich, so dass durch eine Verringerung des Transmitters der Enzymausfall nach CRS-Vergiftung kompensiert werden kann. Dieser Effekt ist allerdings nur unter hypoxischen Bedingungen zu beobachten, während 8-OH-DPAT bei konstanter Sauerstoffversorgung der Präparation keinen Einfluss auf die Regeneration der Atemparameter nach OP-Vergiftung ausübt.

## 7 Fazit

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis und zur besseren Therapierbarkeit von Organophosphatvergiftungen leisten. Im Rahmen dieses Projektes sind einige wichtige Erkenntnisse sowohl auf Protein- als auch auf physiologischer Ebene erlangt worden. So konnte durch die immunhistochemischen Färbungen das Vorhandensein sowohl muskarinischer, als auch nikotinischer AChR in den Atemzentren der Ratte nachgewiesen werden. Diese Information zusammen mit den physiologischen Experimenten mittels der perfundierten Hirnstammpräparation zeigen Ansatzpunkte für neue Therapiemöglichkeiten anhand spezifischer rezeptoraktiver Substanzen

Die momentane Standardtherapie nach Organophosphatvergiftungen erfolgt mit parallel durchgeführten Maßnahmen. Zum einen werden Oxime zur Enzymreaktivierung gegeben. Sie sind in der Lage über einen nucleophilen Angriff das Organophosphat von der Acetylcholinesterase zu spalten und so ihre Funktion wieder herzustellen. Diese Reaktivierung ist allerdings zum einen zeitlich limitiert, so dass die Oxime in einem frühen Stadium der Vergiftung gegeben werden müssen, zum anderen sind diese Substanzen nicht BHS-gängig, so dass die zentrale AChE nicht reaktiviert werden kann. (Forth 2001). Als weiteres Medikament zur Behandlung von OP-Vergiftungen wird Atropin eingesetzt, ein muskarinischer AChR Antagonist, der die durch AChE-Hemmung überstimulierten Rezeptoren blockiert. Atropin wirkt nicht nur gegen die peripheren muskarinischen Effekte wie erhöhte Drüsensekretion, Gefäßdilatation, Blutdrucksenkung und Spasmen des Magen-Darm-Traktes, sondern erzielt auch im ZNS eine Wirkung, wodurch mögliche Effekte auf die Atemzentren unterbunden werden können. Diazepam wird zur symptomatischen Behandlung der Krämpfe gegeben (Eddleston et al., 2002).

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass durch die Hemmung der AChE zentrale nikotinsche AChR überstimuliert werden, was bei den aktuellen Therapieansätzen nicht berücksichtigt wird. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur verschiedene nAChR Subtypen in den Atemzentren exprimiert werden, sondern nikotinsche Agonisten- und Antagonisten die zentral generierten Atemparameter beeinflussen. Durch Versuche in der perfundierten Hirnstammpräparation sollte daher der Effekt von spezifischen nikotinschen Antagonisten nach Organophosphatvergiftung untersucht werden, um deren Therapiepotential abzuschätzen.

Durch Co-Färbungen wurde im Rattengehirn nachgewiesen, dass der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor sowohl mit muskarinischen als auch nikotinschen AChR co-lokalisiert ist. Die physiologischen Experimente deuten ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen cholinerg und serotonerger Neuromodulation der Atmung hin. Aber auch wenn durch Zugabe des Serotonin-Agonisten 8-OH-DPAT die Apnoephase nach OP-Vergiftung verkürzt werden konnte,

scheint Serotonin nicht der verantwortliche Neurotransmitter für den zu beobachteten Kompensationsmechanismus zu sein.

So stellt das Ergebnis, dass sich die Atemparameter nach CRS-Vergiftung zwar pathologisch verändern, aber nach ca. einer Stunde wieder auf Kontrollniveau zurückkehren, einen äußerst interessanten Aspekt dar. Solange die Sauerstoffversorgung gewährleistet ist, weisen die Atemzentren eine Plastizität auf, die eine Anpassung an erhöhte ACh-Konzentrationen ermöglicht. Solch ein Mechanismus ist auch von AChE-Knock-Out Mäusen bekannt, bei denen es zur Downregulierung der AChR kommt. Es finden sich bei diesen Tieren nur wenige funktionelle Rezeptoren in der Zellmembran, aber vermehrt im Golgi-Komplex und dem Endoplasmatischen Retikulum. Die Auswirkungen auf die Atmung, die das Fehlen der AChE trotz Adaptionsmechanismus ausübt, sind eine verlängerte Inspirationszeit und ein erhöhtes Atemzugvolumen (Boudinot et al., 2009; Chatonnet et al., 2003). Die Tiere sind aber trotzdem lebensfähig und erreichen problemlos das Erwachsenenalter.

Während bei den Knock-Out Tieren das Nicht-Vorhandensein bestimmter Gene von Geburt an besteht, ist das zentrale respiratorische System aber auch in der Lage in späteren Stadien nach abgeschlossener Entwicklung Verluste zu kompensieren. So können sich Ziegen auch nach der fast vollständigen Zerstörung des PräBötzinger Komplexes insoweit erholen, dass sich wieder ein stabiler nur leicht verlangsamter Atemrhythmus mit normalen Blutgaswerten einstellt (Krause et al., 2009).

Auch wenn über den Adaptionsmechanismus nur spekuliert werden kann, bleibt festzuhalten, dass eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff, z. B. mit künstlicher Beatmung, die Effekte der CRS-Vergiftung verringern kann und es zu einer spontanen Reaktivierung der *N. Phrenicus* Aktivität kommt.

Als Fazit dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass gezeigt werden konnte, dass Acetylcholin ein wichtiger Neurotransmitter bei der Atemregulierung ist und sowohl muskarinische als auch nikotinische Acetylcholinrezeptoren für die Signalweiterleitung verantwortlich sind. Durch Co-Lokalisation miteinander und mit serotonergen Rezeptoren ergibt sich eine enorme Vielfalt in der Signalverarbeitung, die mit den physiologischen Methoden nur ansatzweise untersucht werden konnte. Des Weiteren konnte die Wirkung des Organophosphats CRS auf das Atemzentrum untersucht werden mit dem Ergebnis, dass ein Zusammenspiel zentraler und peripherer Effekte zu einer Verstärkung der Symptome führte.

Inwieweit sich diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen, lässt sich nur schwer abschätzen. So gibt es selbst bei Ratten und Mäusen, zwei sehr nah verwandte Spezies, enorme Unterschiede in der Reaktion auf Nikotin oder Muskarin (Shao and Feldman, 2000, 2001, 2002; Zanella et al., 2007). Bei dem direkten Vergleich zwischen Ratte

und Mensch zeigte sich, dass das Organophosphat Soman bei Menschen wesentlich schneller zu einer irreversiblen Hemmung der AChE führt als bei Ratten (Busker et al., 1991; Wolthuis et al., 1981).

Trotz dieser vorhandenen Spezies-Unterschiede, sind die grundlegenden Mechanismen der Atemregulation in Wirbeltieren jedoch identisch und so liefern diese Experimente wichtige Erkenntnisse auch für die Therapie am Menschen.

## 8 Literatur

**Abrams, P.**, Andersson, K.E., Buccafusco, J.J., Chapple, C., de Groat, W.C., Fryer, A.D., Kay, G., Laties, A., Nathanson, N.M., Pasricha, P.J., *et al.* (2006). Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 148, 565-578.

**Adams, G.K., 3rd**, Yamamura, H.I., and O'Leary, J.F. (1976). Recovery of central respiratory function following anticholinesterase intoxication. *Eur J Pharmacol* 38, 101-112.

**Alheid, G.F.**, Gray, P.A., Jiang, M.C., Feldman, J.L., and McCrimmon, D.R. (2002). Parvalbumin in respiratory neurons of the ventrolateral medulla of the adult rat. *J Neurocytol* 31, 693-717.

**Alheid, G.F.**, Milsom, W.K., and McCrimmon, D.R. (2004). Pontine influences on breathing: an overview. *Respir Physiol Neurobiol* 143, 105-114.

**Araujo, D.M.**, Lapchak, P.A., Collier, B., and Quirion, R. (1988). Characterization of N-[3H]methylcarbamylocholine binding sites and effect of N-methylcarbamylocholine on acetylcholine release in rat brain. *J Neurochem* 51, 292-299.

**Artigas, F.**, Romero, L., de Montigny, C., and Blier, P. (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT<sub>1A</sub> antagonists. *Trends Neurosci* 19, 378-383.

**Azam, L.**, Winzer-Serhan, U., and Leslie, F.M. (2003). Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* 119, 965-977.

**Bay, E.**, Adams, N.L., von Bredow, J.K., and Nelson, J.D. (1973). Respiratory phase shift of pattern in the medullary reticular formation after soman in the cat. *Brain Res* 60, 526-532.

**Bellingham, M.C.**, and Funk, G.D. (2000). Cholinergic modulation of respiratory brain-stem neurons and its function in sleep-wake state determination. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 132-137.

**Bellingham, M.C.**, and Ireland, M.F. (2002). Contribution of cholinergic systems to state-dependent modulation of respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* 131, 135-144.

**Bernard, V.**, Levey, A.I., and Bloch, B. (1999). Regulation of the subcellular distribution of m4 muscarinic acetylcholine receptors in striatal neurons in vivo by the cholinergic environment: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous and exogenous stimulation. *J Neurosci* 19, 10237-10249.

**Bernard, V.**, Normand, E., and Bloch, B. (1992). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci* 12, 3591-3600.

- Bohmer, G.**, Schmid, K., Schmidt, P., and Stehle, J. (1987). Cholinergic effects on spike-density and burst-duration of medullary respiration-related neurones in the rabbit: an iontophoretic study. *Neuropharmacology* 26, 1561-1572.
- Bonham, A.C.** (1995). Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol* 101, 219-230.
- Bosmann, H.B.** (1972). Identification, purification and characteristics of glycosidases of human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 258, 265-273.
- Boudinot, E.**, Bernard, V., Camp, S., Taylor, P., Champagnat, J., Krejci, E., and Foutz, A.S. (2009). Influence of differential expression of acetylcholinesterase in brain and muscle on respiration. *Respir Physiol Neurobiol* 165, 40-48.
- Boudinot, E.**, Champagnat, J., and Foutz, A.S. (2008). M(1)/M(3) and M(2)/M(4) muscarinic receptor double-knockout mice present distinct respiratory phenotypes. *Respir Physiol Neurobiol* 161, 54-61.
- Boulter, J.**, Connolly, J., Deneris, E., Goldman, D., Heinemann, S., and Patrick, J. (1987). Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7763-7767.
- Boulter, J.**, Evans, K., Goldman, D., Martin, G., Treco, D., Heinemann, S., and Patrick, J. (1986). Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature* 319, 368-374.
- Buckley, N.J.**, Bonner, T.I., and Brann, M.R. (1988). Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 8, 4646-4652.
- Bureau, F.**, Coghe, J., Uystepuyst, C.H., Desmecht, D., and Lekeux, P. (1999). Maximal ventilation assessment in healthy calves. *Vet J* 157, 309-314.
- Busker, R.W.**, Zijlstra, J.J., van der Wiel, H.J., Melchers, B.P., and van Helden, H.P. (1991). Organophosphate poisoning: a method to test therapeutic effects of oximes other than acetylcholinesterase reactivation in the rat. *Toxicology* 69, 331-344.
- Carsi-Gabrenas, J.M.**, Van der Zee, E.A., Luiten, P.G., and Potter, L.T. (1997). Non-selectivity of the monoclonal antibody M35 for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res Bull* 44, 25-31.
- Chamberlin, N.L.** (2004). Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 143, 115-125.
- Chang, F.C.**, Foster, R.E., Beers, E.T., Rickett, D.L., and Filbert, M.G. (1990). Neurophysiological concomitants of soman-induced respiratory depression in awake, behaving guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 102, 233-250.

**Chatonnet, F.**, Boudinot, E., Chatonnet, A., Taysse, L., Daulon, S., Champagnat, J., and Foutz, A.S. (2003). Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. *Eur J Neurosci* 18, 1419-1427.

**Cinar, O.**, Semiz, O., and Can, A. (2006). A microscopic survey on the efficiency of well-known routine chemical fixatives on cryosections. *Acta Histochem* 108, 487-496.

**cliniPharm**, [www.vetpharm.uzh.ch](http://www.vetpharm.uzh.ch) (2009) Homepage des Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, Zürich.

**Connelly, C.A.**, Ellenberger, H.H., and Feldman, J.L. (1989). Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci Lett* 105, 34-40.

**Damaj, M.I.**, Welch, S.P., and Martin, B.R. (1995). In vivo pharmacological effects of dihydro-beta-erythroidine, a nicotinic antagonist, in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 117, 67-73.

**Damaj, M.I.**, Wiley, J.L., Martin, B.R., and Papke, R.L. (2005). In vivo characterization of a novel inhibitor of CNS nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol* 521, 43-48.

**Dani, J.A.**, and Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 699-729.

**Decossas, M.**, Doudnikoff, E., Bloch, B., and Bernard, V. (2005). Aging and subcellular localization of m2 muscarinic autoreceptor in basalcortical neurons in vivo. *Neurobiol Aging* 26, 1061-1072.

**Dehkordi, O.**, Haxhiu, M.A., Millis, R.M., Dennis, G.C., Kc, P., Jafri, A., Khajavi, M., Trouth, C.O., and Zaidi, S.I. (2004). Expression of alpha-7 nAChRs on spinal cord-brainstem neurons controlling inspiratory drive to the diaphragm. *Respir Physiol Neurobiol* 141, 21-34.

**Dehkordi, O.**, Millis, R.M., Dennis, G.C., Jazini, E., Williams, C., Hussain, D., and Jayam-Trouth, A. (2007). Expression of alpha-7 and alpha-4 nicotinic acetylcholine receptors by GABAergic neurons of rostral ventral medulla and caudal pons. *Brain Res* 1185, 95-102.

**Doi, A.**, and Ramirez, J.M. (2008). Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol* 164, 96-104.

**Dougherty, J.J.**, and Nichols, R.A. (2009). Cross-regulation between colocalized nicotinic acetylcholine and 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptors on presynaptic nerve terminals. *Acta Pharmacol Sin* 30, 788-794.

**Eddleston, M.**, Singh, S., and Buckley, N. (2002). Acute organophosphorus poisoning. *Clin Evid*, 1436-1446.

**Ezure, K.** (1990). Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol* 35, 429-450.

**Ezure, K.**, Tanaka, I., and Kondo, M. (2003). Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J Neurosci* 23, 8941-8948.

**Feldman, J.L.**, and Janczewski, W.A. (2006a). The Last Word: Point:Counterpoint authors respond to commentaries on "the parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal". *J Appl Physiol* 101, 689.

**Feldman, J.L.**, and Janczewski, W.A. (2006b). Point:Counterpoint: The parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. Counterpoint: the preBotC is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. *J Appl Physiol* 100, 2096-2097.

**Feldman, J.L.**, Windhorst, U., Anders, K., and Richter, D.W. (1992). Synaptic interaction between medullary respiratory neurones during apneusis induced by NMDA-receptor blockade in cat. *J Physiol* 450, 303-323.

**Fleming, N.W.**, Henderson, T.R., and Dretchen, K.L. (1991). Mechanisms of respiratory failure produced by neostigmine and diisopropyl fluorophosphate. *Eur J Pharmacol* 195, 85-91.

**Foutz, A.S.**, Boudinot, E., and Denavit-Saubie, M. (1987). Central respiratory depression induced by acetylcholinesterase inhibition: involvement of anaesthesia. *Eur J Pharmacol* 142, 207-213.

**Forth, W.**, Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K. (2001). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Vol 8 (Urbain & Fischer Verlag, Frankfurt am Main).

**Frey, H.-H.** and Löscher, W. (2007). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für Veterinärmediziner. Sonderausgabe der 2. Auflage (Enke Verlag, Stuttgart).

**Fye, W.B.** (1995). Julien Jean Cesar Legallois. *Clin Cardiol* 18, 599-600.

**Gaspari, R.J.**, and Paydarfar, D. (2007). Pathophysiology of respiratory failure following acute dichlorvos poisoning in a rodent model. *Neurotoxicology* 28, 664-671.

**Goldman, D.**, Deneris, E., Luyten, W., Kochhar, A., Patrick, J., and Heinemann, S. (1987). Members of a nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell* 48, 965-973.

**Goldman, D.**, Simmons, D., Swanson, L.W., Patrick, J., and Heinemann, S. (1986). Mapping of brain areas expressing RNA homologous to two different acetylcholine receptor alpha-subunit cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4076-4080.

**Gotti, C.**, Zoli, M., and Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27, 482-491.

- Grilli, M.**, Zappettini, S., Raiteri, L., and Marchi, M. (2009). Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors coexist on GABAergic nerve endings in the mouse striatum and interact in modulating GABA release. *Neuropharmacology* 56, 610-614.
- Haji, A.**, Takeda, R., and Okazaki, M. (2000). Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 86, 277-304.
- Hassall, C.J.**, Stanford, S.C., Burnstock, G., and Buckley, N.J. (1993). Co-expression of four muscarinic receptor genes by the intrinsic neurons of the rat and guinea-pig heart. *Neuroscience* 56, 1041-1048.
- Hatori, E.**, Sakuraba, S., Kashiwagi, M., Kuribayashi, J., Tsujita, M., Hosokawa, Y., Takeda, J., and Kuwana, S. (2006). Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats. *Biol Res* 39, 321-330.
- Hering K.** and Breuer, J. (1868). Die Selbststeuerung der Athmung durch den Nervus vagus. *Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-naturwissenschaftliche Classe*, Vol 57. Band (Wien).
- Hilaire, G.**, and Duron, B. (1999). Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol Rev* 79, 325-360.
- Hodges, M.R.**, and Richerson, G.B. (2008). Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol* 164, 222-232.
- Holtman, J.R.**, Jr., Norman, W.P., Skirboll, L., Dretchen, K.L., Cuello, C., Visser, T.J., Hokfelt, T., and Gillis, R.A. (1984). Evidence for 5-hydroxytryptamine, substance P, and thyrotropin-releasing hormone in neurons innervating the phrenic motor nucleus. *J Neurosci* 4, 1064-1071.
- Houze, P.**, Pronzola, L., Kayouka, M., Villa, A., Debray, M., and Baud, F.J. (2008). Ventilatory effects of low-dose paraoxon result from central muscarinic effects. *Toxicol Appl Pharmacol* 233, 186-192.
- Jiang, C.**, and Lipski, J. (1990). Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Botzinger complex in the cat. *Exp Brain Res* 81, 639-648.
- Johnson, S.M.**, Koshiya, N., and Smith, J.C. (2001). Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Botzinger complex "island". *J Neurophysiol* 85, 1772-1776.
- Johnson, S.M.**, Smith, J.C., Funk, G.D., and Feldman, J.L. (1994). Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72, 2598-2608.
- Jordan, D.**, and Spyer, K.M. (1981). Effects of acetylcholine on respiratory neurones in the nucleus ambiguus-retroambigualis complex of the cat. *J Physiol* 320, 103-111.

- Kawashima, K.**, and Fujii, T. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 106, 167-173.
- Khiroug, S.S.**, Harkness, P.C., Lamb, P.W., Sudweeks, S.N., Khiroug, L., Millar, N.S., and Yakel, J.L. (2002). Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540, 425-434.
- Kommalage, M.**, and Hoglund, A.U. (2005). Involvement of spinal serotonin receptors in the regulation of intraspinal acetylcholine release. *Eur J Pharmacol* 509, 127-134.
- Koshiya, N.**, and Smith, J.C. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400, 360-363.
- Krause, K.L.**, Forster, H.V., Kiner, T., Davis, S.E., Bonis, J.M., Qian, B., and Pan, L.G. (2009). Normal breathing pattern and arterial blood gases in awake and sleeping goats after near total destruction of the presumed pre-Botzinger complex and the surrounding region. *J Appl Physiol* 106, 605-619.
- Lai, J.**, Shao, X.M., Pan, R.W., Dy, E., Huang, C.H., and Feldman, J.L. (2001). RT-PCR reveals muscarinic acetylcholine receptor mRNA in the pre-Botzinger complex. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1420-1424.
- Lalley, P.M.**, Bischoff, A.M., and Richter, D.W. (1994a). 5-HT-1A receptor-mediated modulation of medullary expiratory neurones in the cat. *J Physiol* 476, 117-130.
- Lalley, P.M.**, Bischoff, A.M., and Richter, D.W. (1994b). Serotonin 1A-receptor activation suppresses respiratory apneusis in the cat. *Neurosci Lett* 172, 59-62.
- Le Brun, I.**, Dufour, A., Crest, M., Szabo, G., Erdelyi, F., and Baude, A. (2008). Differential expression of Nk1 and NK3 neurokinin receptors in neurons of the nucleus tractus solitarius and the dorsal vagal motor nucleus of the rat and mouse. *Neuroscience* 152, 56-64.
- Levey, A.I.**, Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L., and Brann, M.R. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11, 3218-3226.
- Levitzky, M.G.** (2002). *Pulmonary Physiology*, 6 edn (Mcgraw-Hill Professional, New York).
- Lindsay, A.D.**, and Feldman, J.L. (1993). Modulation of respiratory activity of neonatal rat phrenic motoneurons by serotonin. *J Physiol* 461, 213-233.
- Long, S.**, and Duffin, J. (1986). The neuronal determinants of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol* 27, 101-182.
- Mallios, V.J.**, Lydic, R., and Baghdoyan, H.A. (1995). Muscarinic receptor subtypes are differentially distributed across brain stem respiratory nuclei. *Am J Physiol* 268, L941-949.

- Manzke, T.** (2004). Expression and function of serotonin receptor isoforms in the respiratory system. PhD Thesis.
- Manzke, T.,** Dutschmann, M., Schlaf, G., Morschel, M., Koch, U.R., Ponimaskin, E., Bidon, O., Lalley, P.M., and Richter, D.W. (2009). Serotonin targets inhibitory synapses to induce modulation of network functions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *364*, 2589-2602.
- Manzke, T.,** Guenther, U., Ponimaskin, E.G., Haller, M., Dutschmann, M., Schwarzacher, S., and Richter, D.W. (2003). 5-HT<sub>4</sub>(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science* *301*, 226-229.
- Morley, B.J.,** Kemp, G.E., and Salvaterra, P. (1979). alpha-Bungarotoxin binding sites in the CNS. *Life Sci* *24*, 859-872.
- Murakoshi, T.,** Suzue, T., and Tamai, S. (1985). A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Br J Pharmacol* *86*, 95-104.
- Nambiar, M.P.,** Gordon, R.K., Rezk, P.E., Katos, A.M., Wajda, N.A., Moran, T.S., Steele, K.E., Doctor, B.P., and Sciuto, A.M. (2007). Medical countermeasure against respiratory toxicity and acute lung injury following inhalation exposure to chemical warfare nerve agent VX. *Toxicol Appl Pharmacol* *219*, 142-150.
- Nathanson, N.M.** (2008). Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Ther* *119*, 33-43.
- Nayak, S.V.,** Ronde, P., Spier, A.D., Lummis, S.C., and Nichols, R.A. (2000). Nicotinic receptors co-localize with 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptors on striatal nerve terminals. *Neuropharmacology* *39*, 2681-2690.
- Noll, S.,** Schaub-Kuhnen, S. (2000). *Praxis der Immunhistochemie*, 1 edn (München, Urban & Fischer).
- Onimaru, H.,** and Homma, I. (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* *23*, 1478-1486.
- Papke, R.L.,** Buhr, J.D., Francis, M.M., Choi, K.I., Thinschmidt, J.S., and Horenstein, N.A. (2005). The effects of subunit composition on the inhibition of nicotinic receptors by the amphipathic blocker 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl heptanoate. *Mol Pharmacol* *67*, 1977-1990.
- Patrick, J.,** Boulter, J., Goldman, D., Gardner, P., and Heinemann, S. (1987). Molecular biology of nicotinic acetylcholine receptors. *Ann N Y Acad Sci* *505*, 194-207.
- Paxinos, G.** and Watson, C. (2007). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, Vol 1, 6 edn (Academic Press, Sydney., ).
- Rada, P.V.,** Mark, G.P., and Hoebel, B.G. (1993). In vivo modulation of acetylcholine in the nucleus accumbens of freely moving rats: I. Inhibition by serotonin. *Brain Res* *619*, 98-104.

- Reavill, C.**, Walther, B., Stolerman, I.P., and Testa, B. (1990). Behavioural and pharmacokinetic studies on nicotine, cytisine and lobeline. *Neuropharmacology* 29, 619-624.
- Richter, D.W.** (1995). Rhythmogenese und Atmungsregulation. In *Physiologie des Menschen*, F.L. Robert F. Schmidt, Gerhard Thews, ed. (Springer Verlag, Heidelberg).
- Richter, D.W.**, Manzke, T., Wilken, B., and Ponimaskin, E. (2003). Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 9, 542-548.
- Rickett, D.L.**, Glenn, J.F., and Beers, E.T. (1986). Central respiratory effects versus neuromuscular actions of nerve agents. *Neurotoxicology* 7, 225-236.
- Rouse, S.T.**, Edmunds, S.M., Yi, H., Gilmore, M.L., and Levey, A.I. (2000). Localization of M(2) muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 284, 182-186.
- Rowell, P.P.**, and Winkler, D.L. (1984). Nicotinic stimulation of [3H]acetylcholine release from mouse cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem* 43, 1593-1598.
- Sahibzada, N.**, Ferreira, M., Wasserman, A.M., Taveira-DaSilva, A.M., and Gillis, R.A. (2000). Reversal of morphine-induced apnea in the anesthetized rat by drugs that activate 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 704-713.
- Servent, D.**, and Fruchart-Gaillard, C. (2009). Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem* 109, 1193-1202.
- Shao, X.M.**, and Feldman, J.L. (2000). Acetylcholine modulates respiratory pattern: effects mediated by M3-like receptors in preBotzinger complex inspiratory neurons. *J Neurophysiol* 83, 1243-1252.
- Shao, X.M.**, and Feldman, J.L. (2001). Mechanisms underlying regulation of respiratory pattern by nicotine in preBotzinger complex. *J Neurophysiol* 85, 2461-2467.
- Shao, X.M.**, and Feldman, J.L. (2002). Pharmacology of nicotinic receptors in preBotzinger complex that mediate modulation of respiratory pattern. *J Neurophysiol* 88, 1851-1858.
- Shao, X.M.**, and Feldman, J.L. (2009). Central cholinergic regulation of respiration: nicotinic receptors. *Acta Pharmacol Sin* 30, 761-770.
- Shao, X.M.**, Tan, W., Xiu, J., Puskar, N., Fonck, C., Lester, H.A., and Feldman, J.L. (2008). Alpha4\* nicotinic receptors in preBotzinger complex mediate cholinergic/nicotinic modulation of respiratory rhythm. *J Neurosci* 28, 519-528.
- Shen, L.**, Li, Y.M., and Duffin, J. (2003). Inhibitory connections among rostral medullary expiratory neurones detected with cross-correlation in the decerebrate rat. *Pflugers Arch* 446, 365-372.

**Sloan, J.W.**, Martin, W.R., Bostwick, M., Hook, R., and Wala, E. (1988). The comparative binding characteristics of nicotinic ligands and their pharmacology. *Pharmacol Biochem Behav* 30, 255-267.

**Smith, J.C.**, Abdala, A.P., Koizumi, H., Rybak, I.A., and Paton, J.F. (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* 98, 3370-3387.

**Smith, J.C.**, Abdala, A.P., Rybak, I.A., and Paton, J.F. (2009). Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2577-2587.

**Smith, J.C.**, Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., and Feldman, J.L. (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-729.

**Steinbusch, H.W.** (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6, 557-618.

**Stillman, M.J.**, Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Levy, A., and Lieberman, H.R. (1996). Effects of M2 antagonists on in vivo hippocampal acetylcholine levels. *Brain Res Bull* 41, 221-226.

**Stoll, C.**, Eltze, M., Lambrecht, G., Zentner, J., Feuerstein, T.J., and Jackisch, R. (2009). Functional characterization of muscarinic autoreceptors in rat and human neocortex. *J Neurochem* 110, 837-847.

**Stoll, C.**, Schwarzwald, U., Johann, S., Lambrecht, G., Hertting, G., Feuerstein, T.J., and Jackisch, R. (2003). Characterization of muscarinic autoreceptors in the rabbit hippocampus and caudate nucleus. *Neurochem Res* 28, 413-417.

**Sudweeks, S.N.**, and Yakel, J.L. (2000). Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol* 527 Pt 3, 515-528.

**van der Zee, E.A.**, and Luiten, P.G. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58, 409-471.

**Vannucchi, M.G.**, and Pepeu, G. (1995). Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from rat cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 190, 53-56.

**Voss, M.D.**, De Castro, D., Lipski, J., Pilowsky, P.M., and Jiang, C. (1990). Serotonin immunoreactive boutons form close appositions with respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat. *J Comp Neurol* 295, 208-218.

**Wada, E.**, Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J., and Swanson, L.W. (1989). Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284, 314-335.

**Wamsley, J.K.**, Lewis, M.S., Young, W.S., 3rd, and Kuhar, M.J. (1981). Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brainstem. *J Neurosci* *1*, 176-191.

**Ward, J.M.**, Cockcroft, V.B., Lunt, G.G., Smillie, F.S., and Wonnacott, S. (1990). Methyllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett* *270*, 45-48.

**Wilken, B.**, Lalley, P., Bischoff, A.M., Christen, H.J., Behnke, J., Hanefeld, F., and Richter, D.W. (1997). Treatment of apneustic respiratory disturbance with a serotonin-receptor agonist. *J Pediatr* *130*, 89-94.

**Wolthuis, O.L.**, Berends, F., and Meeter, E. (1981). Problems in the therapy of Soman poisoning. *Fundam Appl Toxicol* *1*, 183-192.

**Worek, F.**, and Szinicz, L. (1993). Analysis of cardiovascular and respiratory effects of various doses of soman in guinea-pigs: efficacy of atropine treatment. *Arch Int Pharmacodyn Ther* *325*, 96-112.

**Zanella, S.**, Viemari, J.C., and Hilaire, G. (2007). Muscarinic receptors and alpha2-adrenoceptors interact to modulate the respiratory rhythm in mouse neonates. *Respir Physiol Neurobiol* *157*, 215-225.

**Zaninetti, M.**, Tribollet, E., Bertrand, D., and Raggenbass, M. (1999). Presence of functional neuronal nicotinic acetylcholine receptors in brainstem motoneurons of the rat. *Eur J Neurosci* *11*, 2737-2748.

**Zarei, M.M.**, Radcliffe, K.A., Chen, D., Patrick, J.W., and Dani, J.A. (1999). Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* *88*, 755-764.

**Zheng, Y.**, Riche, D., Rekling, J.C., Foutz, A.S., and Denavit-Saubie, M. (1998). Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Res* *782*, 113-125.

**Zouridakis, M.**, Zisimopoulou, P., Poulas, K., and Tzartos, S.J. (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life* *61*, 407-423.

## 9 Kongressbeiträge

Klein, T., Dutschmann, M., Seeger, T., Mörschel, M. (2010): The effects of acetylcholine receptor antagonists and agonists on the central breathing pattern in the in-situ perfused brainstem preparation of rat

**Posterpräsentation**, 89. Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Kopenhagen

Klein, T., Worek, F., Mörschel, M. (2009): Distribution of acetylcholine receptor subtypes in the respiratory related areas of the rat brainstem

**Posterpräsentation**, 12. internationale C-Schutz Tagung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr

Klein, T., Worek, F., Mörschel, M. (2009): Distribution of acetylcholine receptor subtypes in the respiratory related areas of the rat brainstem

**Keynote lecture**, 88<sup>th</sup> meeting of the German Physiological Society

Mörschel, M., Seeger, T., Dutschmann M., Klein, T. (2009): Hypoxia prolonged effects of the central cholinergic modulation of breathing after organophosphorus poisoning in the perfused brainstem preparation of rat

**Oral session**, 88<sup>th</sup> meeting of the German Physiological Society

Klein, T., Dutschmann, M., Seeger, T., Mörschel, M. (2008): Physiology and pathophysiology of the central cholinergic modulation of breathing after organo-phosphorus poisoning in the perfused brainstem preparation of rat

**Posterpräsentation**, *International symposium on respiratory control, Marseilles Saint Maximin*