

Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Magdalena Götz

Lehrstuhl für Physiologische Genomik

**Prä- und postsynaptische Wirkungen hervorgerufen durch
Aktivierung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren
(nAChR) in infra- und supragranulären neocorticalen
Pyramidenzellen der Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva Maria Wagner

aus

Ingolstadt

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Sutor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Schmitz
Priv. Doz. Dr. Oliver Pogarell

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2012

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	2
1.2.1	Struktur und Aufbau der Untereinheiten	2
1.2.2	Funktionelle Subtypen	5
1.2.3	Zustandsformen des nAChR und Funktion	6
1.2.4	Ligandenbindungsstellen am nAChR	7
1.2.5	Desensitisierung und Hochregulation der nAChR	9
1.2.6	Verteilung der nikotinischen Rezeptoren im menschlichen Gehirn	10
1.3	Zelluläre Lokalisationen der nAChR	11
1.3.1	Postsynaptische Lokalisation der nAChR	11
1.3.2	Präsynaptische Lokalisation der nAChR	12
1.3.3	Präterminale oder axonale Lokalisation der nAChR	14
1.4	Das cholinerge System im ZNS und cholinerge Innervation des Neocortex	15
1.4.1	Das basale Vorderhirn	15
1.4.2	Die cholinerge Innervation des Neocortex	16
1.5	Fragestellung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Perfusionslösungen	20
2.1.2	Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen	20
2.1.3	Verwendete Substanzen	21
2.1.4	C57BL/6-Mäuse	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Anfertigung der Gehirnschnitte	23
2.2.2	Versuchsaufbau	24
2.2.3	Elektrophysiologische Messungen	24
2.2.4	Applikation von Acetylcholin	26
2.2.5	Datenanalyse und statistische Auswertung	27

3	Ergebnisse	28
3.1	Neuronenklassifizierung	28
3.1.1	Pyramidenzellen in den Neocortexschichten 2/3 und 5	28
3.1.1.1	Mikroskopische Darstellung der Pyramidenzellen	28
3.1.1.2	Passive Eigenschaften	29
3.1.1.3	Strom-Spannungs-Verhalten	30
3.1.1.4	Amplitude, Dauer und Latenz des initialen Aktionspotenzials	32
3.1.1.5	Entladungsverhalten	32
3.1.2	Vergleich beider Pyramidenzellpopulationen	35
3.1.2.1	Passive Eigenschaften	35
3.1.2.2	Strom-Spannungs-Kurve und Rektifikationsverhalten	36
3.1.2.3	Amplitude, Dauer und Latenz des initialen Aktionspotenzials	37
3.1.2.4	Frequenzverhalten	38
3.2	Wirkung der Aktivierung von nAChR auf Pyramidenzellen	42
3.2.1	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3	42
3.2.1.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung	42
3.2.1.2	ACh-Sensitivität	44
3.2.1.3	Antworttypen	46
3.2.2	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5	47
3.2.2.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung	47
3.2.2.2	ACh-Sensitivität	49
3.2.2.3	Antworttypen	49
3.2.3	Vergleichende Gegenüberstellung der Wirkungen von ACh auf Pyramidenzellen der Schichten 2/3 und 5	51
3.3	Wirkung von ACh nach pharmakologischer synaptischer Isolation der Neurone	54
3.3.1	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3	54
3.3.1.1	Hemmung der glutamatergen und GABAergen Signalübertragung	54
3.3.1.2	Blockade von Aktionspotenzialen durch Tetrodotoxin (TTX)	57
3.3.2	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5	60
3.3.2.1	Hemmung der glutamatergen und GABAergen Signalübertragung und synaptische Isolation durch TTX	60
3.3.3	Vergleich der Neuronenpopulationen in Schicht 2/3 und 5	62
3.4	Charakterisierung der ACh-induzierten Membranströme mittels selektiver nikotinischer Rezeptorantagonisten	64
3.4.1	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3	64
3.4.2	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5	67
3.4.2.1	Pharmakologische Charakterisierung	67
3.4.2.2	Kinetik der Stromkomponenten	69
3.5	Umkehrpotenzial der nikotinischen postsynaptischen Membranströme	72
3.5.1	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3	72
3.5.2	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5	74

3.6	Desensitisierungsverhalten der nAChR	76
3.6.1	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3	76
3.6.2	Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5	78
4	Diskussion	81
4.1	Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften von neocorticalen Pyramidenzellen in Schicht 2/3 und 5	81
4.2	Mögliche Mechanismen der nAChR-vermittelten Wirkung auf corticale Pyramidenzellen	83
4.2.1	Mechanismus in Cortexschicht 2/3	83
4.2.2	Mechanismus in Cortexschicht 5	87
4.3	Verteilung der funktionellen nAChR-Subtypen in beiden Cortexschichten	88
4.3.1	Verteilung in Cortexschicht 2/3	88
4.3.2	Verteilung in Cortexschicht 5	90
4.4	Desensitisierung der nAChR	92
4.5	Physiologische und klinische Relevanz von post- und präsynaptischen nAChR	93
4.5.1	Mögliche Relevanz von präsynaptischen nAChR auf GABAergen Interneuronen der Cortexschicht 2/3	93
4.5.2	Mögliche Relevanz von postsynaptischen nAChR auf Pyramidenzellen der Cortexschicht 5	95
5	Zusammenfassung	97
6	Literaturverzeichnis	100
7	Abbildungsverzeichnis	115
8	Abkürzungsverzeichnis	119

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Eine Reihe von Erkrankungen des menschlichen zentralen Nervensystems (ZNS) stehen in engem Zusammenhang mit dem nikotinischen cholinergen System des Gehirns. Sowohl altersgebundene als auch nicht altersgebundene Erkrankungen, neurodegenerative sowie nicht neurodegenerative Leiden beruhen zumindest zum Teil auf Störungen des cholinergen Systems.

So ist die nach Alois Alzheimer benannte neurodegenerative Funktionsstörung, der Morbus Alzheimer, zum einen durch Ansammlungen von Amyloid-Plaques im Cortex und zum anderen durch einen Verlust von cholinergen Neuronen im Nucleus basalis Meynert des basalen Vorderhirns gekennzeichnet (Lindstrom 1997, Newhouse et al. 2004a). Die momentan gängige pharmakologische Behandlung der Alzheimer-Erkrankung zielt darauf ab, die Acetylcholin (ACh) - Konzentration im synaptischen Spalt zu erhöhen. Dadurch erreicht man zumindest im Anfangsstadium der Erkrankung eine Linderung der Symptome, wie z.B. Verlust der Lernfähigkeit und der Gedächtnisbildung sowie Aufmerksamkeitsdefizite.

Eine andere, altersabhängige degenerative Gehirnerkrankung ist der Morbus Parkinson. Dabei handelt es sich um eine hypokinetische Bewegungsstörung mit den Hauptsymptomen Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität. Viele Patienten entwickeln zusätzlich im Verlauf der Erkrankung eine Demenz. Während die motorischen Symptome auf einem Untergang von Dopamin-produzierenden Neuronen in der Substantia nigra pars compacta beruhen, wird die Demenz mit Veränderungen in cholinergen Systemen des ZNS in Verbindung gebracht. Ähnlich wie bei der Alzheimer-Krankheit kommt es hier zu einem Verlust von cholinergen Neuronen in den Kernen des basalen Vorderhirns (Newhouse et al. 2004a).

Die autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE) ist eine Anfallserkrankung mit charakteristischer Symptomenkonstellation. In manchen Familien ist diese erbliche Form der Epilepsie mit Mutationen der α_4 - und/oder β_2 - Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) assoziiert. Allerdings ist noch unklar, wie diese Mutationen mit dem Epilepsie-Syndrom zusammenhängen (Lindstrom 1997, Dani 2000, Sutor und Zolles 2001, Raggenbass und Bertrand 2002).

Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass nAChR bei der Pathogenese von ZNS-Erkrankungen wie Schizophrenie, Depressionen, Angststörungen, Tourette-Syndrom und dem Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom eine Rolle spielen (Gotti und Clementi 2004, Newhouse et al. 2004a, Levin et al. 2006).

Diese Aufzählung unterstreicht die Bedeutung des cholinergen Systems für die störungsfreie Funktion des ZNS. Außerdem ist zu erkennen, dass bei Schädigung der cholinergen Systeme vor allem höhere Hirnfunktionen betroffen sind. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die cholinerge Innervation des Hippocampus, der Corpora amygdalae und des frontalen Cortex maßgeblich für Gedächtnisfunktionen (Levin 2002) sind. Lernen, Gedächtnis und Aufmerksamkeit werden durch Aktivierung cholinergischer Afferenzen aus dem basalen Vorderhirn gefördert. Ebenso sind Acetylcholinrezeptoren an der Regulation des Schlafes und der Schmerzwahrnehmung beteiligt (Picciotto et al. 2000, Sarter et al. 2003, Gotti und Clementi 2004, Newhouse et al. 2004b, Levin et al. 2006). In den aufgezählten Hirnarealen findet man sowohl muskarinische als auch nikotinische AChR, wobei vor allem in letzter Zeit die herausragende Rolle der nAChR immer deutlicher wurde.

1.2 Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Seit den Untersuchungen von Claude Bernard über das Pfeilgift Curare, das ein zentralamerikanischer Indianerstamm zur Jagd verwendete, steht der nikotinische Acetylcholinrezeptor im Mittelpunkt des Interesses von Muskel- und Neurophysiologen (zur Übersicht siehe: Karlin 2002). Der muskuläre nAChR war der erste Neurotransmitterrezeptor, der elektrophysiologisch untersucht und molekularbiologisch charakterisiert worden ist (Karlin 2002).

1.2.1 Struktur und Aufbau der Untereinheiten

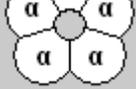
Der nikotinische Acetylcholinrezeptor gehört zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Diese enthält außerdem Serotonin (5-HT₃)-Rezeptoren, γ -Aminobuttersäure Typ A- (GABA_A-) und GABA_C-Rezeptoren, Glycin-Rezeptoren, Adenosinrezeptoren und Glutamatrezeptoren (Luetje et al. 1990, Lena und Changeux 1993, Sargent 1993, Dani und Mayer 1995, McGehee und Role 1995, Dani und Heinemann 1996, Role und Berg 1996, Albuquerque et al. 1997, Lindstrom

1997, Wonnacott 1997, Jones et al. 1999, Dani 2000, Dani 2001). Es gibt zwei funktionelle Klassen der nAChR: den **muskulären** Typ bestehend aus den Untereinheiten α_1 , β_1 , δ , ϵ , γ , und den **neuronalen** Typ, der sich aus den Untereinheiten α_2 - α_{10} und β_2 - β_4 zusammensetzt. Die neuronalen nAChRs sind Pentamere, d.h. sie werden aus fünf Untereinheiten gebildet, die sich um einen zentralen Ionenkanal anordnen (Cooper et al. 1991, Paterson und Nordberg 2000).

Jede Untereinheit des nAChR besteht aus einem großen extrazellulären, hydrophilen Amino-(N)-Terminal und einem hydrophoben Abschnitt, der die drei Transmembrandomänen M1 - M3 enthält. An M3 schließt sich eine intrazelluläre Schleife an, der dann die vierte Transmembrandomäne M4 folgt. Das Carboxy-(C)-Terminal liegt somit extrazellulär. Es wird angenommen, dass das N-Terminal in den synaptischen Spalt ragt und eine Rolle bei der Ligandenbindung spielt. Außerdem findet man im N-Terminal einige Phosphorylierungsstellen. Die intrazelluläre Schleife weist Glykosylierungsstellen auf. Der Ionenkanal wird von den Transmembrandomänen M1 - M4 gebildet, wobei M2 und/oder M4 von besonderer Bedeutung sind (Dani und Mayer 1995, Galzi und Changeux 1995, Karlin 2002).

Zur Zeit kennt man in Wirbeltieren 12 Typen an neuronalen nAChR-Untereinheiten: α_2 - α_{10} und β_2 - β_4 (Tab. 1). Bei heterologer Expression können die Subtypen α_7 , α_8 und α_9 ein funktionelles Homopentamer formen. Die Untereinheiten α_2 bis α_6 sowie α_{10} bilden nur funktionelle Komplexe, wenn sie mit β -Untereinheiten oder anderen α -Untereinheiten ko-exprimiert werden (Cordero-Erausquin et al. 2000, Karlin 2002). Im Gegensatz zu den muskulären Rezeptoruntereinheiten ordnen sich die neuronalen nAChR-Untereinheiten in einer $2\alpha_3\beta$ Stöchiometrie an, mit der Möglichkeit mehr als einen Typ einer α -Untereinheit in das Pentamer einzubringen (Conroy et al. 1992). Das Homopentamer, das im Cortex am häufigsten zu finden ist, enthält ausschließlich α_7 -Untereinheiten, ist α -Bungarotoxin (α -BgT)-sensitiv, hat eine hohe Calciumpermeabilität und desensitisiert sehr schnell. Die zweite im Neocortex häufig vorkommende Untereinheitenzusammenstellung ist das Heteropentamer bestehend aus $\alpha_4\beta_2$. Dieses hat eine geringere Calciumleitfähigkeit und desensitisiert langsamer als das α_7 -Homopentamer (Cordero-Erausquin et al. 2000).

Tabelle 1: Die neuronalen nAChR Untereinheiten (nach Cordero-Erausquin et al. 2000)

Stamm	Subfamilie	Zusammensetzung	Physiologie	Hauptlokalisation
α_9	I	Homopentamer 	α -BgT sensitiv $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+} \sim 10 : 1$	α_9 Cochlea, Bulbus olfactorius
α_7 α_8	II		α_7, α_8 : sehr schnelle Desensitisierung	α_7 limbisches System, Cortex α_8 wurde bisher nur im Kücken gefunden
α_5 β_3	III-3	Heteropentamer  α von III-1 β von III-2 β' von III-2 o. III-3	α -BgT insensitiv $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+} \sim 1-3 : 1$	α_5 Cortex , monoaminerge Nuclei
α_4 α_2 α_6 α_3	III-1	 α von III-1 β von III-2 β' von III-2 o. III-3	nAChR mit β_2 : Cytisin<Nicotin, DMPP; langsame Desensitisierung	$\alpha_3\beta_4$ PNS, habenulo-interpedunculares System $\alpha_4\beta_2$ Thalamus, Cortex
β_4 β_2	III-2		nAChR mit β_4 : Cytisin>Nicotin, DMPP; langsame Desensitisierung	$\alpha_6\beta_3$ monoaminerge Nuclei α_2 interpeduncularer Nucleus

α -BgT = α -Bungarotoxin; **DMPP** = Dimethylphenylpiperazinium; **$P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+}$** = relative Permeabilität von Ca^{2+} zu Na^+

Um herauszufinden, welche Untereinheiten-Kombinationen funktionelle nAChR ergeben, wurden Untersuchungen an heterologen Expressionssystemen durchgeführt (McGehee und Role 1995). Man fand folgende Anordnungen: **(1)** homopentamere Rezeptoren bestehend aus fünf α_7 -Untereinheiten, **(2)** heterodimere nAChRs, die aus einer Kombination von zwei α -Untereinheiten (α_2, α_3 oder α_4) und drei β -Untereinheiten (entweder β_2 oder β_4) bestehen und **(3)** komplexe Rezeptoren, die mehr als einen Typ α - oder β -Untereinheit beinhalten (z.B. $\alpha_4\alpha_5\beta_2$). In der dritten Gruppe sind auch Untereinheiten wie α_5 und β_3 exprimiert, die allein oder in Kombination mit nur einer weiteren anderen Untereinheit keinen funktionellen Kanal formen (Conroy et al. 1992, Conroy und Berg 1995, Ramirez-Latorre et al. 1996). Sechs Typen an α - (α_2 - α_7) und drei Typen an β - (β_2 - β_4) Untereinheiten wurden bisher im menschlichen Gehirn identifiziert (Sargent 1993, Galzi und Changeux 1995, McGehee und Role 1995, Gotti et al. 1997). Somit ist im ZNS, zumindest theoretisch,

eine enorm große Zahl an unterschiedlichen nAChR möglich. Nach unserem jetzigen Kenntnisstand werden aber offenbar nur einige wenige Kombinationen bevorzugt. Allerdings kann man davon ausgehen, dass auch nicht bevorzugte Kombinationen exprimiert werden und eine, bisher noch nicht bekannte funktionelle Bedeutung haben. Häufig findet man in einem Neuron mindestens zwei verschiedene Subtypen an funktionellen nAChR (Zolles et al. 2009) und benachbarte Neurone im selben Cortexgebiet können nAChR exprimieren, die völlig unterschiedlich voneinander sind (Dani et al. 2000).

1.2.2 Funktionelle Subtypen

Tabelle 2: Vier funktionelle Subtypen der nAChR (nach Alkondon und Albuquerque 1993)

Rezeptor-Typ	relative Häufigkeit	Kinetik	selektive Antagonisten	relative Affinität zu ACh	wahrscheinliche Untereinheiten-zusammensetzung
IA	83%	schnell	MLA, α -BgT, κ -BgT	niedrig	α_7
IB	10%	schnell und langsam	MLA, DH β E	niedrig und hoch	α_7 , $\alpha_4\beta_2$
II	5%	langsam	DH β E	hoch	$\alpha_4\beta_2$
III	2%	langsam	Mecamylamin	nicht bestimmt	$\alpha_3\beta_4$

Alkondon und Albuquerque veröffentlichten 1993 eine Klassifizierung von funktionellen nAChR-Subtypen im ZNS. Sie untersuchten mit Hilfe der Whole-cell Patch-Clamp-Technik die Acetylcholin-induzierten Membranströme in Hippocampus-Neuronen der Ratte und teilten sie in vier Stromtypen ein (Tab. 2):

(1) Typ IA-Ströme wurden mit 85% am häufigsten beobachtet, wiesen eine sehr schnelle Kinetik auf und konnten durch α -BgT, κ -BgT (α - und κ -Bungarotoxin) sowie Methyllycaconitin (MLA) geblockt werden. Dieser Strom wurde durch die Aktivierung von homopentameren α_7 -nAChRs hervorgerufen, da nur diese gegenüber α -BgT sensitiv sind (Couturier et al. 1990).

(2) Typ II-Ströme (5%) wurden durch Dihydro- β -Erythroidin (DH β E) geblockt, aber nicht durch α -BgT.

(3) Typ III-Ströme (2%) zeigten eine langsame Kinetik und wurden durch Mecamylamin, aber nicht durch α -BgT, κ -BgT und MLA antagonisiert.

(4) 10% der Neurone zeigten Membranströme, die durch MLA oder DH β E allein nur teilweise, in Kombination beider Antagonisten aber komplett gehemmt wurden. Diesen Subtyp benannten die Autoren als **Typ IB-Strom**.

1.2.3 Zustandsformen des nAChR und Funktion

Nikotinische AChR können in mindestens vier funktionell unterschiedlichen Konformationen existieren. Dies wurde bisher v.a. beim muskulären Typ beobachtet: Der Ruhezustand **R**, in dem der Kanal geschlossen ist, der aktivierte Zustand **A**, während dessen der Kanal für eine Mikrosekunde bis zu einer Millisekunde geöffnet ist, aber nur eine niedrige Affinität für ACh hat, und zwei geschlossene Zustände **I** und **D**, wobei der Kanal für eine Millisekunde bis zu einer Minute desensitisiert ist und eine hohe Affinität für ACh aufweist. In Abwesenheit von Agonisten ist der Ruhezustand stabil (Paterson und Nordberg 2000, Karlin 2002). Die Bindung der Liganden an die ACh-Bindungsstelle oder an eine andere allosterische Stelle kann das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Zuständen verändern. Zusätzlich können die Liganden unterschiedlich stark den Zustand stabilisieren, an den sie bevorzugt binden (Lena und Changeux 1993).

Während des offenen Zustands kommt es zu einem Kationen-Einwärtsstrom durch den nAChR, der eine lokale Depolarisation der Membran bewirkt. Obwohl Na⁺ und K⁺ den Hauptteil des Stroms tragen, kann Ca²⁺ auch einen signifikanten Beitrag leisten (Decker und Dani 1990, Vernino et al. 1992, 1994, Seguela et al. 1993, Castro und Albuquerque 1995, Dani und Mayer 1995). Der Calciumeinstrom durch den nAChR unterscheidet sich vom Calciumstrom durch spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle oder durch den NMDA-Subtyp der Glutamat-Rezeptoren. Calcium-Kanäle und NMDA-Rezeptorkanäle sind spannungsabhängig und benötigen zu ihrer Aktivierung eine Depolarisation, erst dann können Calciumionen in die Zelle einströmen. Nikotinische AChR sind im physiologischen Bereich des Membranpotenzials (-100 mV bis -20 mV) spannungsunabhängig. In Anwesenheit von Agonisten ermöglichen sie also einen Calciumeinstrom auch bei stark negativen Membranpotenzialen (Dani 2001). Die homopentameren α_7 -nAChR weisen die höchste Ca²⁺-Durchlässigkeit auf (Couturier et al. 1990, Schoepfer et al. 1990) und gleichen oder übertreffen darin die NMDA-Rezeptoren (Bertrand et al. 1993, Seguela et al. 1993). Die Frage, welche

Funktionen der nAChR-vermittelte Calciumstrom hat, ist bisher nicht beantwortet worden.

1.2.4 Ligandenbindungsstellen am nAChR

Tabelle 3: Liganden an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nach Paterson und Nordberg, 2000)

Agonisten	Antagonisten	Allosterische Aktivatoren	Allosterische Inhibitoren	Kanalblocker
ACh	DH β E	Physostigmin	Ethanol	Mecamylamin
Nikotin	MLA	Galanthamin	Phencyclidin	Chlorisodamin
Epibatidin	d-Tubocurarin	Tacrin	MK801	Hexamethonium
ABT-418	α BTX	Benzoquinomium	Chlorpromazin	
Cytisin	nBTX	Codein	Progesteron	
GTS-21	Strychnin	5-HT	Corticosteron	
(+)-Anatoxin	A-Conotoxin IMI		Dexamethason	
Anabasein	A-Conotoxin MII		Nimodipin	
RJR-2403			Nifedipin	
SIB-1765F				

ACh Bindungsstellen

In heteropentameren nAChR liegen die Bindungsstellen jeweils an der Grenzfläche zwischen einer α - und einer β -Untereinheit. Daraus ergeben sich zwei Bindungsstellen (Alkondon und Albuquerque 1993). In homopentameren α_7 -, α_8 - oder α_9 -Rezeptoren gibt es fünf gleichartige ACh-Bindungsstellen, die durch die α -Untereinheiten geformt werden (Wang et al. 1996). An die ACh-Bindungsstelle binden sowohl Agonisten als auch kompetitive Antagonisten.

Allosterische Bindungsstellen

Die Funktion des nAChR wird durch eine Vielzahl von Verbindungen wie Physostigmin, Steroide, Ethanol und Ca²⁺-Kanalblocker moduliert. Diese binden nicht an die ACh-Bindungsstelle, sondern an strukturell unterschiedliche allosterische Bindungsstellen, die wiederum nicht sensitiv für ACh sind (Paterson und Nordberg 2000).

Die *nicht-kompetitive positiv allosterische Aktivierungsstelle* befindet sich auf der α -Untereinheit. Liganden, die daran binden, werden Kanalöffner genannt, weil sie die Öffnungszeit und die Leitfähigkeit des Kanals erhöhen (Pereira et al. 1993). Zu diesen Liganden gehören Physostigmin, Tacrin, Galanthamin und das Muskelrelaxans Benzoquinonium (Svensson und Nordberg 1996). Auch für Serotonin gibt es Hinweise darauf, dass dieses auf nAChR einwirken kann und die Leitfähigkeit sowie die Frequenz der Kanalöffnung erhöht (Schrattenholz et al. 1996). Die primäre Funktion von Liganden, die an diese nicht-kompetitive allosterische Aktivierungsstelle binden, ist die Erhöhung der ACh-induzierten Leitfähigkeit und/oder Öffnungswahrscheinlichkeit des nAChR (Paterson und Nordberg 2000).

Die *nicht-kompetitive negativ allosterische Bindungsstelle* inhibiert die Kanalöffnung. Viele Verbindungen wie Chlorpromazin, Phencyclidin, MK801, Lokalanästhetika, Ethanol und Barbiturate können diese Bindungsstelle aktivieren und die Kanalöffnung hemmen, ohne einen direkten Effekt auf die ACh-Bindungsstelle zu haben (Lena und Changeux 1993). Man kennt zwei Bindungsstellen: Die hochaffine Bindungsstelle liegt innerhalb des Ionenkanals, die niedrigaffine Bindungsstelle an der Grenzfläche zwischen Lipidmembran und Rezeptorprotein. Die Aktivierung der nicht-kompetitiven negativ allosterischen Bindungsstelle forciert die Desensibilisierung des Ionenkanals (Paterson und Nordberg 2000).

Die *Steroid-Bindungsstelle* ist auf dem extrazellulären Abschnitt lokalisiert. Steroide können dort binden und den nAChR desensibilisieren (Bertrand et al. 1991).

Die *Dihydropyridin-Bindungsstelle* wird durch die L-Typ Calcium-Kanalblocker Nimodipin und Nifedipin besetzt, wodurch der nAChR aktiviert wird (Paterson und Nordberg 2000). Auch Calcium selbst moduliert den nikotinischen Ionenkanal. Es gibt viele Bindungsstellen für Calciumionen am Rezeptor und bei Aktivierung hemmen sie spannungsabhängig seine Leitfähigkeit (Fairclough et al. 1993). Eine andere Calcium-Bindungsstelle, die es so nur auf der neuronalen Form des nAChR gibt, potenziert bei Aktivierung den ACh-induzierten Ionenstrom in spannungsabhängiger Weise (Mulle et al. 1992).

Eine weitere Modulation der nAChR-Aktivität wird durch die Aktivierung von Phosphorylierungsenzymen erreicht. Dadurch kommt es zu einer Desensibilisierung des Rezeptors (Huganir und Greengard 1990).

1.2.5 Desensibilisierung und Hochregulation der nAChR

Desensibilisierung wird bei vielen Liganden-gesteuerten Kanälen beobachtet und bedeutet eine Abnahme oder den Verlust der biologischen Antwort trotz anhaltender Präsenz des Agonisten (Quick und Lester 2002).

An einer cholinergen Synapse (z.B. neuromuskulären Endplatte) wird ca. 1 mmol/l ACh in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, das relativ schnell den nAChR aktiviert. In wenigen Millisekunden wird das Acetylcholin von der Acetylcholinesterase hydrolysiert oder diffundiert aus dem synaptischen Spalt. Dieser Vorgang läuft so schnell ab, dass hier die Desensibilisierung keine Rolle spielt. Setzt man aber die Synapse wiederholt einer ACh-Konzentration von 1 mmol/l aus, so kommt es zu einer leichten Desensibilisierung. Ist die Frequenz der synaptischen Stimulation sehr hoch, kommt es trotz nur kurz dauernder Desensibilisierung nicht zu einer kompletten Erholung des Rezeptors (Dilger und Liu 1992, Franke et al. 1992, Fenster et al. 1999b). Überdies entsteht beim ACh-Abbau Cholin, welches dann lokal in sehr hohen Konzentrationen vorliegt und als Agonist am α_7 -Subtyp des nAChR zu dessen Desensibilisierung führen kann (Papke et al. 1996, Alkondon et al. 1997b).

Bei langfristiger und chronischer Agonistenexposition (z.B. Nikotin) wird die Anzahl der nikotinischen Rezeptoren im Gehirn erhöht. Dies steht im Gegensatz zu dem allgemein akzeptierten Grundsatz, dass übermäßige und chronische Präsenz eines Agonisten eine Herunterregulation des Rezeptors und die übermäßige und chronische Präsenz eines Antagonisten eine Hochregulation des Rezeptors bewirkt. Post mortem Bindungsstudien zeigten eine erhöhte Anzahl von Bindungsstellen für [3 H]Nikotin und [3 H]Acetylcholin in den Gehirnen von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Benwell et al. 1988, Breese et al. 1997). Die funktionelle Bedeutung, die wahrscheinlich hinter der nAChR-Hochregulation steht, scheint der Ausgleich der schnellen Desensibilisierung und der auf chronische Agonistenexposition folgenden Inaktivierung des Rezeptors zu sein (Schwartz und Kellar 1985). Der Grad der Desensibilisierung und Inaktivierung hängt von der Dauer der Agonistenexposition und den Eigenschaften des Agonisten ab (Rowell und Duggan 1998, Reitstetter et al. 1999). Die unterschiedlichen nAChR-Untereinheiten variieren in ihrer Sensitivität gegenüber Desensibilisierung und Inaktivierung. Die Untereinheiten $\alpha_4\beta_2$ und α_7 sind sensitiver als die $\alpha_3\beta_2$ -Subtypen (Olale et al. 1997).

1.2.6 Verteilung der nikotinischen Rezeptoren im menschlichen Gehirn

Tabelle 4: Verteilung der mRNA nikotinischer Untereinheiten im menschlichen Gehirn (nach Rubboli et al. 1994a, Wevers et al. 1994, Court und Clementi 1995, Schröder et al. 1995, Breese et al. 1997, Hellström-Lindahl et al. 1998,1999)

	β_2	α_3	α_4	α_7
Cortex				
präfrontal	+	++	+	++
motorisch	+	++	+	+++
entorhinal	+	++	+	+
cingulär	+	+	+	
temporal	+	+	+(+)	
Thalamus				
dorsomedial	+	+++		++
ventro-postero-lateral	+	+++		
Hippocampus	+(+)	+		++
Gyrus dentatus	+(+)	+		++
Nc. caudatus	+(+)			++
Putamen				
Cerebellum	+	+	+(+)	

Im Gegensatz zu muskarinischen Rezeptoren sind neuronale nAChRs im menschlichen Gehirn nur in geringer Dichte exprimiert. Zusätzlich ist ihr Verteilungsmuster sehr homogen und beschränkt sich nicht nur auf definierte cholinergen Bahnen. In Studien zur Verteilung der mRNA der Untereinheiten wurde Folgendes festgestellt (Tab. 4):

(1) α_3 -mRNA ist am häufigsten im Thalamus (z.B. dorsomedial und ventro-posterolateral) und in kleineren Mengen in den meisten corticalen Regionen (z.B. frontaler, motorischer, entorhinaler und cingulärer Cortex) und im Hippocampus zu finden (Rubboli et al. 1994b, Court und Clementi 1995). Im Cortex findet man sie am häufigsten in Pyramidenzellen der Schicht 3, 5 und 6, mit mäßiger Häufigkeit in Neuronen der Schicht 2 und am wenigsten in Zellen der Schicht 4 (Wevers et al. 1994, Schröder et al. 1995).

(2) α_4 -mRNA wurde am häufigsten im Temporallappen und im Kleinhirn nachgewiesen. Die Verteilung im Cortex ist weitläufiger als die von α_3 -mRNA, aber beide sind mit Pyramidenzellen assoziiert (Court und Clementi 1995). Im frontalen Cortex findet man α_4 -mRNA in hoher Konzentration in allen Schichten außer in den Schichten 1 und 4 (Schröder et al. 1995).

(3) β_2 -mRNA zeigt ein starkes Signal in der Inselrinde, in der granulären Schicht des Gyrus dentatus und in der CA2/3 Region des Hippocampus (Rubboli et al. 1994b). Eine hohe β_2 -mRNA-Dichte wurde auch im Cortex und Cerebellum aufgezeichnet (Hellström-Lindahl et al. 1998).

(4) α_7 -mRNA wurde v.a. im Thalamus, im Nucleus basalis Meynert, im Hippocampus, im Gyrus dentatus und im Nucleus caudatus gefunden. Im frontalen Cortex ist es in den Schichten 2 und 3 in hoher Konzentration anzutreffen (Schröder et al. 1995).

1.3 Zelluläre Lokalisationen der nAChR

Die vorrangige und hauptsächliche Aufgabe von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren im ZNS wird darin gesehen, die Transmitterfreisetzung an Synapsen (dopaminerg, serotonerg, GABAerg, adrenerg, cholinerg und glutamaterg) präsynaptisch zu beeinflussen (McGehee et al. 1995; Role and Berg 1996). In mehreren Arbeiten wurde aber bereits nachgewiesen, dass im ZNS auch postsynaptische nAChR auf Interneuronen und Pyramidenzellen eine Rolle spielen (Zolles et al. 2009).

1.3.1 Postsynaptische Lokalisation der nAChR

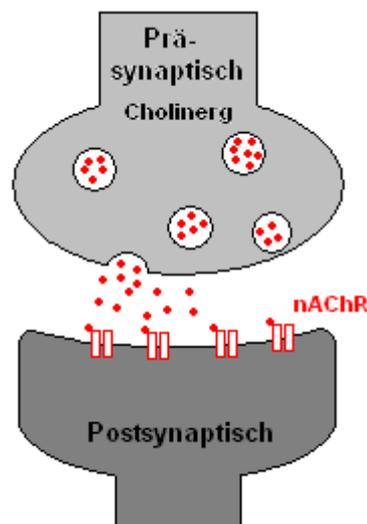


Abbildung 1: Postsynaptische Lokalisation der nAChR.

Auf der postsynaptischen Seite des synaptischen Spaltes sind nikotinische Acetylcholinrezeptoren vorhanden, welche durch das Acetylcholin (rote Punkte), aus den präsynaptischen Vesikeln ausgeschüttet, aktiviert werden.

Abbildung 1 zeigt schematisch eine cholinerge Synapse mit postsynaptischen nAChR. Postsynaptische nAChR sind im Nervensystem weit verbreitet. Man findet sie an den Zellen der autonomen Ganglien, an Renshaw-Zellen im Vorderhorn des Rückenmarks und auch an Haarzellen der Cochlea sind sie bereits beschrieben worden (Role und Berg 1996).

Im Neocortex von Säugetieren wurden funktionelle nAChR vor allem auf inhibitorischen Interneuronen gefunden (McCormick und Prince 1986, Nicoll et al. 1996, Roerig et al. 1997, Xiang et al. 1998, Porter et al. 1999, Alkondon et al. 2000, Chu et al. 2000, Christophe et al. 2002, Couey et al. 2007). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Transmitterfreisetzung aus den inhibitorischen Interneuronen und folglich zu einer Hemmung der nachgeschalteten Neurone, v.a. Pyramidenzellen. Der Nachweis für funktionelle nAChR auf corticalen Pyramidenzellen konnte lange Zeit nicht erbracht werden. Vielmehr haben mehrere Arbeitsgruppen explizit behauptet, keine postsynaptischen nAChRs an Pyramidenzellen nachweisen zu können (McCormick und Prince 1986, Vidal und Changeaux 1993, Nicoll et al. 1996, Gil et al. 1997, Aramakis und Metherate 1998, Xiang et al. 1998, Porter et al. 1999, Couey et al. 2007). Die ersten Hinweise für postsynaptische nAChR auf corticalen Pyramidenzellen stammten aus dem Neocortex des Frettchens. Hier wurden sowohl in Interneuronen als auch in Pyramidenzellen exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) entdeckt, die durch die Aktivierung von nAChR entstanden (Roerig et al. 1997). Auch im Neocortex von Ratten konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Chu et al. 2000). Den endgültigen elektrophysiologischen und pharmakologischen Nachweis für funktionelle nAChR auf Pyramidenzellen der Schicht 5 des Neocortex erbrachten Zolles et al. (2009).

1.3.2 Präsynaptische Lokalisation der nAChR

Präsynaptische Rezeptoren (Abb. 2) werden definiert als Rezeptoren, die am oder nahe des Axonterminals liegen und die Transmitterfreisetzung positiv oder negativ beeinflussen. Solche Rezeptoren beeinflussen also die Wahrscheinlichkeit mit der ein Aktionspotenzial zur Exozytose des Neurotransmitters führt (Wonnacott 1997, Jones et al. 1999).

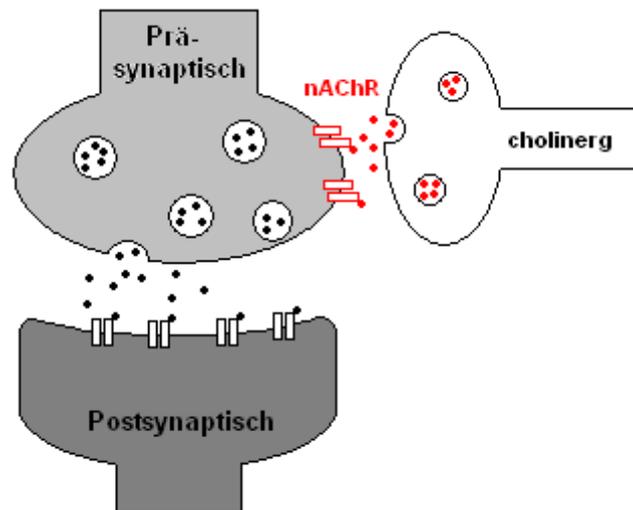


Abbildung 2: Präsynaptische Lokalisation der nAChR.

Die nAChRs sind so positioniert, dass sie die Freisetzung eines anderen Neurotransmitters beeinflussen können. Dieser wird aus dem präsynaptischen Terminal freigesetzt und kann auf der postsynaptischen Seite die Rezeptoren besetzen.

Präsynaptische nAChR können eine Ca^{2+} -abhängige Transmitterfreisetzung bewirken (McGehee et al. 1995; Soliakov et al. 1995). Dafür sind zwei Mechanismen denkbar: **(1)** Ein Na^+ -Einstrom durch aktivierte nAChRs führt zu einer Depolarisation, die ausreicht um spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle zu aktivieren und **(2)** nAChRs sind selbst in solchem Maße Calcium-permeabel, so dass dies unabhängig von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen ausreicht, um eine Exozytose hervorzurufen (Mulle et al. 1992). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Wirkung dem α_7 -Typ des nAChR zugeschrieben werden kann (McGehee et al. 1995, Gil et al. 1997, Girod et al. 2000). Diese beiden genannten Mechanismen sind TTX-insensitiv, da spannungsabhängige Na^+ -Kanäle nicht beteiligt sind. Die präsynaptische nikotinerge Regulation der Transmitterfreisetzung konnte in Axonterminalen von GABAergen Interneuronen (Yang et al. 1996, Radcliff et al. 1999), an glutamatergen Interneuronen (McGehee und Role 1995, Alkondon et al. 1997a, Radcliff und Dani 1998), an noradrenergen Interneuronen (Clarke und Reuben 1996), an dopaminergen Interneuronen (Rapier et al. 1990, Wonnacott et al. 1990, Grady et al. 1992) und an cholinergen Interneuronen (Wilkie et al. 1993) nachgewiesen werden. Neben den oben beschriebenen Funktionen können präsynaptische nAChR unter bestimmten Bedingungen (wie Denervierung und Entwicklung) auch andere Aufgaben übernehmen, wie z.B. die Neuritogenese (Zheng et al. 1994, Role und Berg 1996).

1.3.3 Präterminale oder axonale Lokalisation der nAChR

Präterminale Rezeptoren sind solche, die auf den Axonen vor den Axonterminalen liegen (Abb. 3).

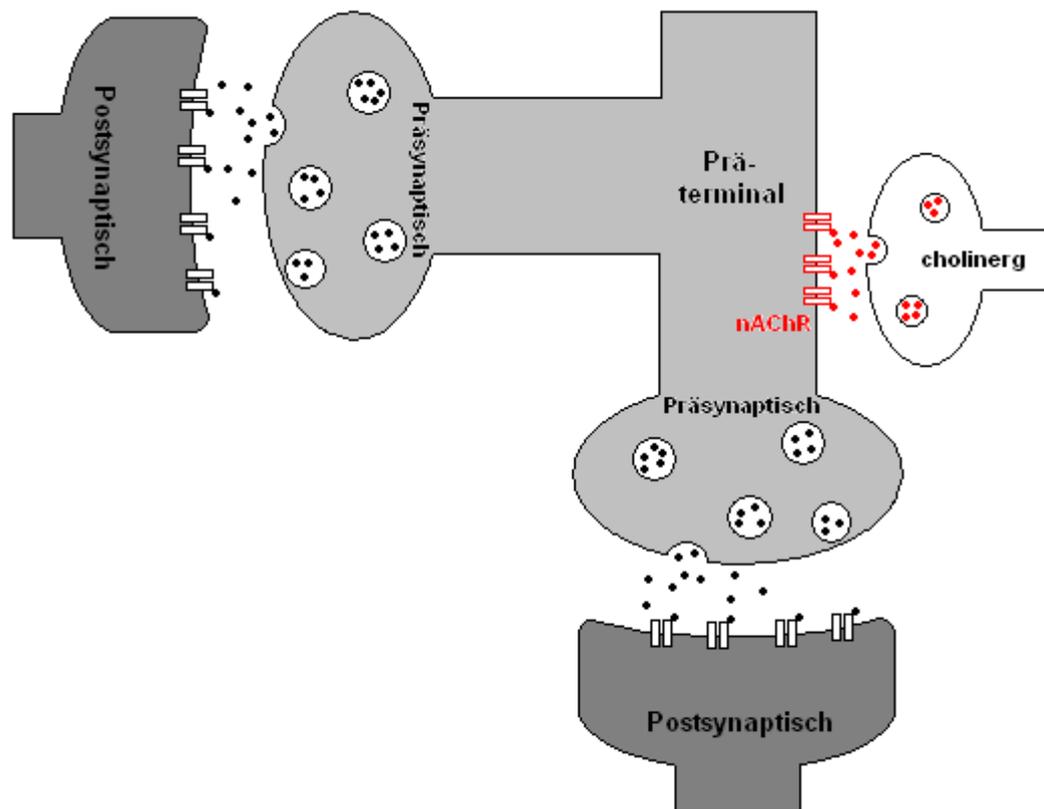


Abbildung 3: Präterminale oder axonale Lokalisation der nAChR.

Die nAChR sind entlang des Axons gelegen und beeinflussen präsynaptische Terminals.

Vor allem vor GABAergen Synapsen kann die Aktivierung von präterminal gelegenen nAChRs dazu führen, dass die Membran lokal depolarisiert wird, wodurch spannungsabhängige Na^+ -Kanäle geöffnet werden. Dies wiederum setzt die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotenzials herab, was dann die Wahrscheinlichkeit einer GABA-Freisetzung erhöht (Lena et al. 1993, Alkondon et al. 1997a). Dieser Effekt kann durch TTX, einem Na^+ -Kanal-Blocker, gehemmt werden (TTX-sensitiver präterminaler Effekt von ACh).

Durch die Lage und den Aktivitätszustand der präterminalen nAChR kann bestimmt werden, ob ein Aktionspotenzial in eine Axonverzweigung fortgeleitet wird oder nicht. Dadurch wäre eine Kontrolle der Erregungsausbreitung in den terminalen Axonästen möglich (Erregungshemmung oder -bahnung).

1.4 Das cholinerge System im ZNS und cholinerge Innervation des Neocortex

Das cholinerge System des ZNS teilt sich in zwei Unterbereiche auf: **(1)** Das eine cholinerge Subsystem nimmt seinen Ursprung von Neuronen des pedunculopontinen Tegmentums und des laterodorsalen pontinen Tegmentums und endet in einer weitläufigen Innervation des Thalamus, des Mesencephalons und des Hirnstamms. **(2)** Das zweite Subsystem nimmt seinen Ursprung in Acetylcholin-produzierenden Neuronen des basalen Vorderhirns und innerviert den gesamten Cortex und den Hippocampus (Mesulam et al. 1983, Eckenstein et al. 1988, Lysakowski et al. 1989, Dani 2001, Descarries et al. 2005, Henny und Jones 2008).

1.4.1 Das basale Vorderhirn

Die Grenzen des basalen Vorderhirns werden durch das Vorhandensein von cholinergen Neuronen definiert. Die Kerne des basalen Vorderhirns umschließen (von rostral nach kaudal): das mediale Septum, die Kerne der vertikalen und horizontalen Anteile des diagonalen Bandes, das ventrale Pallidum, die magnocelluläre präoptische Area, die Substantia innominata und den magnocellulären basalen Nucleus (Butcher und Semba 1989).

Im basalen Vorderhirn sind nicht nur cholinerge Neurone zu finden, vielmehr herrscht eine hohe Heterogenität bezüglich der unterschiedlichen Neurotransmitter. Die Existenz von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn wurde erstmal 1967 mit Hilfe der histochemischen Markierung der Acetylcholinesterase nachgewiesen (Lewis und Shute 1967). Diese Neurone sind auf einer longitudinalen Säule vom medialen Septum über das diagonale Band, dem rostromedialen und ventralen Pallidum, der magnocellulären präoptischen Area, der Substantia innominata bis zum magnocellulären basalen Nucleus verteilt. Diese Verteilung wird nicht unterbrochen und hält sich nicht an die Grenzen der genannten Nuclei (Schwaber et al. 1987). GABAerge Neurone machen den Hauptteil der nicht-cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn aus. Ferner wurden glutamaterge und neuropeptiderge Neurone gefunden (Semba 2000).

Eine alternative Nomenklatur zur Einteilung der Projektionen des basalen Vorderhirns entwickelten Mesulam et al. (1983, siehe Tab. 5). Das Vorderhirn und

der obere Hirnstamm der Ratte enthalten 6 Gruppen von Neuronen, die cholinerge Projektionen aussenden. Diesen wurden die Bezeichnungen Ch1-Ch6 zugewiesen. Der Ch4-Sektor enthält die cholinergen Neurone des Nucleus basalis Meynert und anderer Kerne und stellt die größte cholinerge Projektion zum Neocortex dar.

Tabelle 5: Nomenklatur der cholinergen Projektion des basalen Vorderhirns und des oberen Hirnstamms in der Ratte (nach Mesulam et al. 1983)

Cholinerge Zellgruppe	Traditionelle Nomenklatur für die Kerne, die die cholinergen Neurone enthalten	Hauptziel der cholinergen Innervation
Ch1	Medialer septaler Nucleus	Hippocampus
Ch2	Vertikaler Anteil des diagonalen Bandes	Hippocampus
Ch3	Lateraler, horizontaler Anteil des diagonalen Bandes	Olfactorischer Bulbus
Ch4	Nucleus basalis Meynert , Globus pallidus, Substantia innominata, Nucleus der Ansa lenticularis, Neurone lateral des vertikalen Anteils und medial des diagonalen Bandes	Neocortex und Amygdala
Ch5	Nucleus pedunculopontinus, Neurone neben dem Nucleus cuneiforme und in der parabrachialen Area	Thalamus
Ch6	Laterodorsaler tegmentaler Nucleus	Thalamus

Die cholinerge Projektion des basalen Vorderhirns zum cerebralen Cortex weist folgende grundlegende Eigenschaften auf (Semba 2000): **(1)** Eine topographische Organisation, in der die anterioren cholinergen Neurone vorwiegend zum Hippocampus projizieren, während die posterioren cholinergen Neurone den Neocortex und die Amygdalae ansteuern. **(2)** Nahezu unilateral verlaufende Bahnen mit nur wenig kontralateraler Projektion. **(3)** Ein Mangel an wechselseitigen Verbindungen (außer im limbischen System, das zurück zum basalen Vorderhirn projiziert). **(4)** Wenige axonale Kolateralisationen zwischen corticalen und nicht-corticalen Zielen.

1.4.2 Die cholinerge Innervation des Neocortex

Mechawar et al. (2000) haben mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen die cholinerge Innervation des Neocortex der Ratte studiert. Das Frontalhirn zeigte die homogenste Verteilung und die höchste mittlere Dichte an cholinergen Fasern, v.a. in der Schicht 5 des Neocortex. Die primär sensorischen Gebiete zeigten einige Ähnlichkeiten im Verteilungsmuster und in der Dichte der ACh-Innervation. Ihre

mittlere Dichte war aber niedriger als im frontalen Cortex, v.a. weil hier die Schicht 4, deren ACh-Innervation niedrig ist, gut entwickelt ist. Die durchschnittliche Dichte an Axon-Varikositäten lag in allen drei Gebieten bei $4.6 \times 10^6 / \text{mm}^3$. Das bedeutet, dass eine ACh-Varikosität auf 260 corticale Nervenendigungen kommt. Dies zeigt, dass die ACh-Innervation nicht nur ausgedehnt, sondern auch die mächtigste aller modulatorischen Systeme im cerebralen Cortex ist. Verglichen mit der Dichte der Axon-Varikositäten der dopaminergen Innervation ist die Dichte der Varikositäten der ACh-Innervation ca. 2.4-mal so hoch.

Die cholinergen Axonterminale haben hauptsächlich mit dendritischen Ästen der nachgeschalteten Neurone synaptischen Kontakt. Die postsynaptischen Elemente sind Pyramiden- und Nicht-Pyramidenzellen. Es wird angenommen, dass viele der postsynaptischen Elemente GABAerge corticale Interneurone sind (Beaulieu und Somogyi 1991). Somit mündet der cholinerge Input im Cortex sowohl direkt an Pyramidenzellen als auch an inhibitorischen Interneuronen. Die Innervation der Pyramidenzellen bedeutet eine lang anhaltende Aktivierung, die aber in einem relativ kleinen corticalen Gebiet auftritt, weil cholinerge Axone nur ein kleines Feld erreichen. Werden die Interneurone angesprochen, so führt dies zu einer raschen kurz anhaltenden Inhibierung von Pyramidenzellen in einem relativ großen Gebiet. Dies dürfte dazu beitragen, spontane Aktivität zu reduzieren und die gezielte Antwort von sensorischen Neuronen zu fördern (Semba 2000).

Die Verteilung der α_4 - und β_2 -Untereinheiten des nAChR im Neocortex entspricht am ehesten dem Innervationsmuster cholinergischer Fasern (Clarke et al. 1985, Wada et al. 1989, 1990, Schoepfer et al. 1990, Cimino et al. 1992, Sargent 1993, Seguela et al. 1993, Charpantier et al. 1998). Markiert man diese Untereinheiten, so sind sie auf neuronalen Zellkörpern und Dendriten in unterschiedlichen corticalen Schichten (Hill et al. 1993, Nakayama et al. 1995), v.a. aber auf Neuronen in den Schichten 2/3 und 5 zu finden (Wada et al. 1989). Diese Ergebnisse zeigen, dass $\alpha_4\beta_2$ nAChR im cerebralen Cortex vornehmlich als somatodendritische Heterorezeptoren fungieren, die durch ACh aktiviert werden, das aus den benachbarten Varikositäten stammt.

Broide et al. (1995) konnten zeigen, dass eine zweite wichtige Untereinheit der nAChR im Neocortex die homopentameren α_7 -Rezeptoren sind. Sie spielen eine wichtige Rolle in der corticalen Entwicklung und sind auch noch im Erwachsenenalter in allen Schichten nachweisbar.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind weit verbreitet im Neocortex, ihre Funktion ist aber zum Großteil unbekannt.

Frühere Untersuchungen des cholinergen Systems im Gehirn der Ratte haben gezeigt, dass Pyramidenzellen in der Schicht 5 des Neocortex nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) auf ihren Somata besitzen (Zolles et al. 2009). Nachdem die Neurone im Experiment vollständig synaptisch isoliert wurden, also weder glutamaterge noch GABAerge synaptische Übertragung stattfinden konnte, und die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren durch Atropin geblockt waren, konnte man durch Applikation von ACh Membrandepolarisationen und Einwärtsströme hervorrufen. Durch die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Membranströme und deren Reaktion auf die nAChR-selektiven Antagonisten MLA und DH β E konnte gezeigt werden, dass es sich um Ströme handelte, die auf der Aktivierung von postsynaptischen nAChR beruhten und dass die beteiligten Rezeptoren sehr wahrscheinlich dem $\alpha_4\beta_2$ - und dem α_7 -Subtyp zuzurechnen sind. Eine weitere Auffälligkeit war die starke Desensibilisierung dieser Membranströme bei repetitiver Applikation von ACh in kurzen Zeitintervallen.

Weitere Untersuchungen zur Funktion solcher postsynaptischen nAChR auf Pyramidenzellen erfordern den Einsatz von genetischen Modellen, in denen eine Untereinheit deletiert oder überexprimiert wurde. Solche Modelle können bisher aber nur an Mäusen etabliert werden. Deshalb war die erste Frage, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollte, ob sich, ebenso wie bei der Ratte, funktionelle postsynaptische nAChR in Pyramidenzellen der Schicht 5 des Neocortex der Maus nachweisen lassen.

Nicoll et al. (1996) fanden im Neocortex der Ratte, dass es eine Schichten-abhängige Interaktion zwischen inhibitorischen Interneuronen und Pyramidenzellen gibt. Diese Autoren aktivierten die synaptische Übertragung von den Interneuronen auf die Pyramidenzellen durch lokale Druckapplikation von Acetylcholin an die Somata der Interneurone und beobachteten, dass unter diesen Bedingungen sehr häufig inhibitorische postsynaptische Potenziale (IPSPs) in den Pyramidenzellen der Schicht 2/3 auftraten. Die IPSPs wurden ausnahmslos durch GABA vermittelt, welches den Chlorid- ($GABA_A$ -) und den Kalium-abhängigen ($GABA_B$ -) Rezeptor

aktivierte. Daraus resultierten schnelle ($GABA_A$ -vermittelte) und langsame ($GABA_B$ -vermittelte) IPSPs. Diese Sequenz inhibitorischer Potenziale ist typisch für neocorticale Pyramidenzellen (Howe et al. 1987, Connors et al. 1988). Die genannten Untersuchungen von Nicoll et al. (1996) sprechen dafür, dass die Aktivität der Pyramidenzellen der Schicht 2/3 nur durch präsynaptisch lokalisierte nAChR beeinflusst wird. Ob diese Pyramidenzellen auch funktionelle postsynaptische nAChR aufweisen, wurde bisher noch nicht systematisch untersucht. Daher war die zweite Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob auch die Pyramidenzellen der Schicht 2/3 des Neocortex der Maus funktionelle postsynaptische nAChR exprimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Perfusionslösungen

Die Experimente wurden an Gehirnschnittpräparaten *in vitro* durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung der zellulären Stoffwechselfunktionen und damit der neuronalen Aktivität wurden die Schnitte während der Versuche mit sogenannter artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) perfundiert. Die ACSF setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (in mM): NaCl (127), KCl (3), NaH₂PO₄ (2,5), NaHCO₃ (23) und D-Glucose (25). Mit dem hohen Glucosegehalt wurde der Energiestoffwechsel der Zellen sichergestellt. In der Aufbewahrungs- und Perfusionslösung befanden sich zusätzlich 2 mM CaCl₂ und 2 mM MgCl₂.

Die ACSF wurde permanent mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast, um einerseits die Schnitte mit Sauerstoff zu versorgen. Gleichzeitig bildete das zugeführte CO₂ zusammen mit dem Natriumhydrogencarbonat einen Puffer, der den pH-Wert der Lösung bei 7,4 konstant hielt. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 28°C durchgeführt.

Zur Präparation der Gehirnschnitte wurde eine Lösung mit verringertem Calciumgehalt (0,5 mM) bei gleichzeitig erhöhtem Magnesiumgehalt (3,5 mM) verwendet. Dies bewirkte, dass bei der durch die Präparation bedingten Traumatisierung wesentlich weniger Neurone zugrunde gingen, da sie in einem Zustand verringerter Erregbarkeit und Stoffwechseltätigkeit gehalten wurden.

2.1.2 Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen

Für die Patch-Clamp-Messungen wurden die dazu notwendigen Glaspipetten mit einer Lösung gefüllt, die der intrazellulären Ionenzusammensetzung entsprach. Zudem wurden Puffer zur Konstanthaltung des intrazellulären pH (HEPES) und der intrazellulären Calciumkonzentration (EGTA) zugesetzt.

Die Pipettenlösung bestand aus folgender Grundzusammensetzung (in mM): NaCl (2), EGTA (0,2), HEPES (10), ATP(Mg) (4), GTP(Na) (0,5) und Phosphokreatin (10).

ATP(Mg) ist v.a. Energielieferant, dient aber auch als Vorstufe zur Bildung des Second Messenger cAMP. GTP(Na) ist für die Funktion der G-Proteine essentiell und Phosphokreatin stellt für die Rückwandlung des Adenosindiphosphat (ADP) in Adenosintriphosphat (ATP) die Phosphat-Gruppe zur Verfügung. Alle diese Zusätze sind notwendig, um einen sogenannten „Run-down“ von Membranleitfähigkeiten während der Ableitung zu verhindern.

Zur Messung von Neuronen in Schicht 2/3 wurde eine Lösung mit einem hohen Chlorid-Gehalt verwendet. Zur Herstellung dieser Pipettenlösung wurde der Grundzusammensetzung 131 mM KCl zugesetzt. Bei dieser Chlorid-Konzentration stellt sich das Chlorid-Gleichgewichtspotenzial bei ca. 0 mV ein (28°C). Dadurch steigt zum einen die treibende Kraft für Chloridionen. Zum anderen treten nach Aktivierung von chlorid-permeablen GABA_A-Rezeptor-Kanälen Einwärtsströme auf, da nun das Chlorid-Gleichgewichtspotenzial positiv vom Ruhemembranpotenzial liegt.

Für die Ableitung von Schicht 5 Neuronen wurde eine Pipettenlösung mit normalem Chloridgehalt verwendet (Chlorid-Gleichgewichtspotenzial zwischen -60 und -70 mV). Zur Herstellung dieser Lösung wurde der Grundzusammensetzung 4 mM KCl und 135 mM K-Gluconat zugesetzt.

Der pH-Wert der Pipettenlösungen betrug 7.3 und die Osmolarität 290 mosmol/l.

2.1.3 Verwendete Substanzen

Bis auf Acetylcholin wurden alle verwendeten Substanzen durch Zugabe zur Perfusionslösung appliziert. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Unter Berücksichtigung des Volumens der Schläuche dauerte es maximal 5 Minuten bis die applizierten Substanzen die Ableitungskammer erreichten. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich immer auf die Endkonzentration in der Perfusionslösung.

Rezeptoragonisten:

Acetylcholin (Chlorid): Agonist an Acetylcholinrezeptoren (AChR); (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Konzentration: zwischen 50 und 500 µM

Rezeptorantagonisten:

<i>Atropin</i> (Sulfat):	Antagonist an muskarinischen AChR; (Fa. Sigma) Konzentration: 1 μ M
<i>Gabazin</i> :	Antagonist an GABA _A -Rezeptoren; (Fa. Sigma) Konzentration: 1 μ M
<i>Bicucullin</i> (Methiodid):	Antagonist an GABA _A -Rezeptoren; (Fa. Sigma) Konzentration: 10 μ M
<i>D-AP5</i> :	D-(-)-2-Amino-5-phosphono-pentansäure; (Fa. Tocris Cookson Ltd., Bristol, England) Kompetitiver Antagonist an NMDA-Rezeptoren, Konzentration: 10 μ M
<i>CNQX</i> :	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion; (Fa. Tocris) Kompetitiver Antagonist an AMPA/Kainat-Rezeptoren, Konzentration: 10 μ M
<i>MLA</i> (Citrat):	Methyllycaconitin; (Fa. Sigma) Bei Konzentrationen \leq 10 nM, spezifischer Antagonist an nikotinischen α_7 -AChR
<i>DHβE</i> (Hydrobromid):	Dihydro- β -Erythroidin; (Fa. Sigma) Bei Konzentrationen \leq 1 μ M spezifischer Antagonist an nikotinischen $\alpha_4\beta_2$ -AChR

Ionenkanalblocker:

<i>TTX</i> (Citrat):	Tetrodotoxin; (Fa. Sigma) Selektiver Natriumkanalblocker Konzentration: 1 μ M
----------------------	---

Hydrophile Substanzen wurden in destilliertem Wasser, lipophile in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und als Stammlösung eingefroren aufbewahrt.

2.1.4 C57BL/6 - Mäuse

C57BL/6 ist eine häufig verwendete Labormaus-Linie. Sie geht aus einem Inzuchtstamm hervor, mit Individuen, die bis zu 98% genetisch identisch sind. Die Mäuse stammen ursprünglich von Fa. Charles River (Sulzfeld, Deutschland), werden

aber im Tierhaus des Physiologischen Instituts gezüchtet. Für die durchgeführten Versuche wurden 74 Mäuse verwendet.

Die Haltung der Tier erfolgte in Käfigen bei konstanter Raumtemperatur von 23°C und 12 h Licht pro Tag. Wasser und Futter standen *ad libidum* zur Verfügung.

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung der Gehirnschnitte

Es wurden 20-25 Tage alte C57BL/6 - Mäuse beider Geschlechter verwendet. Es wird davon ausgegangen, dass es bezüglich der Ergebnisse keinen geschlechtsspezifischen Unterschied gibt. Diese wurden durch Einleiten von CO₂ in eine Narkosekammer bis zu einem Toleranzstadium (Ausfall der Stell- und Haltere reflexe, vertiefte und normalfrequente Atmung, fehlender Corneareflex) narkotisiert. Danach wurden sie dekapitiert, das Gehirn in toto entnommen und dieses sofort für eine Minute in eisgekühlte Carbogen-gesättigte Schneidelösung gelegt.

Das Cerebellum wurde dann abgetrennt und die beiden Hemisphären durch einen Schnitt entlang der Fissura longitudinalis in zwei Hälften geteilt. Die nicht verwendete Hälfte wurde als Reserve zurück in die Schneidelösung gelegt. Die andere Hemisphäre wurde durch einen Horizontalschnitt halbiert. Die weitere Präparation erfolgte an der dorsalen Hälfte der Hemisphäre, die hauptsächlich aus dem Neocortex bestand.

Mittels Cyanacrylat wurde der Gewebeblock mit der caudalen Fläche auf eine Metallscheibe geklebt. Zur Stabilisierung wurde der Block gegen einen Agarblock, der vorher auf die Metallscheibe aufgebracht wurde, gelehnt.

Mit einem Mikrotom (HM650V, MICROM International; Walldorf; Deutschland) wurden ca. 6 - 8 Schnittpräparate (Dicke: 300 µm) in frontaler Schnittrichtung angefertigt. Die Schneidekammer des Mikrotoms war dabei mit Carbogen-gesättigter und gekühlter Schneidelösung gefüllt. Verwendet wurden Schnitte aus dem somatosensorischen Kortexbereich.

Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Stunden (davon 0,5 Stunden bei 34°C und 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur) in einer Carbogen-gesättigten

Aufbewahrungslösung konnten die Schnittpräparate für die Versuche verwendet werden.

2.2.2 Versuchsaufbau

Die Ableitungskammer, in der der Gehirnschnitt mit einem Nylonnetz fixiert wurde, befand sich auf dem Objektisch eines Durchlichtmikroskops (Axioskop FS; Zeiss; Oberkochen, Deutschland). Die Perfusionslösung wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Minipuls 3; Gilson; Middleton, USA) zur Kammer befördert und wieder abgesaugt. Vor Erreichen der Kammer wurde die Lösung durch einen Temperaturregler (TC-324B Temperature Controller; Warner Instrument Corporation; Hamden, USA) auf ca. 28°C aufgeheizt.

Das Mikroskop war mit einer Infrarot-fähigen Differenzial-Interferenz-Kontrast (DIC-) Optik ausgestattet. Damit konnte man Neurone bis zu einer Tiefe von 150 µm im Schnittpräparat als Phasenkontrastbild darstellen. Dieses Bild wurde mit einer Infrarot-sensitiven CCD-Kamera (C2400, Hamamatsu Photonics K.K.; Hamamatsu City, Japan) auf einen Monitor (Video Monitor WV-BM 1400; Panasonic; Hamburg, Deutschland) übertragen und außerdem mittels einer Computer-Videokarte und dem Programm WinTV (Hauppauge Computer Works GmbH; Mönchengladbach, Deutschland) digitalisiert und gespeichert.

Zur Positionierung der Patch-Clamp-Pipette wurde ein motorisierter Mikromanipulator (LN mini 25; Luigs & Neumann; Ratingen, Deutschland), zur Positionierung der Applikationspipette ein manueller Mikromanipulator verwendet.

2.2.3 Elektrophysiologische Messungen

Die Elektroden für die Patch-Clamp-Ableitungen wurden aus dickwandigen Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm; Harvard Apparatus LTD; Kent, England) mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes (DMZ-Universal-Puller; Zeitz; Augsburg, Deutschland) hergestellt. Die Pipetten wurden an jedem Versuchstag neu angefertigt, mit 10 µl der jeweiligen Pipettenlösung gefüllt, am Mikromanipulator angebracht und über einen chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden. Der elektrische Widerstand der Elektroden lag im Bereich von 5 bis 7 MΩ.

Das richtige Positionieren der Patch-Clamp-Pipette erfolgte in zwei Schritten. Bei einer 40-fachen Vergrößerung wurde die Pipette ins Gesichtsfeld des Objektivs gebracht und dann bei 160-facher Vergrößerung mit Hilfe des Videomonitors in der Nähe des zu messenden Neurons positioniert. Um beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung keinen Schmutz aufzusaugen, der die Pipettenspitze verschließen könnte, und um beim Durchfahren der Cortexschichten das Gewebe wegzudrücken, wurde zuvor ein schwacher Überdruck mit Hilfe einer 1 ml Spritze angelegt.

Wenige Mikrometer oberhalb des Neurons wurde der Überdruck weggenommen und die Patch-Clamp-Pipette so weit an das Neuron herangefahren, bis eine Widerstandserhöhung am Oszilloskop angezeigt wurde. Gleichzeitig war meist ein Eindellen der Zellmembran (dimpling) zu beobachten. Zur Messung des Widerstandes wurde während des gesamten Vorgangs ein Rechteckstrompuls (30 pA, 60 ms) über die Elektrode in den Extrazellulärraum injiziert.

Unmittelbar nach der Widerstandserhöhung oder dem Auftreten des Dimplings wurde durch Anlegen eines leichten Unterdrucks ein extrem dichter Kontakt zwischen der Membran der Zelle und der Pipette hergestellt, der sogenannte Giga-Ohm-Seal. Dabei handelt es sich um einen elektrischen Widerstand zwischen Elektrodeninnen- und -außenseite, der in den Experimenten meist deutlich über einem Giga-Ohm lag. Der Giga-Ohm-Seal bewirkt eine elektrische Isolierung des Membranflecks (Patch) von der übrigen Zellmembran. Zudem wird das Rauschen der Messanordnung sehr stark reduziert. Mit dieser Meßanordnung wäre es möglich, die Aktivität einzelner Ionenkanäle zu registrieren. Da in der vorliegenden Arbeit aber Ganzzellströme untersucht werden sollten, wurde diese sogenannte Cell-Attached-Konfiguration in die Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik überführt. Dazu wurde der Unterdruck an der Pipette noch etwas erhöht, was dann zum Aufreißen der Membran unterhalb der Pipettenöffnung führte. Die Etablierung des Ganzzell-Modus war an einem Abfall des Widerstandes vom Giga-Ohm-Bereich in den Mega-Ohm-Bereich zu erkennen.

Die Messungen wurden zum einen im Current-Clamp-Modus durchgeführt. In diesem Modus wird die Membranspannung registriert und kann gegebenenfalls durch Strominjektion verändert werden. Zum anderen wurde der Voltage-Clamp-Modus (Spannungsklemme) angewendet. Hier wird das Membranpotenzial vorgeben und die Ströme über die Zellmembran gemessen. Bei dem Meßverstärker handelte es

sich um ein Einzelelektroden-Voltage-Clamp-System (npi SEC 10L, Fa. npi electronics, Tamm, Deutschland), das schnell (mit 42 kHz) zwischen Strominjektion und Spannungsmessung hin und her schaltete (Switched-Clamp-Verstärker). Da bei diesem Verstärker während der Strominjektion keine Spannung gemessen wird, entfällt das häufig mit elektrophysiologischen Experimenten verbundene Problem des Serienwiderstandes (Sutor et al. 2003).

Die erfassten Signale wurden mit 10 kHz (Current-Clamp-Modus) bzw. 1 kHz (Voltage-Clamp-Modus) gefiltert und zur Speicherung mit einer Rate von 2-5 kHz digitalisiert. Dies geschah mittels eines Analog-Digital-Wandlers (PCI-6024E, National Instruments, Austin, USA). Die Steuerung der Experimente sowie die Speicherung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes „CellWorks“ (npi, Tamm, Deutschland).

2.2.4 Applikation von Acetylcholin

Acetylcholin wurde durch Druck aus einer Mikropipette in die unmittelbare Nähe der Neurone appliziert. Der Transmitter wurde dazu in ACSF gelöst, die Konzentrationen variierten zwischen 50 μM und 500 μM .

Die Applikationspipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser: 1,17 mm; Harvard Apparatus LTD, England) mittels eines Elektrodenziehgerätes (DMZ-Universal-Puller; Zeitz; Augsburg, Deutschland) hergestellt. Der Durchmesser der Pipettenöffnung betrug ca. 1 μm .

Nach Befüllen der Pipette mit ACh-Lösung wurde an ihr hinteres Ende ein Teflonschlauch angeschlossen und über diesen mit einem steuerbaren Druckregulierungsgerät (PDES-02T; npi; Tamm, Deutschland) verbunden. Der Druck zur Applikation betrug 700 mbar und die Applikationsdauer lag zwischen 25 und 400 ms. Normalerweise wurde ACh in Zeitintervallen von 60 – 120 s appliziert. Nur bei der Untersuchung der Desensibilisierung der Rezeptoren wurden diese Intervalle bis auf 8 s verkürzt. Applikationsdauer und -frequenz wurden mit Hilfe eines Zeitgebers (MASTER-8; A.M.P.I.; Jerusalem, Israel) gesteuert.

Die Applikationspipetten wurden mit einem manuellen Mikromanipulator unter visueller Kontrolle in einem Abstand von ca. 10 μm zu den Somata der abgeleiteten Neurone positioniert.

2.2.5 Datenanalyse und statistische Auswertung

Zur Datenanalyse und statistischen Auswertung wurden die Programme Igor Pro (Version 6, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) und Prism 3 (Graphpad Software, San Diego, USA) verwendet. Die durch ACh-Applikation induzierten Membranströme wurden hinsichtlich ihrer Amplitude, ihrer Fläche, ihrer Stromanstiegszeit (Rise Time) und den Zeitkonstanten der Stromabfallszeit (Decay Time) ausgewertet. Die Amplitude ergab sich aus der Differenz zwischen maximalem negativem Strom und dem Haltestrom. Die Fläche erhielt man durch Integration zwischen Stromkurve und Nulllinie. Die Fläche gibt auch den Nettoladungsfluss wieder (Strom x Zeit). Die Anstiegszeit (Rise Time) entsprach der Zeit zwischen dem 10 %- und dem 90 %-Wert der maximalen Stromamplitude. Die Abfallszeitkonstanten wurden durch Anpassen einer exponentiellen Funktion an den schnellen oder langsamen Anteil des Membranstromes ermittelt.

Absolute Meßwerte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), normalisierte Werte als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau beträgt 5 % ($p < 0.05$).

Zur statistischen Auswertung wurden je nach Datenlage folgende Tests verwendet: One-sample t-Test, der verbundene zweiseitige t-Test, der unverbundene zweiseitige t-Test, One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Tests und der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Neuronenklassifizierung

3.1.1 Pyramidenzellen in den Neocortexschichten 2/3 und 5

3.1.1.1 Mikroskopische Darstellung der Pyramidenzellen

Bei der einen der untersuchten Zellpopulationen handelte es sich um Pyramidenzellen der Neocortexschicht 2/3. Die Identifizierung erfolgte anhand der Lage und der Form der Zellen. Die Schicht 2/3 ist die erste Pyramidenzellschicht unterhalb der Piaoberfläche des Neocortex. Im Phasenkontrastbild konnten die Pyramidenzellen dieser Schicht leicht an der typischen Form ihrer Somata erkannt werden (Abb. 4).

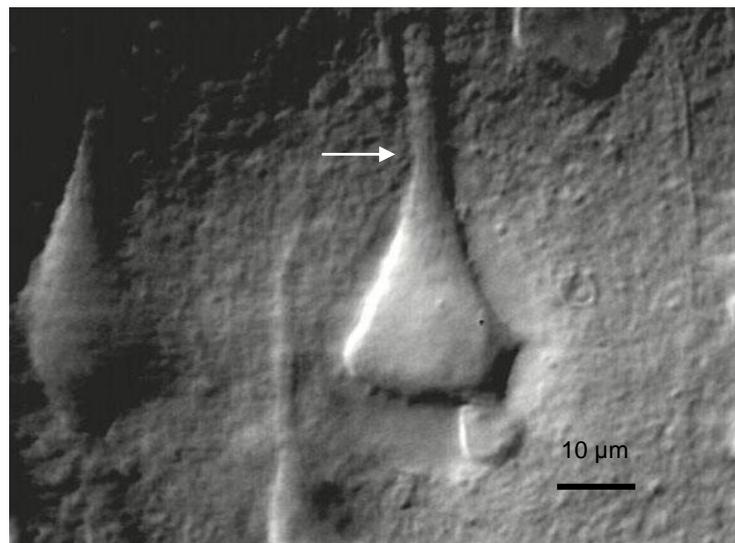
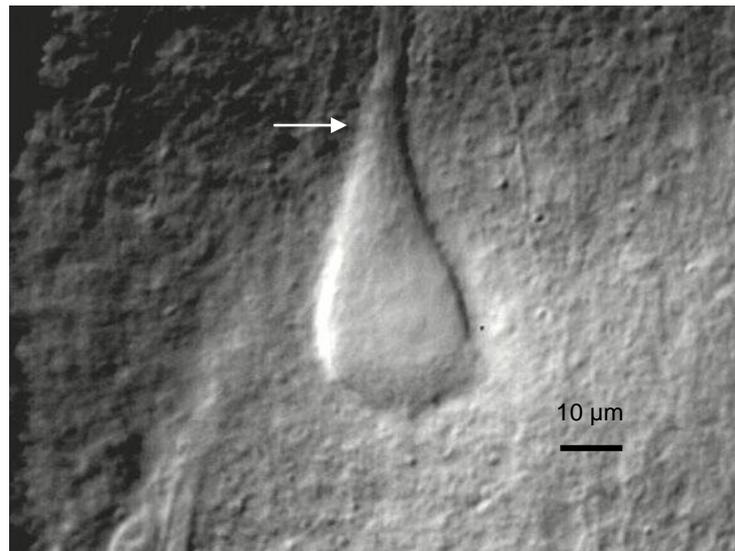


Abbildung 4: Pyramidenzelle in Schicht 2/3.

Infrarot-DIC-Bild eines Neurons in einem Gehirnschnittpräparat des Neocortex. Zu erkennen ist die typische Pyramidenform des Somas und der Stamm des apikalen Dendritenbaums (Pfeil).

Die zweite der untersuchten Pyramidenzellpopulationen befand sich in Lamina 5, das ist die Pyramidenzellschicht in der Nähe der weißen Substanz unterhalb des Neocortex. Die Identifizierung der Zellen erfolgte analog zu der von Neuronen in Schicht 2/3. Die Dichte der Pyramidenzellen ist in Lamina 5 sehr hoch und es sind vornehmlich sehr große Neurone zu finden (Abb. 5).

**Abbildung 5: Pyramidenzelle in Schicht 5**

Infrarot-DIC-Bild eines Neurons in einem Gehirnschnittpräparat des Neocortex. Zu erkennen ist die typische Pyramidenform des Somas und der Stamm des apikalen Dendritenbaums (Pfeil).

3.1.1.2 Passive Eigenschaften

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurden von jedem Neuron die passiven Eigenschaften bestimmt. Zu diesen Eigenschaften gehören u.a. das Ruhemembranpotenzial (RMP), der Membraneingangswiderstand (R_N) und die somatische Membranzeitkonstante (τ) (Abb. 6). Zu ihrer Messung wurde im Current-Clamp-Modus ein hyperpolarisierender Rechteckstrompuls mit einer Amplitude von 20 pA für eine Dauer von 800 ms in das Neuron injiziert und die resultierende Spannungsantwort registriert. Zur Rauschunterdrückung wurden 20 solcher Antworten gemittelt. Die Bestimmung des RMP erfolgte durch Messung der absoluten Potenzialamplitude zur Referenz (0 mV) unmittelbar vor der Strominjektion. Der Eingangswiderstand R_N ergab sich aus dem Ohmschen Gesetz: $R_N = \Delta V / \Delta I$ (mit $\Delta I = 20$ pA). Die Spannungsdifferenz ΔV entsprach der Amplitude der durch den Strompuls induzierten Spannungsantwort, gemessen mindestens 700 ms nach Beginn der Strominjektion, d.h. zu einem Zeitpunkt zu dem die Spannungsantwort ein Gleichgewicht erreicht hatte. Die somatische Membranzeitkonstante τ wurde durch Anpassung einer exponentiellen Funktion an den Spannungsabfall nach Ausschalten des Strompulses ermittelt.

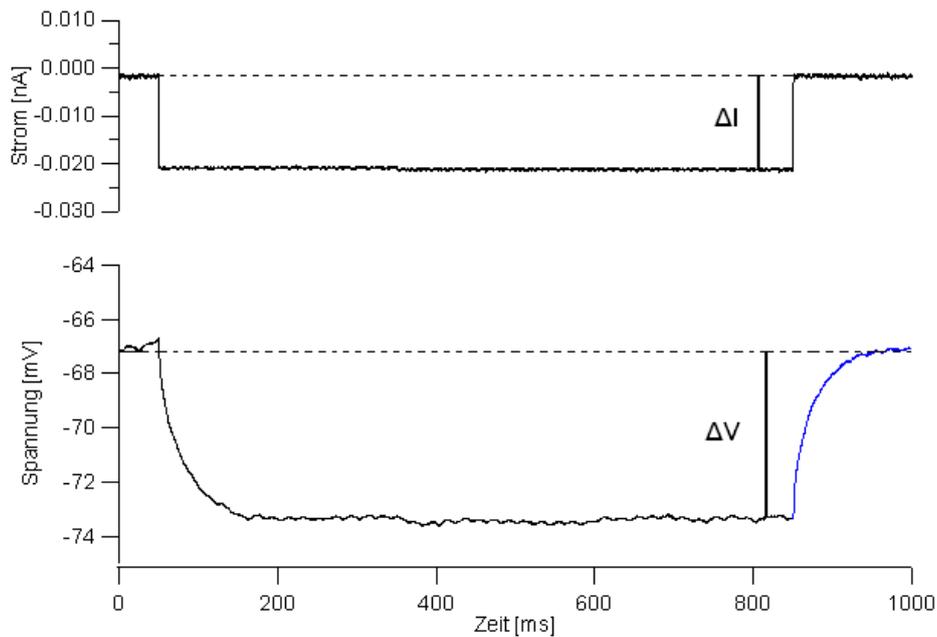


Abbildung 6: Bestimmung der passiven Eigenschaften einer Pyramidenzelle in Schicht 5.

Oben: Mittelwert von 20 Rechteckstimpulsen mit einer Dauer von 800 ms und einer Amplitude von 20 pA. ΔI zeigt den Messzeitpunkt an.

Unten: Mittelwert der 20 induzierten Spannungsantworten. ΔV zeigt den Messzeitpunkt an. Die der Spannungsrelaxation überlagerte blaue Kurve entspricht der angepassten Exponentialfunktion zur Bestimmung der Membranzeitkonstanten.

Insgesamt wurden bei 175 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3 die passiven Eigenschaften bestimmt. Es ergab sich ein mittleres Ruhemembranpotenzial (RMP) von -70.0 ± 5.1 mV, ein mittlerer Membraneingangswiderstand (R_N) von 147.0 ± 72.1 M Ω und eine mittlere Zeitkonstante (τ) von 18.8 ± 25.5 ms (Tab. 6, Kap. 3.1.2.1).

In Schicht 5 wurden insgesamt 60 Pyramidenzellen abgeleitet. Hier ergab sich ein mittleres Ruhemembranpotenzial (RMP) von -67.3 ± 4.3 mV, ein mittlerer Membraneingangswiderstand (R_N) von 82.6 ± 46.9 M Ω und eine mittlere Membranzeitkonstante von 19.2 ± 11.8 ms (Tab. 6, Kap. 3.1.2.1).

3.1.1.3 Strom-Spannungs-Verhalten

Zur Bestimmung des Strom-Spannungs-Verhaltens wurden 20 Rechteckstimpulse mit einer Dauer von einer Sekunde in hyperpolarisierender und depolarisierender Richtung in das Neuron injiziert (Abb. 7A). Dabei wurde die Amplitude der Strompulse ausgehend von einem hyperpolarisierenden Maximum um einen festen Betrag vermindert bzw. erhöht. Zur Auswertung wurden dann die durch den jeweiligen Strompuls hervorgerufenen Spannungsänderungen gemessen. Die Messung erfolgte **(1)** zu einem Zeitpunkt, zu dem die Spannungsantwort ein

Gleichgewicht erreicht hatte (ca. 800 ms nach Beginn des Strompulses, Steady State in Abb. 7C) und **(2)** ca. 100 - 200 ms nach Beginn der Strominjektion (initiale Phase in Abb. 7C). In die Auswertung wurden nur unterschwellige Spannungsantworten einbezogen. Die gemessenen Potenzialänderungen wurden als Funktion des Stromes in einem X-Y-Diagramm aufgetragen. Hier zeigte sich die bekannte Tatsache, dass die Strom-Spannungs-Kurve von neocorticalen Pyramidenzellen nicht linear ist. Vielmehr findet man gleichrichtendes Verhalten (Rektifikation) sowohl in depolarisierender als auch in hyperpolarisierender Richtung. Ursache für die Rektifikation sind zeit- und spannungsabhängige Membranleitfähigkeiten (Connors et al. 1982, Sutor und Ziegelgänsberger 1987).

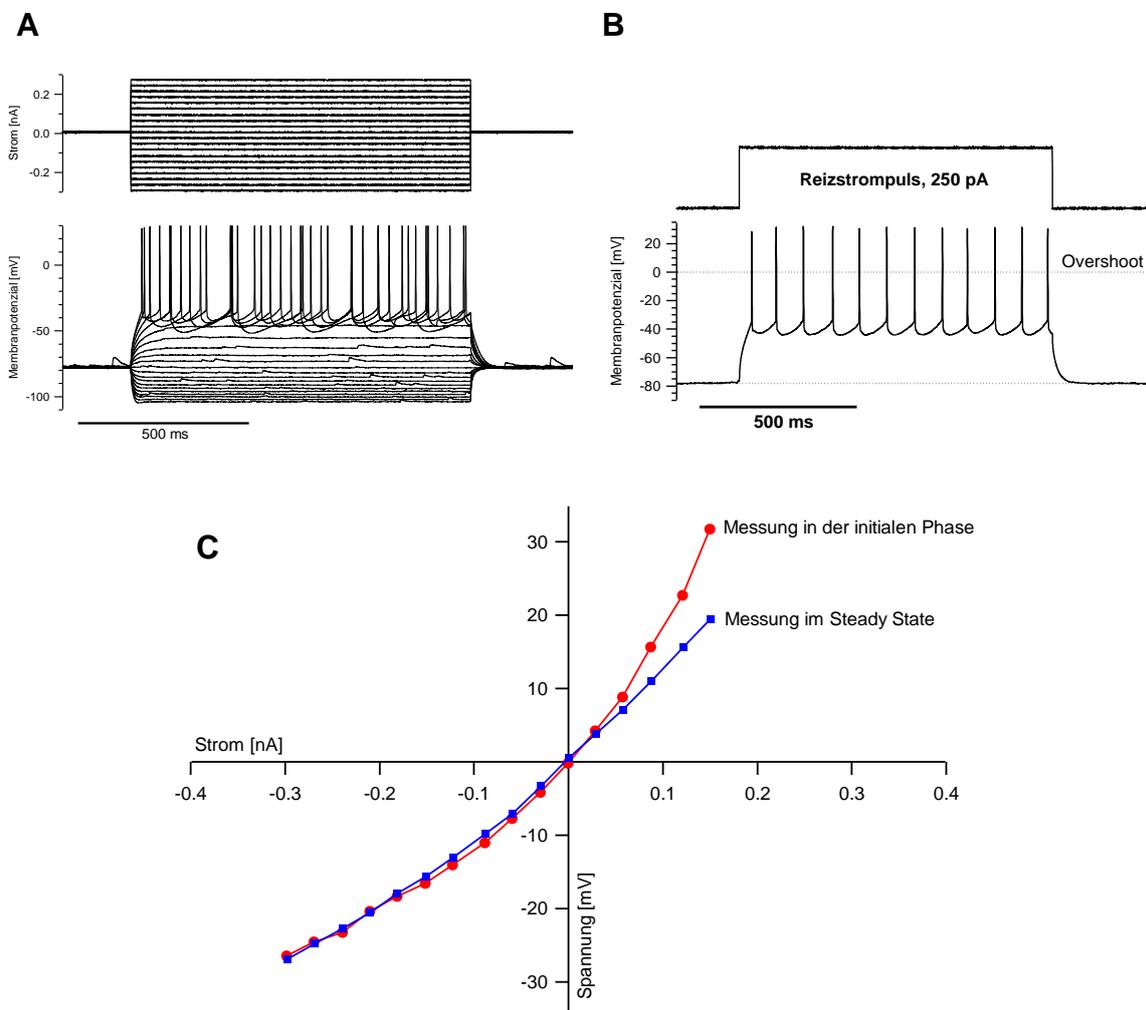


Abbildung 7: Strom-Spannungs-Verhalten einer Pyramidenzelle in Schicht 2/3

A Überinandergelagerte Darstellung von 20 injizierten Rechteckstrompuls (1 s, -300 bis +270 pA, $\Delta I = 30$ pA, obere Spuren) und den entsprechenden Spannungsantworten des Neurons (untere Spuren).

B Überschwellige Antwort des Neurons bei Injektion eines Strompulses von 250 pA.

C Strom-Spannungs-Kurve des Neurons.

3.1.1.4 Amplitude, Dauer und Latenz des initialen Aktionspotenzials

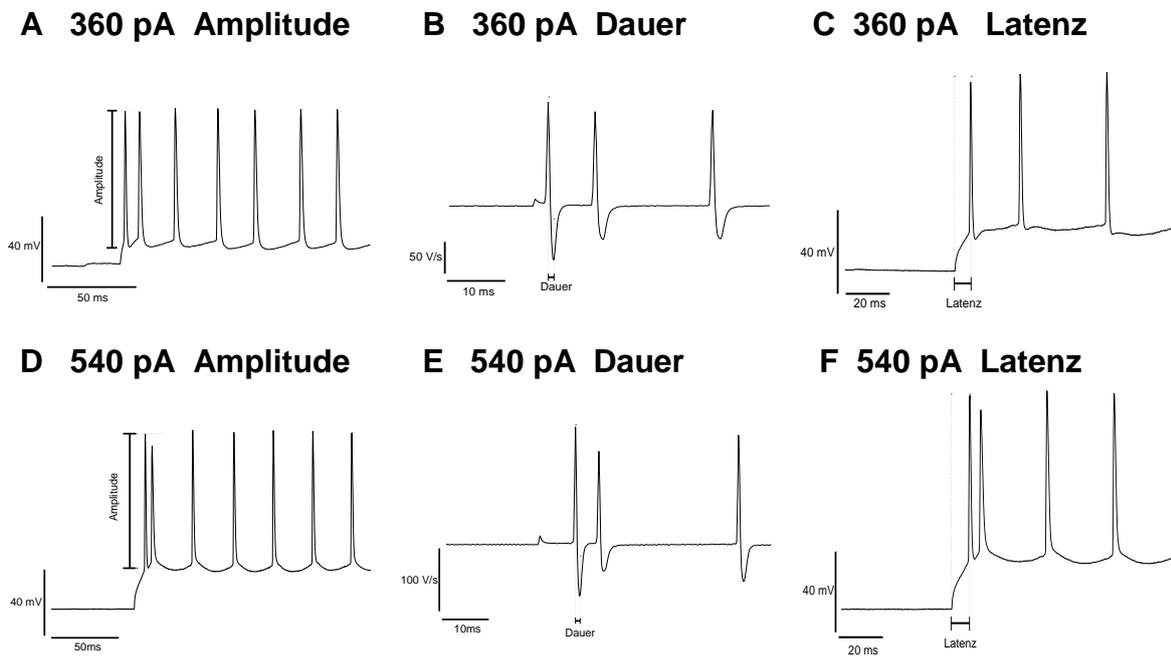


Abbildung 8: Bestimmung der Amplitude, der Dauer und der Latenz des ersten Aktionspotenzials einer Entladungssalve einer Pyramidenzelle in Schicht 5.

A – C: Ableitungen aus einem Neuron während der Injektion eines Strompulses von 360 pA.

D – F: Ableitungen aus einem anderen Neuron während der Injektion eines Strompulses von 540 pA.

Zur Bestimmung der Eigenschaften einzelner Aktionspotenziale wurden überschwellige Rechteckstimpulse in die Neurone injiziert und Amplitude, Dauer und Latenz des ersten Aktionspotenzials einer Entladung gemessen. Die Amplitude entspricht der Differenz zwischen dem Potenzialwert unmittelbar zu Beginn des Aktionspotenzials und seinem Amplitudenmaximum (Abb. 8A und D). Zur Analyse der Dauer wurde die erste Ableitung der Spannungsantwort gebildet (Abb. 8B und E). Die Dauer eines Aktionspotenzials entsprach der Differenz zwischen dem Maximum und dem Minimum der ersten Ableitung (Bean 2007). Die Latenz (Abb. 8C und F) ergab sich aus der zeitlichen Differenz zwischen Beginn der Stromapplikation und dem ersten Aktionspotenzial.

Die Werte der gemessenen Parameter werden in Kapitel 3.1.2.3 vergleichend dargestellt.

3.1.1.5 Entladungsverhalten

Neocorticale Pyramidenzellen werden als regulär entladende Zellen bezeichnet (McCormick et al. 1985). Darunter versteht man eine Abnahme der

Entladungsfrequenz (Adaptation) während der Auslösung einer Aktionspotenzialsalve durch depolarisierende Strompulse. Um das Entladungsverhalten zu ermitteln, wurden überschwellige Rechteckstrompulse (1 s Dauer) in die Neurone injiziert und die resultierenden Aktionspotenzialsalven registriert (Abb. 7B, Kap. 3.1.1.3). Zur Auswertung wurden die zeitlichen Abstände der Aktionspotenziale gemessen (Interspike-Intervall) und die entsprechende Frequenz berechnet. Die Frequenz wurde dann als Funktion der Nummer des Interspike-Intervalls aufgetragen.

Die Abbildung 9 zeigt das Frequenzverhalten von Pyramidenzellen der Schicht 2/3. In 23 Neuronen wurden die Frequenzkurven bei Injektion eines Strompulses von 270 pA (Abb. 9A) bestimmt, bei weiteren 15 Neuronen betrug die Stromstärke 360 pA (Abb. 9B).

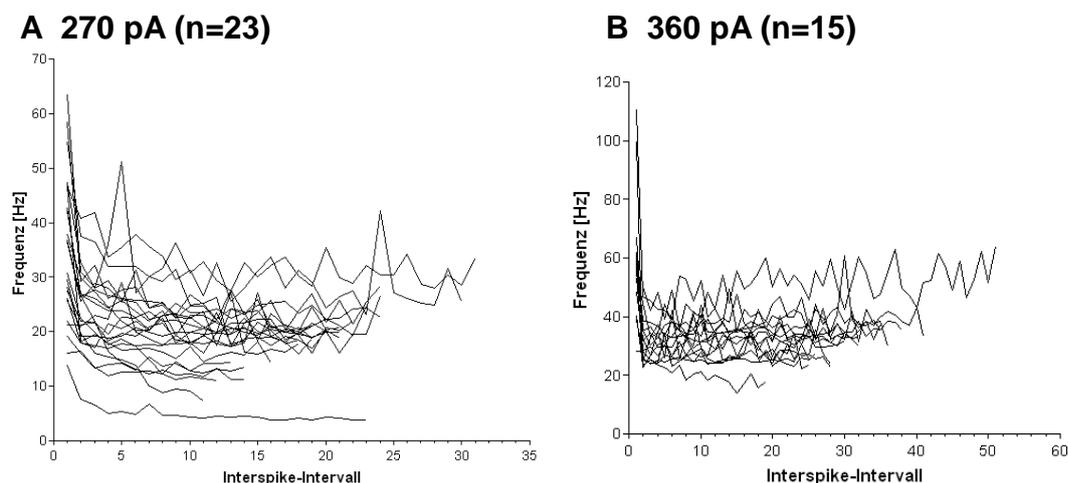


Abbildung 9: Frequenzadaptation von Neuronen in Schicht 2/3.

A Frequenzverhalten von 23 Neuronen bei Injektion von 270 pA. Die Abzisse gibt die Nummer des Interspike-Intervalls wieder.

B Frequenzverhalten von 15 Neuronen bei Injektion von 360 pA.

In beiden Fällen kommt es nach dem ersten Intervall zu einer deutlichen Frequenzabnahme.

Bei einer Injektion von 270 pA betrug die initiale Frequenz 35.2 ± 13.5 Hz und sank bereits im zweiten Intervall auf 24.1 ± 7.5 Hz. Die beiden Werte sind signifikant verschieden ($p < 0.0001$; verbundener, zweiseitiger t-Test). Bei einer Strominjektion von 360 pA betrug die initiale Frequenz 62.8 ± 27.8 Hz, die im zweiten Interspike-Intervall 32.9 ± 8.8 Hz. Auch hier ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0.0002$; verbundener, zweiseitiger t-Test).

Dies bedeutet, dass bereits nach dem ersten Interspike-Intervall eine Frequenzadaptation stattgefunden hat. Danach blieb die Frequenz bis zum Ende der

Strominjektion annähernd konstant. Die Frequenzabnahme betrug 11.6 ± 9.2 Hz (270 pA) bzw. 29.9 ± 23.4 Hz (360 pA). Vergleicht man diese beiden Werte mit einem unverbundenen, zweiseitigen t-Test, so sind sie signifikant unterschiedlich ($p = 0.0017$). Folglich ist das Ausmaß der Adaptation abhängig von der Amplitude des Strompulses.

Auch in den Neuronen der Schicht 5 fand sich eine deutliche Frequenzadaptation (Abb. 10). In dieser Schicht wurden bei 12 Neuronen das Frequenzverhalten bei einer Strominjektion von 540 pA und bei 16 Neuronen das Verhalten bei einer Stromstärke von 360 pA bestimmt.

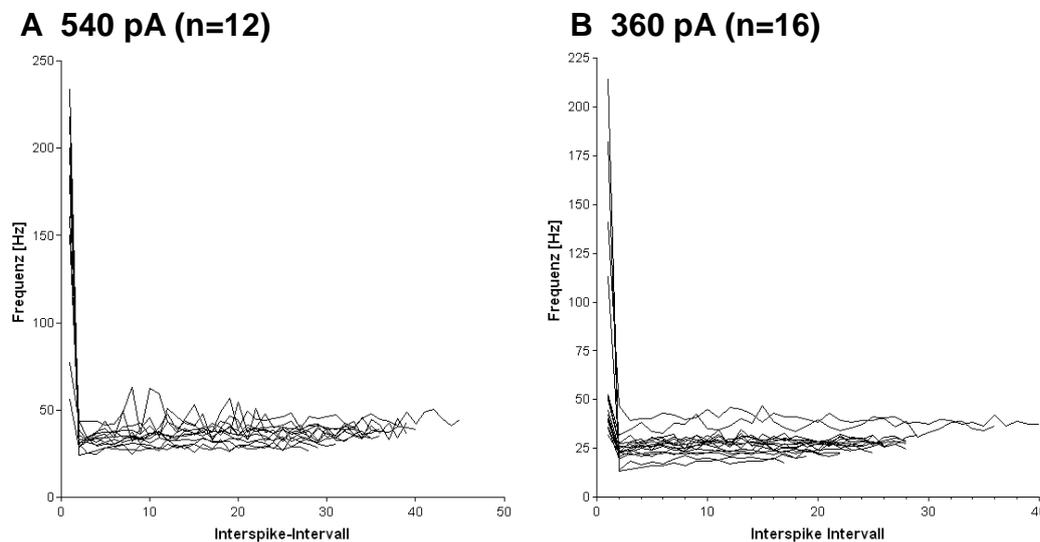


Abbildung 10: Frequenzadaptation von Neuronen in Schicht 5.

A Frequenzverhalten von 12 Neuronen bei Injektion von 540 pA. Die Abzisse gibt die Nummer des Interspike-Intervalls wieder.

B Frequenzverhalten von 16 Neuronen bei Injektion von 360 pA.

In beiden Fällen kommt es nach dem ersten Intervall zu einer deutlichen Frequenzabnahme.

Auch hier wurde wieder eine vergleichende Gegenüberstellung der Frequenzadaptation bei den verschiedenen Stromstärken vorgenommen. Bei einer Stromstärke von 360 pA ($n = 16$) konnte beim ersten Interspike-Intervall eine mittlere Frequenz von 72.0 ± 57.8 Hz, beim zweiten Intervall eine mittlere Frequenz von 24.3 ± 7.6 Hz bestimmt werden. Diese Werte waren signifikant voneinander verschieden ($p = 0.006$; verbundener, zweiseitiger t-Test). Bei einer Stromstärke von 540 pA ($n = 12$) betrug die initiale Frequenz 168.9 ± 54.8 Hz, die mittlere Frequenz im zweiten Interspike-Intervall lag bei 33.2 ± 6.2 Hz. Auch diese Werte unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0.0001$; verbundener, zweiseitiger t-Test). Betrachtet

man die Frequenzabnahme vom ersten auf das zweite Interspike-Intervall bei beiden Stromstärken, so ergibt sich hier ein signifikanter Unterschied (360 pA: 48.3 ± 60.1 Hz; 540 pA: 135.7 ± 57.6 pA; $p = 0.0006$; unverbundener, zweiseitiger t-Test). Folglich findet zwischen dem ersten und dem zweiten Interspike-Intervall bei beiden Stromstärken eine signifikante Abnahme der Frequenz statt. Zusätzlich hängt diese Frequenzabnahme noch von der applizierten Stromstärke ab.

3.1.2 Vergleich beider Pyramidenzellpopulationen

3.1.2.1 Passive Eigenschaften

Vergleicht man die beiden Neuronengruppen hinsichtlich ihrer passiven Eigenschaften ergibt sich folgendes Bild (Tab. 6): **(1)** das Membranpotenzial der Pyramidenzellen in Schicht 2/3 unterscheidet sich signifikant von dem der Neurone in Schicht 5. **(2)** Die Membraneingangswiderstände der Neurone beider Schichten unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander. **(3)** Die Zeitkonstanten der Neurone sind nicht signifikant verschieden.

Tabelle 6: Vergleich der passiven Eigenschaften von Pyramidenzellen in Schicht 2/3 und 5

	Schicht 2/3 (n = 175)	Schicht 5 (n = 60)
Mittleres Ruhemembranpotenzial RMP [mV] \pm SD	-70.0 ± 5.1	-67.3 ± 4.3 $p = 0.0003$ (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
Mittlerer Membraneingangswiderstand R_N [M Ω] \pm SD	147.0 ± 72.1	82.6 ± 46.9 $p < 0.0001$ (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
Mittlere Zeitkonstante τ [ms] \pm SD	18.8 ± 25.5	19.2 ± 11.8 n.s. (Schicht 2/3) ⁽¹⁾

Signifikanzniveau 5%; n.s. = nicht signifikant; ⁽¹⁾ unverbundener, zweiseitiger t-Test

Somit haben die morphologisch kleineren Pyramidenzellen in Schicht 2/3 ein höheres mittleres Membranpotenzial und einen höheren mittleren Membraneingangswiderstand als die morphologisch größeren Zellen in Schicht 5.

3.1.2.2 Strom-Spannungs-Kurve und Rektifikationsverhalten

Wie bereits erwähnt (Kap. 3.1.1.3 und Abb. 7), zeigten die Pyramidenzellen beider Schichten in ihrer Strom-Spannungs-Beziehung Rektifikation in hyper- und depolarisierender Richtung. Um Unterschiede zwischen den beiden Pyramidenzellpopulationen feststellen zu können, musste das Rektifikationsverhalten quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde an die Strom-Spannungs-Kurve, gemessen im Steady-State, ein Polynom 3. Grades angepasst. Wie aus Abbildung 11 zu ersehen ist, können die Strom-Spannungs-Beziehungen der Neurone mit diesen Polynomen gut beschrieben werden. Mit Hilfe dieser Kurven konnte nun ein Rektifikationskoeffizient (RR) ermittelt werden. Ein $RR = 1$ bedeutet, dass sich das Neuron unter den gegebenen Versuchsbedingungen wie ein Ohmscher Widerstand verhält.

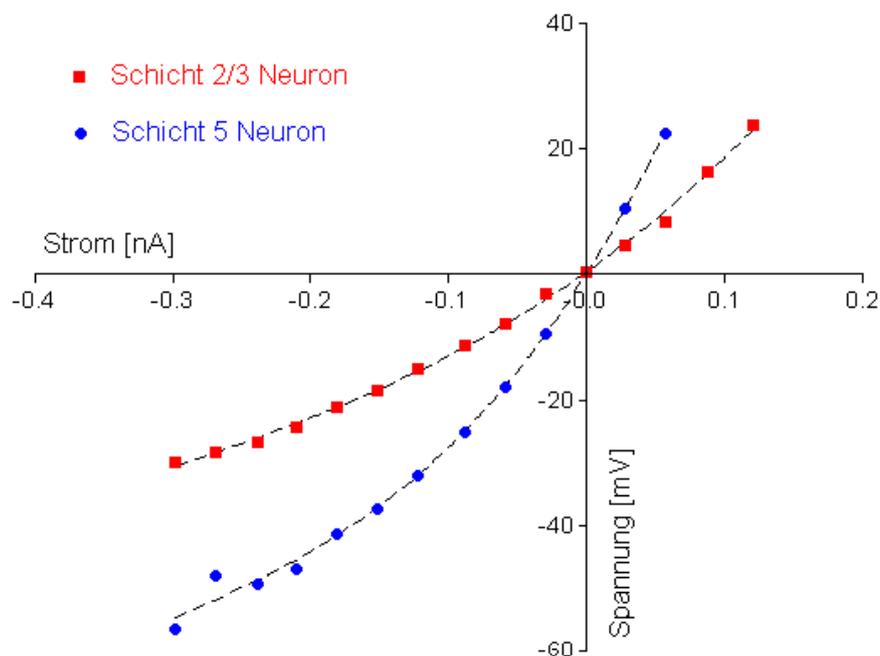


Abbildung 11: Bestimmung des Rektifikationskoeffizienten (RR) anhand einer Strom-Spannungskurve, gemessen in einer Pyramidenzelle der Schicht 2/3 und in einem Neuron der Schicht 5.

An die Punkte der Strom-Spannungs-Kurve wurde ein Polynom 3. Grades angepasst (gestrichelte Linien): $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$. Y_1 und Y_2 ergaben sich aus der Gleichung an den Punkten $X_1 = +0.05$ nA und $X_2 = -0.05$ nA. Zur Berechnung des Rektifikationskoeffizienten wurden die Beträge von Y_1 und Y_2 dividiert.

Bei $RR > 1$ liegt Einwärtsgleichrichtung vor (d.h. der Membranwiderstand ist für einwärtsgerichtete Ströme geringer als für auswärtsgerichtete Ströme), bei $RR < 1$ liegt Auswärtsgleichrichtung vor.

Zur Bestimmung des RR wurden bei den Stromstärken -0.05 nA und $+0.05$ nA die Funktionswerte des Polynoms berechnet. Der Rektifikationskoeffizient entspricht dem

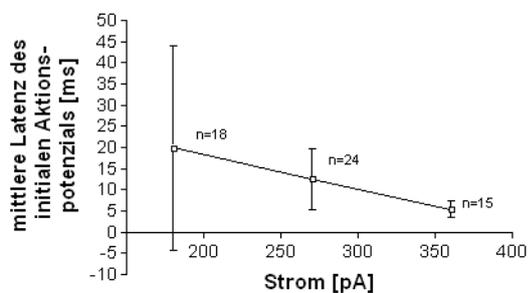
$$\text{Quotienten } RR = \left| \frac{Y_1}{Y_2} \right|.$$

In 27 Neuronen der Schicht 2/3 ergab sich ein mittlerer RR von 1.27 ± 0.22 , in 27 Pyramidenzellen der Schicht 5 ein mittlerer RR von 1.22 ± 0.19 . Die Neurone beider Populationen verhalten sich also einwärtsgleichrichtend. Die Rektifikationskoeffizienten der beiden Zellpopulationen erwiesen sich als nicht signifikant unterschiedlich voneinander (unverbundener, zweiseitiger t-Test).

3.1.2.3 Amplitude, Dauer und Latenz des initialen Aktionspotenzials

Die Aktionspotenziale in den Pyramidenzellen der Schicht 2/3 unterschieden sich hinsichtlich Amplitude und Dauer nicht von denen der Schicht 5. In Schicht 5 - Pyramidenzellen ($n = 16$) fand sich eine mittlere Amplitude von 73.3 ± 9.7 mV und eine mittlere Dauer von 0.81 ± 0.14 ms.

A Schicht 2/3



B Schicht 5

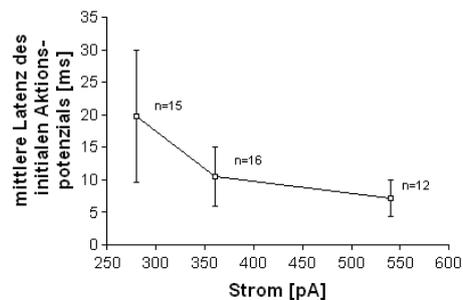


Abbildung 12: Latenzabnahme des initialen Aktionspotenzials in Neuronen beider Schichten bei steigenden Stromstärken

A Schicht 2/3: Gemessen wurde die Latenz bei 180 pA ($n = 18$), bei 270 pA ($n = 24$) und bei 360 pA ($n = 15$).

B Schicht 5: Gemessen wurde die Latenz bei 280 pA ($n = 15$), bei 360 pA ($n = 16$) und bei 540 pA ($n = 12$).

Die Aktionspotenziale der Zellen in Schicht 2/3 ($n = 15$) hatten eine mittlere Amplitude von 77.8 ± 12.4 mV und eine mittlere Dauer von 0.92 ± 0.17 ms. Der statistische Vergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Neocortexschichten (unverbundener, zweiseitiger t-Test).

Bezüglich der Latenz des ersten Aktionspotenzials zu Beginn einer Strominjektion konnte in den Neuronen beider Schichten eine Abnahme der Latenz bei Zunahme der Stromstärke festgestellt werden (Abb. 12).

In Schicht 2/3 wurde bei 18 Neuronen bei 180 pA eine mittlere initiale Latenz von 19.9 ± 24.2 ms, bei 270 pA ($n = 24$) eine mittlere initiale Latenz von 12.5 ± 7.3 ms und bei 360 pA ($n = 15$) eine Latenz von 5.4 ± 2.0 ms gemessen. Durch die statistische Auswertung mit dem One-way ANOVA (und Bonferroni Post-Tests) konnte nur bei den Latenzen zwischen 360 pA und 180 pA ein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p < 0.05$).

Ebenso wurde in Schicht 5 - Neuronen bei drei verschiedenen Stromstärken die mittlere Latenz bestimmt: 280 pA ($n = 15$) mit 19.7 ± 10.2 ms, 360 pA ($n = 16$) mit 10.5 ± 4.5 ms und 540 pA ($n = 12$) mit 7.2 ± 2.8 ms. In diesem Fall waren die Latenzwerte bei einer Stromstärke von 360 pA und 280 pA als auch bei 540 pA und 280 pA signifikant unterschiedlich, nicht aber die bei 540 pA und 360 pA (One-way ANOVA und Bonferroni Post-Tests).

Vergleicht man die Neurone der Schichten 2/3 und 5 untereinander bei der selben Stromstärke von 360 pA, so sind die Latenzen signifikant voneinander unterschiedlich ($p = 0.0003$; unverbundener, zweiseitiger t-Test). Dies beruht höchstwahrscheinlich auf dem höheren Membraneingangswiderstand der Pyramidenzellen in Schicht 2/3.

3.1.2.4 Frequenzverhalten

In Abbildung 13 wird das Frequenzverhalten von Aktionspotenzialsalven der Neurone beider Schichten verglichen. In Rot sind die Frequenzen der Schicht 2/3 ($n = 46$), in Blau die der Schicht 5 ($n = 28$) dargestellt. Aufgetragen wurde die Frequenz (Hz) in Abhängigkeit vom injizierten Strom (pA). In jedem Neuron wurden jeweils 3 Messungen bei unterschiedlichen Stromstärken gemacht. Die geraden Linien stellen lineare Regressionen der Messwerte dar. Die durchgezogenen Linien zeigen den Frequenzverlauf im initialen Bereich (50 - 200 ms nach Beginn der Strominjektion), die gestrichelten Linien den im Steady State.

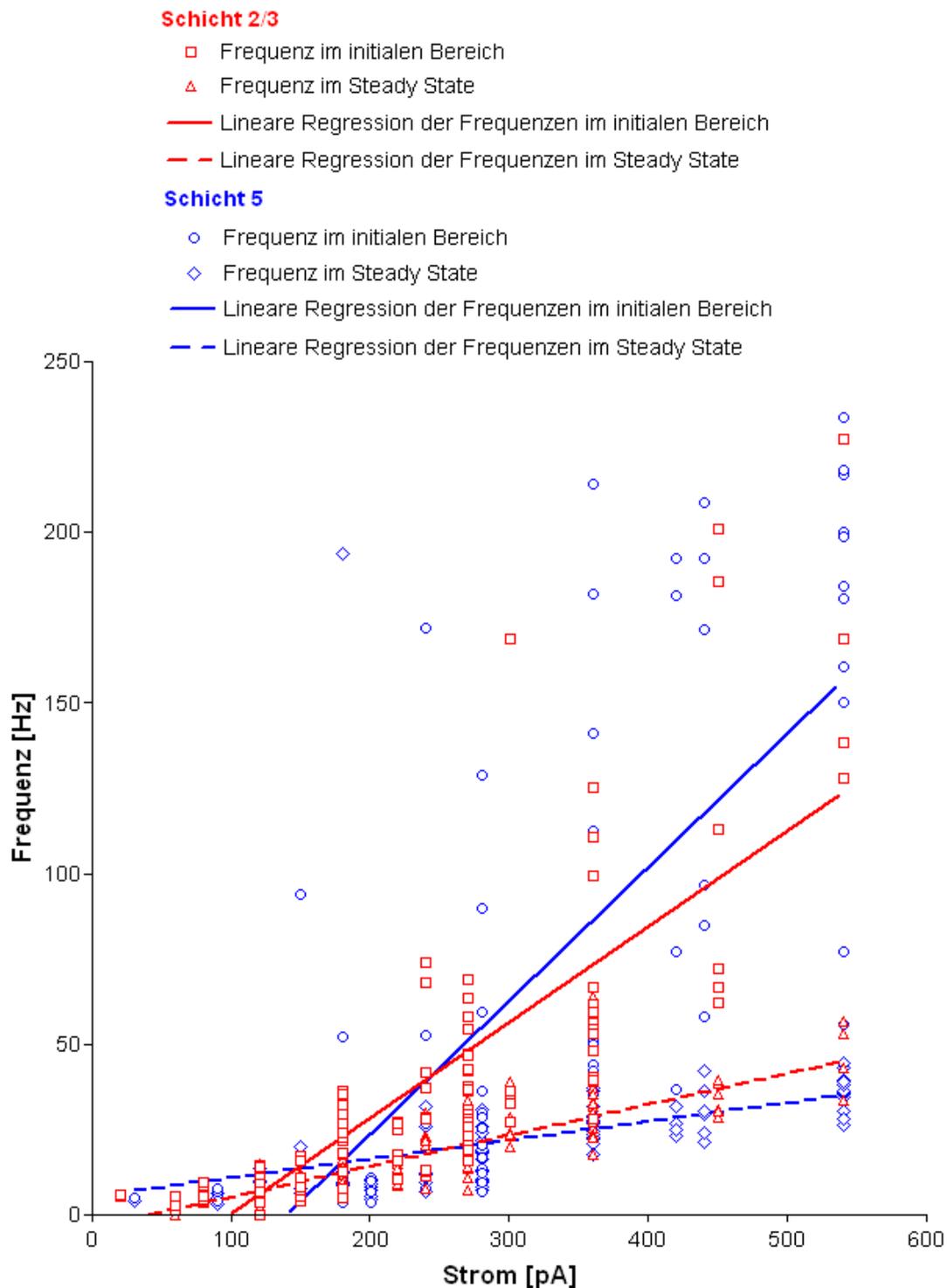


Abbildung 13: Vergleich des Frequenzverhaltens von Aktionspotenzialsalven nach Injektion von überschwelligen Strompulsen.

Schicht 2/3 (rot): Dargestellt sind 3 Messungen pro Neuron ($n = 46$), jeweils im initialen Bereich und im Steady State bei verschiedenen Stromstärken. Bei insgesamt 9 Neuronen wurde im initialen Bereich eine Frequenz > 100 Hz erreicht, das entspricht 20 % der gemessenen Pyramidenzellen in Schicht 2/3.

Schicht 5 (blau): Dargestellt sind 3 Messungen pro Neuron ($n = 28$), jeweils im initialen Bereich und im Steady State bei verschiedenen Stromstärken. Bei insgesamt 14 Neuronen wurde im initialen Bereich eine Frequenz > 100 Hz erreicht, das entspricht 50 % der gemessenen Pyramidenzellen in Schicht 5.

Hier lässt sich folgendes erkennen: **(1)** mit zunehmenden Strom nimmt sowohl die initiale als auch die Steady State - Frequenz zu, **(2)** die Neurone in Schicht 2/3 entladen überwiegend mit Frequenzen im Bereich unter 100 Hz. Nur 20 % dieser Neurone zeigten Frequenzen größer 100 Hz. Dagegen haben 50 % der registrierten Schicht 5 - Pyramidenzellen Frequenzen größer als 100 Hz und **(3)** die Steigungen der Geraden im initialen Bereich sind steiler als die der Geraden im Steady State. Dies deutet wiederum auf Frequenzadaptation hin.

Stellt man das Frequenzverhalten von Neuronen beider Schichten bei gleicher injizierter Stromstärke dar (Abb. 14), dann findet man, dass die Frequenzen des Interspike-Intervalls 1 von Schicht 2/3 - Neuronen (62.8 ± 27.8 Hz, $n = 15$; 360 pA) und die des gleichen Intervalls von Schicht 5 - Neuronen (72.0 ± 57.8 Hz, $n = 16$; 360 pA) nicht signifikant verschieden sind (unverbundener, zweiseitiger t-Test).

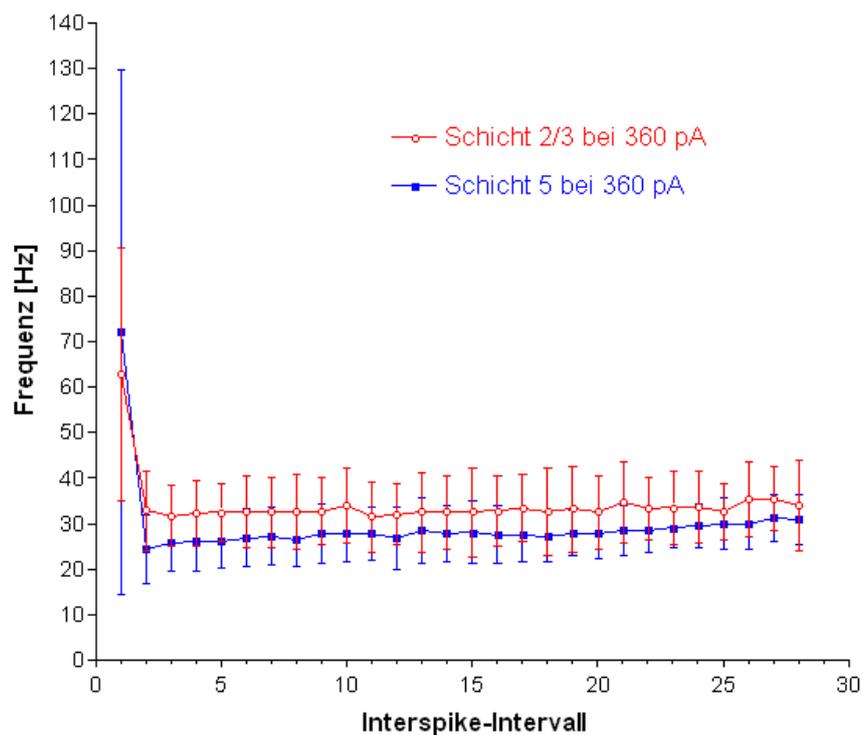


Abbildung 14: Vergleich der Frequenzadaptation in Schicht 2/3 - und Schicht 5 - Neuronen bei 360 pA

Dargestellt sind die Mittelwerte der Frequenzen zu den verschiedenen Interspike-Intervallen bei 360 pA Stromapplikation in beiden Schichten (\pm SD). Schicht 2/3 mit Mittelwerten aus 15 Neuronen, Schicht 5 mit Mittelwerten aus 16 Pyramidenzellen.

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Frequenzen des zweiten Interspike-Intervalls signifikant voneinander (Schicht 2/3: 32.9 ± 8.8 Hz, Schicht 5: 24.3 ± 7.6 Hz; $p = 0.007$; unverbundener, zweiseitiger t-Test). Die Frequenzabnahme von dem ersten auf das zweite Interspike-Intervall ist in den Neuronen der beiden Schichten

nicht signifikant voneinander verschieden (Schicht 2/3: 29.9 ± 23.4 Hz; Schicht 5: 48.3 ± 60.1 Hz; unverbundener, zweiseitiger t-Test).

Somit ergibt sich letztendlich, dass sich die Pyramidenzellen in den beiden Schichten bezüglich ihrer initialen Frequenzen kaum unterscheiden. Neurone der Schicht 5 feuern ab dem zweiten Interspike-Intervall und im Steady State aber langsamer. Der in Abbildung 13 dargestellte Unterschied ergibt sich hauptsächlich daraus, dass in Neuronen der Schicht 5 insgesamt bei höheren Stromstärken gemessen wurde.

3.2 Wirkung der Aktivierung von nAChR auf Pyramidenzellen

Um die Aktivierung von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren zu verhindern, wurde bei diesen Experimenten der Badlösung immer der muskarinische Antagonist Atropin (1 μM) zugesetzt.

3.2.1 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3

3.2.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

In diesen Versuchen wurden die ACh-induzierten Effekte auf Pyramidenzellen im Voltage-Clamp-Modus bei einem Haltepotenzial von -70 mV gemessen. Nach Etablierung der Spannungsklemme wurde die ACh-gefüllte Applikationspipette mittels eines Mikromanipulators unter visueller Kontrolle bis auf ca. 10 μm an die abgeleitete Pyramidenzelle herangefahren. Die Abbildung 15A zeigt beispielhaft Messungen, bei denen die Dosisabhängigkeit der zellulären Antwort ermittelt wurde. Da während eines Versuches die ACh-Konzentration in der Pipette konstant war (im gezeigten Beispiel 50 μM), wurde die „Dosis“ (= Menge) an ACh durch Variation der Applikationsdauer und/oder der Anzahl der Applikationspulse verändert. Der angelegte Druck betrug immer 700 mbar. Wie aus der Abbildung 15A zu ersehen ist, kam es nach ACh-Applikation zu einem langsam verlaufenden Einwärtsstrom, dem unter den gegebenen Versuchsbedingungen (d.h. in Abwesenheit weiterer Rezeptorantagonisten) manchmal schnellere Einwärtsströme überlagert waren.

Zur Quantifizierung wurde die Maximalamplitude und die Fläche des ACh-induzierten Stromes gemessen. Abbildung 15B stellt die Dosis-Wirkungs-Beziehung des in Abbildung 15A gezeigten Neurons dar. Deutlich zu erkennen ist eine dosisabhängige Zunahme von Amplitude und Fläche, wobei die Amplitude ihr Maximum bei geringeren Dosen erreicht als die Fläche.

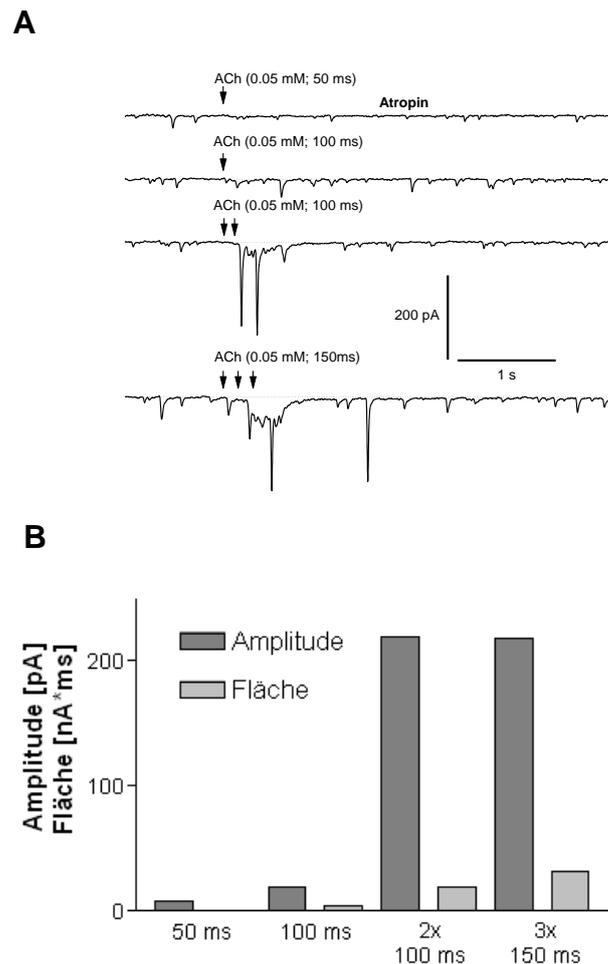


Abbildung 15: ACh-induzierte Antworten einer Pyramidenzelle in Neocortexschicht 2/3.

Lokale Applikation von Acetylcholin (50 μ M; 700 mbar) in Gegenwart von 1 μ M Atropin

A Voltage-Clamp-Messung des Neurons (Haltepotenzial: -70 mV) bei Applikation von Acetylcholin mit verschiedenen Pulsdauern (1x50 ms bis 3x150 ms). Die Applikationszeitpunkte werden durch die Pfeile angezeigt. Die dargestellten Ströme repräsentieren Mittelwerte aus drei aufeinander folgenden Messungen unter gleichen Bedingungen.

B Darstellung der Stromamplituden und -flächen in Abhängigkeit von der Dosis (siehe Text). Die Amplitude wurde als positiver Strom aufgezeichnet.

In diesen Vorversuchen stellte sich heraus, dass man mit einer höheren ACh-Konzentration in der Pipette (0.5 mM statt 50 μ M) stabilere Antworten erhält. Zudem waren bei dieser höheren Konzentration repetitive Doppel- und Dreifachpulse nicht notwendig. In den folgenden Experimenten wurden also Einzelpulse verwendet; Dosisveränderungen wurden durch Variation der Pulsdauer vorgenommen (Abb. 17, Kap 3.2.1.3).

3.2.1.2 ACh-Sensitivität

Bei 104 von 175 registrierten Neuronen der Schicht 2/3 war es möglich, vier bis fünf ACh-Applikationen vorzunehmen, um die Sensitivität der Neurone gegenüber Aktivierung von nAChR zu untersuchen. Von den 104 Pyramidenzellen zeigten 79 Neurone (= 75%) einen Einwärtsstrom als Antwort auf die ACh-Applikation, bei 25 Zellen (= 25%) konnte keine Reaktion beobachtet werden.

Tabelle 7: Passive Eigenschaften der Neurone mit und ohne Antwort nach ACh-Applikation in Schicht 2/3

	Anzahl	Mittleres Ruhemembranpotenzial RMP [mV] ± SD	Mittlerer Membraneingangswiderstand R_N [MΩ] ± SD	Mittlere Zeitkonstante τ [ms] ± SD
Neurone insgesamt	104	-69.8 ± 5.2	142.5 ± 64.4	19.6 ± 14.3
Neurone mit Antwort	79 (75%)	-69.0 ± 5.1	131.1 ± 61.6	18.9 ± 14.4
Neurone ohne Antwort	25 (25%)	-72.1 ± 5.1	178.5 ± 60.9	21.6 ± 13.8
		p = 0.0099 (Neurone mit Antwort) ⁽¹⁾	p = 0.0011 (Neurone mit Antwort) ⁽¹⁾	n.s. (Neurone mit Antwort) ⁽¹⁾

Signifikanzniveau 5%; **n.s.** = nicht signifikant; ⁽¹⁾ unverbundener, zweiseitiger t-Test

Hier stellte sich nun die Frage, ob sich die sensitiven Pyramidenzellen (Neurone mit Antwort) von den nicht-sensitiven (Neurone ohne Antwort) auch in anderer Hinsicht unterscheiden. Deshalb wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser beiden Populationen miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die nicht-sensitiven Pyramidenzellen ein signifikant negativeres Ruhemembranpotenzial und einen signifikant höheren Eingangswiderstand aufwiesen (Tab. 7).

Außerdem fand sich ein Unterschied im Aktionspotenzial-Entladungsverhalten (Abb. 16). Bei Injektion überschwelliger depolarisierender Strompulse löste man in den Pyramidenzellen Aktionspotenzialsalven aus, die eine Frequenzadaptation aufwiesen (siehe Abb. 16).

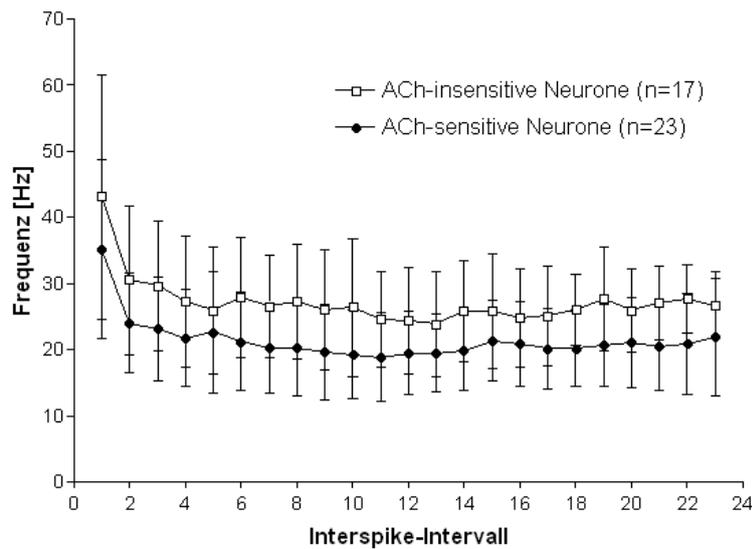


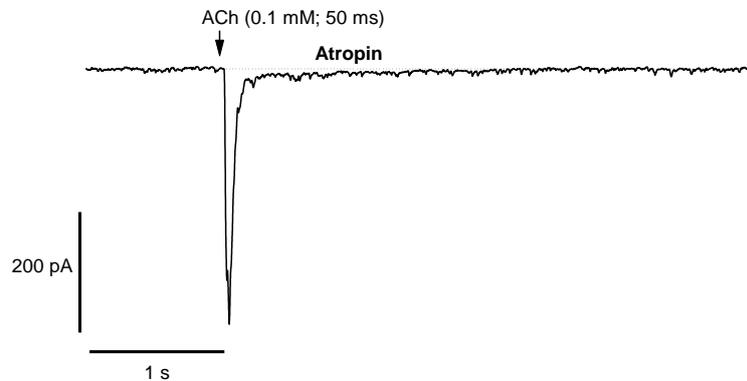
Abbildung 16: Vergleich der Frequenzadaptation in ACh-sensitiven und nicht-sensitiven Pyramidenzellen der Schicht 2/3. In allen Neuronen wurde das Entladungsverhalten durch Injektion eines depolarisierenden Strompulses (1 s, 270 pA) untersucht. Das Diagramm zeigt die Frequenz in Abhängigkeit vom Interspike-Intervall. Quadrate: ACh-insensitive Neurone (n=17), Kreise: ACh-sensitive Neurone (n=23). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SD.

Vergleicht man die Frequenz (Stromstärke: 270 pA) des ersten Interspike-Intervall (ISI) der nicht-sensitiven Neurone (43.1 ± 18.5 Hz, n=17) mit dem der sensitiven Zellen (35.2 ± 13.5 Hz, n=23), dann findet man in der ersten Gruppe einen höheren Wert, der sich aber nicht signifikant von dem der zweiten Gruppe unterscheidet. Die Analyse des zweiten und des zehnten Interspike-Intervalls ergab einen signifikanten Unterschied der Frequenzen: Die nicht-sensitiven Neurone wiesen höhere Frequenzen auf als die sensitiven Zellen (2. ISI: nicht-sensitiv: 30.5 ± 11.3 Hz, n=17; sensitiv: 24.1 ± 7.5 Hz, n=23; $p=0.0356$, unverbundener, zweiseitiger t-Test; 10. ISI: nicht-sensitiv: 26.4 ± 10.4 Hz, n=16; sensitiv: 19.3 ± 6.7 Hz, n=23; $p=0.0128$, unverbundener, zweiseitiger t-Test).

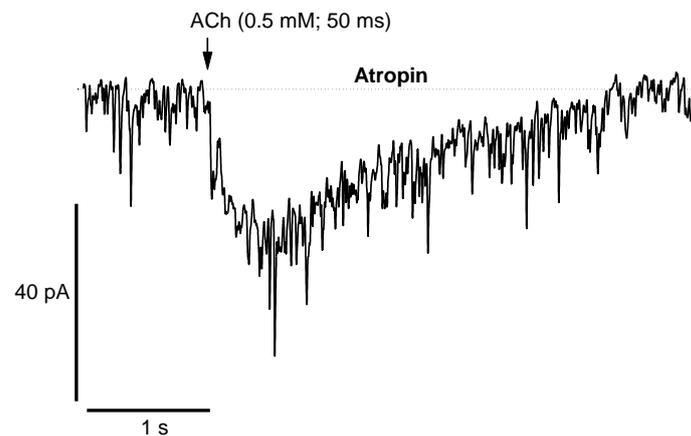
Bei allen weiteren erfassten elektrophysiologischen Eigenschaften (Membranzeitkonstante, Rektifikationsverhalten, Eigenschaften des Aktionspotenzials) fanden sich zwischen den ACh-sensitiven und -insensitiven Neuronen keine signifikanten Unterschiede.

3.2.1.3 Antworttypen

A schnelle Antwort



B langsame Antwort



C schnelle und langsame Antwort

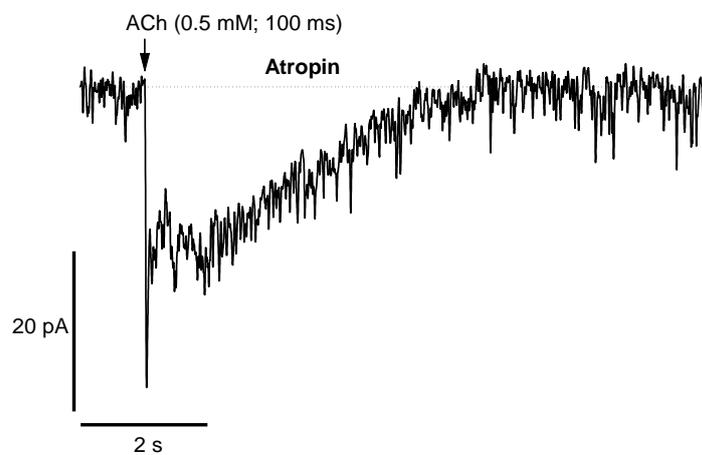


Abbildung 17: Antwortverhalten der Pyramidenzellen in Schicht 2/3 bei Applikation von Acetylcholin (ACh) in Gegenwart von Atropin (1 μ M)

Die Stromkurven repräsentieren jeweils Mittelungen von 5 aufeinander folgenden Messungen im selben Neuron unter gleichen Bedingungen. Voltage-Clamp-Ableitungen bei einem Haltepotenzial von -70 mV.

Von den 79 ACh-sensitiven Pyramidenzellen wurden 36 Zellen zur Charakterisierung der Agonist-induzierten Antworten ausgewählt. Kriterien der Auswahl waren: **(1)** über längere Zeit (> zwei Stunden) stabile Patch-Clamp-Konditionen, **(2)** über längere Zeit (> 2 Stunden) stabile ACh-induzierte Einwärtsströme während des Experiments (kein „Run-Down“ der Ströme bei ansonsten unveränderten Bedingungen), und **(3)** quantitativ auswertbare Amplituden und Flächen (d.h. gutes Signal-Rausch-Verhältnis).

Bei den 36 untersuchten Neuronen der Schicht 2/3 wurde eine mittlere Amplitude von -48.6 ± 33.2 pA und eine mittlere Fläche von 27.2 ± 20.6 nA*ms gemessen. Die Amplituden variierten zwischen -157.1 pA und -11.3 pA, die Fläche zwischen 0.5 nA*ms und 104.3 nA*ms (Tab. 8, Kap. 3.2.3).

Unter den ausgewählten Pyramidenzellen fanden sich drei Populationen mit unterschiedlichem Antwortverhalten: 15 (42%) Neurone reagierten auf ACh-Applikation mit einem kurzdauernden, schnellen Einwärtsstrom (Abb. 17A, schnelle Antwort), neun (25 %) mit einem langsamen Strom (Abb. 17B, langsame Antwort) und 12 (33 %) Zellen mit beidem, einer schnellen und einer langsamen Stromkomponente (Abb. 17C, schnelle und langsame Antwort). Die mittlere Amplitude der schnellen Einwärtsströme betrug -62.1 ± 41.3 pA, ihre mittlere Fläche 27.2 ± 27.9 nA*ms. Die entsprechenden Werte für die langsamen Ströme waren -27.5 ± 11.8 pA bzw. 24.0 ± 11.5 nA*ms. Für die kombinierten Stromantworten ergab sich für die Amplitude der schnellen Komponente ein Mittelwert von -47.5 ± 25.1 pA und eine mittlere Fläche von 29.4 ± 15.6 nA*ms (Tab. 9, Kap. 3.2.3). Vergleicht man die Werte untereinander, dann stellt man fest, dass sich nur die Amplituden der schnellen und der langsamen Stromantworten statistisch signifikant unterscheiden ($p < 0.01$, One-way ANOVA mit Bonferronis Post-Tests).

3.2.2 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5

3.2.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung in Schicht 5 - Pyramidenzellen wurde auf die gleiche Weise wie in Neuronen der Schicht 2/3 ermittelt. Die Abbildung 18A zeigt ein Beispiel einer solchen Messung.

Aus der Abbildung 18B ist zu ersehen, dass sowohl die Amplitude des ACh-induzierten Stromes als auch seine Fläche mit Zunahme der Pulsdauer (d.h. der Dosis) angewachsen ist.

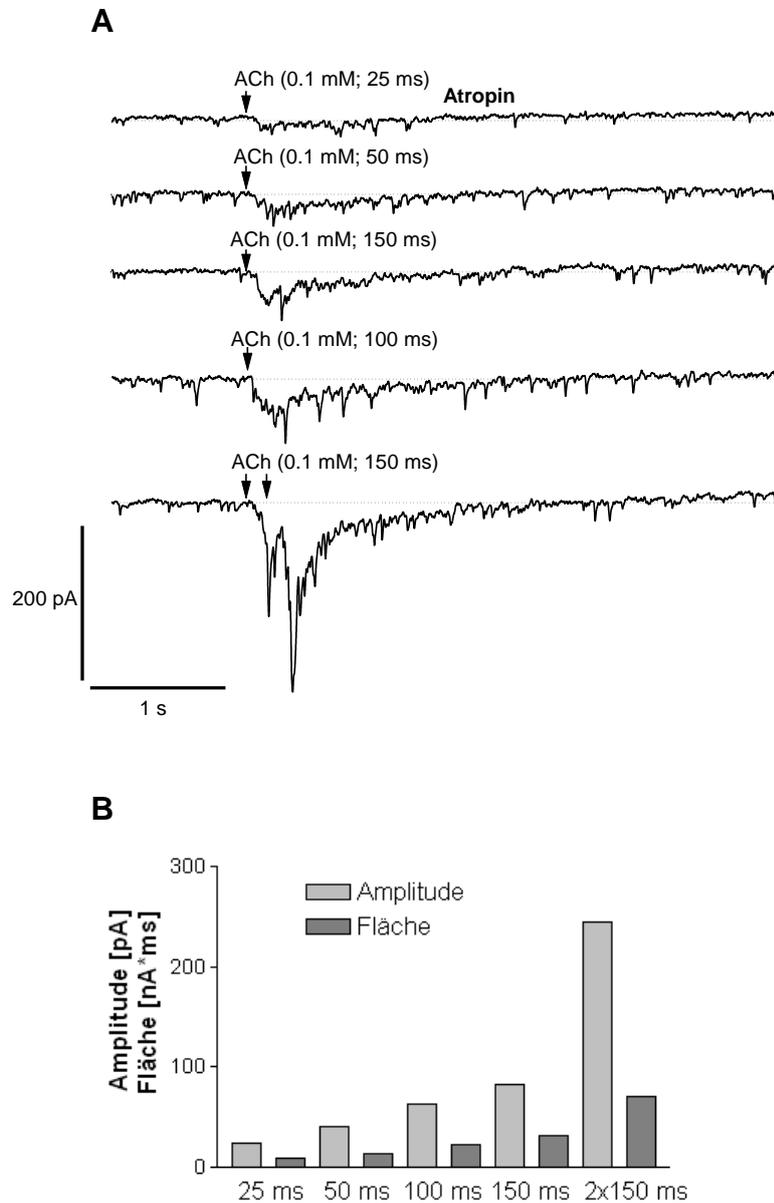


Abbildung 18: Antwortverhalten einer Pyramidenzelle in Schicht 5 auf die lokale Applikation von Acetylcholin (100 μM ; 700 mbar) in Gegenwart von 1 μM Atropin

A Voltage-Clamp-Messung eines Neurons bei Applikation von Acetylcholin mit verschieden andauernden Druckpulsen (25 ms bis 2 x 150 ms). Die einzelnen Spuren stellen Mittelungen aus jeweils drei aufeinander folgenden Messungen unter gleichen Bedingungen dar. Das Haltepotenzial betrug -70 mV.

B Amplituden- und Flächenänderung der Stromantwort in Abhängigkeit von der Pulsdauer. Die Amplitude ist als positiver Strom aufgezeichnet.

3.2.2.2 ACh-Sensitivität

Insgesamt wurde bei 35 Neuronen der Schicht 5 eine ACh-Applikation durchgeführt. Nur in einer dieser Pyramidenzellen konnte kein ACh-induzierter Membranstrom beobachtet werden. Somit ergibt sich hier bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den Pyramidenzellen der Schicht 2/3 und Schicht 5 bezüglich ihrer ACh-Sensitivität. Während nahezu alle untersuchten Neurone der Lamina 5 auf ACh-Applikation mit einem Einwärtsstrom reagierten, konnte man in der Schicht 2/3 bei 25% der getesteten Zellen keine Antwort beobachten.

3.2.2.3 Antworttypen

Zur weiteren Charakterisierung der ACh-induzierten Membranströme in Schicht 5 - Pyramidenzellen wurden 21 Neurone ausgewählt. Die Selektionskriterien waren die gleichen wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben. Vier der 21 Neurone (= 19 %) reagierten auf ACh-Applikation mit einem langsamen Membraneinwärtsstrom (Typ II – Strom nach Alkondon und Albuquerque 1993, Abb. 19A), 14 Zellen (= 67 %) mit einem schnellen und einem darauffolgendem langsamen Strom (Typ IB – Strom, Abb. 19B) und drei der 21 Neurone (= 14 %) nur mit einer schnellen Stromantwort (Typ IA – Strom, Abb. 19 C).

Bei den 21 untersuchten Neuronen der Schicht 5 wurde eine mittlere Amplitude von -113.8 ± 109.7 pA und eine mittlere Fläche von 44.2 ± 45.0 nA*ms gemessen. Die Amplituden variierten zwischen -431.4 pA und -22.4 pA, die Fläche zwischen 11.2 nA*ms und 207.6 nA*ms (Tab. 8, Kap. 3.2.3).

Unterteilt man die Neurone bezüglich ihrer Antwortverhalten, so ergibt sich folgendes Bild: **(1)** die Membranströme der drei Neurone mit der schnellen Antwort hatten eine mittlere Amplitude von -107.6 ± 59.4 pA und eine mittlere Fläche von 92.0 ± 100.2 nA*ms, **(2)** die der 14 Pyramidenzellen mit einer schnellen und einer langsamen Antwort wiesen eine mittlere Amplitude von -139.0 ± 123.0 pA und eine mittlere Fläche von 40.4 ± 29.1 nA*ms auf und **(3)** die der vier Zellen mit einer langsamen Antwort hatten eine mittlere Amplitude von -30.5 ± 6.6 pA und eine mittlere Fläche von 21.5 ± 7.9 nA*ms (Tab. 9, Kap. 3.2.3).

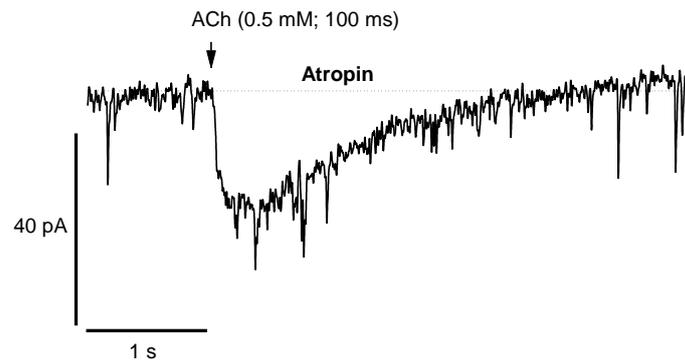
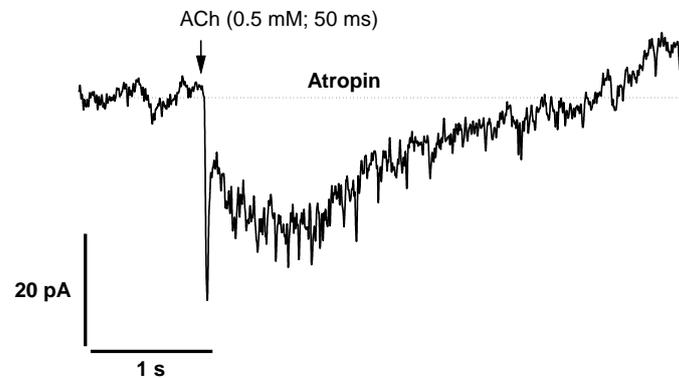
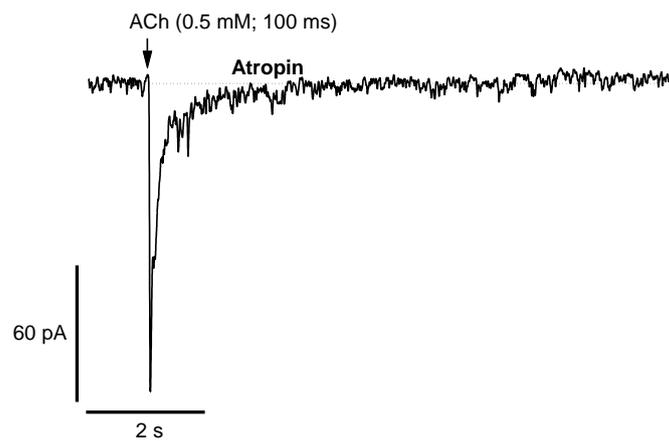
A langsame Antwort**B schnelle und langsame Antwort****C schnelle Antwort**

Abbildung 19: Antwortverhalten von Pyramidenzellen in Schicht 5 bei Applikation von Acetylcholin (ACh) in Gegenwart von Atropin (1 μ M).

Die jeweiligen Spuren repräsentieren Mittelungen aus 5 aufeinander folgenden Messungen im selben Neuron unter gleichen Bedingungen. Voltage-Clamp-Messungen bei einem Haltepotenzial von -70 mV.

Vergleicht man die Gruppen mit Hilfe des One-Way ANOVA (mit Bonferronis Post-Tests) untereinander, so zeigt sich, dass sich die Amplitudenmittelwerte der schnellen Antwort von der langsamen und die der schnellen und langsamen Antwort von der langsamen signifikant voneinander unterscheiden. Die Signifikanzniveaus liegen bei $p < 0.05$ für Ersteres und $p < 0.01$ für Letzteres. Für die Mittelwerte der Flächen erwiesen sich nur der der schnellen Antwort, verglichen mit der langsamen, als signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$).

3.2.3 Vergleichende Gegenüberstellung der Wirkungen von ACh auf Pyramidenzellen der Schichten 2/3 und 5

Der auffälligste Unterschied zwischen den Pyramidenzellen der Schichten 2/3 und 5 ist die geringere Sensitivität der oberflächlichen Neurone. Ein Viertel der untersuchten Zellen in diesem Bereich haben nicht auf die Applikation von ACh reagiert. Vergleicht man zudem die Amplituden der ACh-induzierten Membranströme, dann findet man einen signifikanten Unterschied ($p = 0.0015$) zwischen den Neuronen beider Schichten (Tab. 8). Die Flächen der Ströme variierten sehr stark, so dass sich keine Signifikanz ergab, obwohl der Mittelwert für Neurone der Schicht 5 fast doppelt so groß war wie der in Schicht 2/3 - Neuronen (Tab. 8).

Tabelle 8: ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schichten 2/3 und 5

	Schicht 2/3	Schicht 5
Anzahl der Neurone	n = 36	n = 21
Mittlere Amplitude [pA] ± SD	-48.6 ± 33.2	-113.8 ± 109.7
		p = 0.0015 (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
Mittlere Fläche [nA*ms] ± SD	27.2 ± 20.6	44.2 ± 45.0
		n.s. (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
Maximale Amplitude [pA]	-157.1	-431.4
Minimale Amplitude [pA]	-11.3	-22.4
Maximale Fläche [nA*ms]	104.3	207.6
Minimale Fläche [nA*ms]	0.5	11.2

Signifikanzniveau 5%; **n.s.** = nicht signifikant; ⁽¹⁾ unverbundener, zweiseitiger t-Test

Die Amplituden der Membranströme, die durch die ACh-Applikation in Schicht 5 Pyramidenzellen hervorgerufen wurden, waren also – unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen – mehr als doppelt so groß als die der Schicht 2/3 - Neurone. Die Verteilung der verschiedenen Stromtypen (Typ IA, Typ IB, Typ II) auf die Neuronenpopulation war in der Schicht 2/3 homogener als in Schicht 5. In der tiefen Schicht überwog der Typ IB (Kombination aus langsamer und schneller Komponente, 14 von 21, ca. 67 %), während der Typ IA und der Typ II in weniger als 20 % der Zellen zu beobachten war (Typ IA: 3 von 21, ca. 14 %; Typ II: 4 von 21, ca. 19 %). In den Neuronen der Schicht 2/3 war der Typ IA-Strom (nur schnelle Komponente) am häufigsten (15 von 36, ca. 42 %). Der Typ IB-Strom war in 12 (von 36, ca. 33 %) und der Typ II-Strom in neun (von 36, 25 %) Zellen zu finden (Tab. 9)

Tabelle 9: Vergleich der Amplituden und Flächen der verschiedenen Antwortformen in Pyramidenzellen der Schicht 2/3 und 5

	Schicht 2/3	Schicht 5
Schnelle Antwort (Typ IA)	n = 15	n = 3
- Amplitude [pA] ± SD	-62.1 ± 41.3	-107.6 ± 59.4 n.s. (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
- Fläche [nA*ms] ± SD	27.2 ± 27.9	92.0 ± 100.2 P = 0.0335 (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
Schnelle und langsame Antwort (Typ IB)	n = 12	n = 14
- Amplitude [pA] ± SD	-47.5 ± 25.1	-139.0 ± 123.0 P = 0.0186 (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
- Fläche [nA*ms] ± SD	29.4 ± 15.6	40.4 ± 29.1 n.s. (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
Langsame Antwort (Typ II)	n = 9	n = 4
- Amplitude [pA] ± SD	-27.5 ± 11.8	-30.5 ± 6.6 n.s. (Schicht 2/3) ⁽¹⁾
- Fläche [nA*ms] ± SD	24.0 ± 11.5	21.5 ± 7.9 n.s. (Schicht 2/3) ⁽¹⁾

Signifikanzniveau 5%; n.s. = nicht signifikant; ⁽¹⁾ unverbundener, zweiseitiger t-Test

Vergleicht man Amplitude und Fläche der Stromtypen, gemessen in Neuronen der beiden Schichten, dann stellt man fest, dass sich die Typ IA-Ströme nur bezüglich der Fläche signifikant voneinander unterscheiden. Bei den Typ IB-Strömen findet man einen solchen Unterschied nur bei den Amplituden. Die langsamen Typ II-Ströme sind in den Neuronen der beiden Schichten gleich (Tab. 9).

3.3 Wirkung von ACh nach pharmakologischer synaptischer Isolation der Neurone

3.3.1 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3

3.3.1.1 Hemmung der glutamatergen und GABAergen Signalübertragung

Um zu bestimmen, ob es sich bei den durch ACh hervorgerufenen Membranströmen um postsynaptisch oder präsynaptisch vermittelte Ströme handelte, wurden die Neurone durch verschiedene Rezeptorantagonisten bzw. Kanalblocker synaptisch isoliert. Diese Untersuchungen beruhten auf der Annahme, dass in den neocorticalen Pyramidenzellen der größte Teil der erregenden synaptischen Übertragung über Glutamaterezeptoren und der überwiegende Teil der hemmenden Transmission über GABA_A-Rezeptoren erfolgt (Zolles et al. 2009). Aus diesem Grund wurde zunächst die Wirkung von lokal appliziertem ACh in Gegenwart der glutamatergen Antagonisten CNQX (kompetitiver AMPA-Rezeptorantagonist) und D-AP5 (kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist) sowie der kompetitiven GABA_A-Rezeptorantagonisten Gabazin oder Bicucullin analysiert.

In Anwesenheit der glutamatergen Rezeptorantagonisten D-AP5 und CNQX wurde keine signifikante Änderung von Amplitude und Fläche der ACh-induzierten Ströme beobachtet (siehe auch Abb. 22A, Kap. 3.3.1.2). Diese Substanzen bewirkten eine nicht signifikante Abnahme der mittleren Stromamplitude auf 94.8 ± 14.5 % (Mittelwert \pm SEM) und der mittleren Fläche auf 93.7 ± 17.4 % des Kontrollwertes (n=13, Abb. 21, one-sample t-Test).

Nach zusätzlicher Blockade der GABA_A-Rezeptoren durch die Applikation von 1 μ M Gabazin oder 10 μ M Bicucullin kam es in den Pyramidenzellen der Schicht 2/3 zu einer ausgeprägten Reduktion von Amplitude und Fläche des ACh-induzierten Membranstromes. Die Abbildungen 20A und 20B zeigen zwei Beispiele. In einem Neuron (Abb. 20A) konnte nach Applikation von Gabazin noch ein kleiner Reststrom beobachtet werden, während im anderen Neuron (Abb. 20B) der GABA_A-Rezeptorantagonist eine vollständige Hemmung des ACh-induzierten Stromes verursachte.

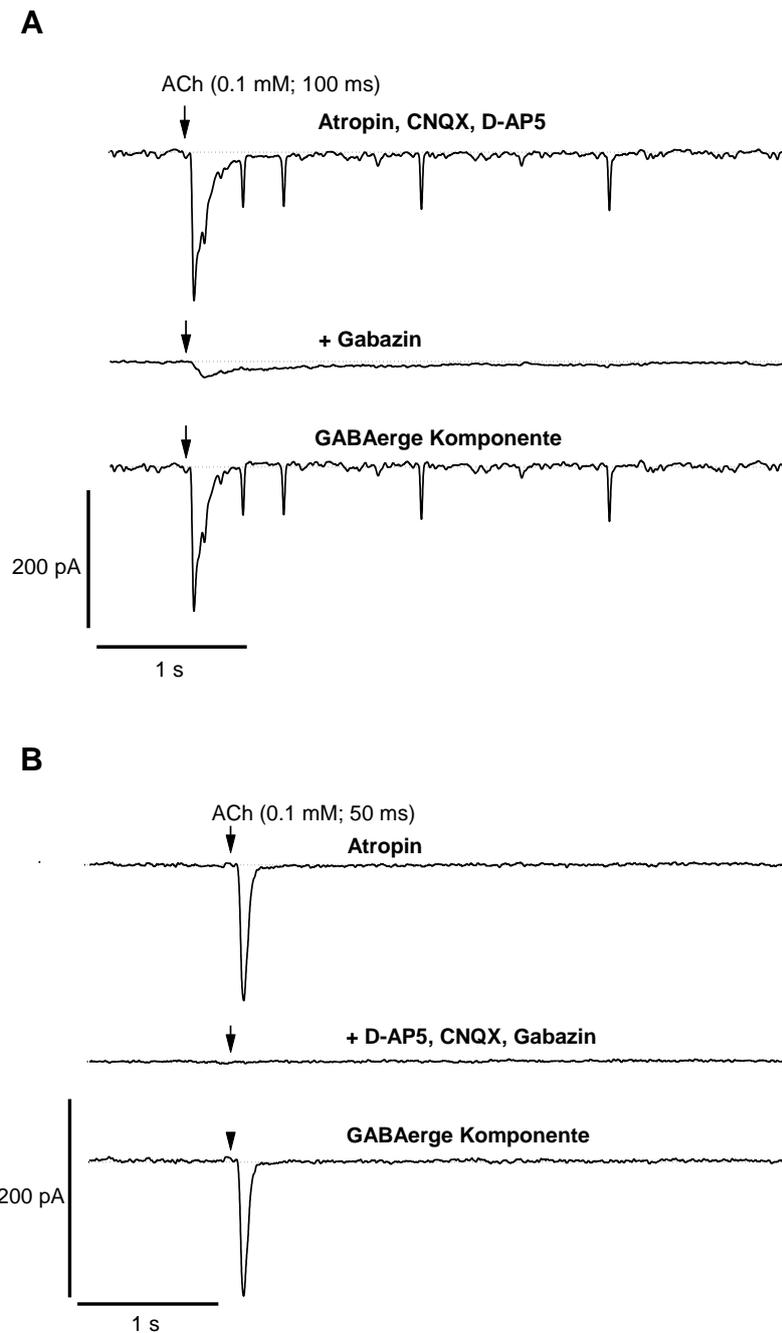


Abbildung 20: Wirkung von glutamatergen Rezeptorantagonisten und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3.

Voltage-Clamp-Messungen in zwei unterschiedlichen Neuronen in Gegenwart von Atropin (1 μ M) bei einem Haltepotenzial von -70 mV. Die obere und die mittlere Spur in A und B stellen den Mittelwert aus fünf nacheinander registrierten Antworten dar.

A Obere Spur: ACh-evozierter Strom (Applikationspuls: 100 ms, 0.7 bar, 0.1 mM ACh) in Gegenwart von Atropin, CNQX (10 μ M) und D-AP5 (10 μ M). **Mittlere Spur:** Antwort des Neurons nach zusätzlicher Gabe von Gabazine (1 μ M). **Untere Spur:** Darstellung der GABA_A-Rezeptor-abhängigen Stromkomponente (erhalten durch digitale Subtraktion der Ableitung in Gabazine von der Ableitung in Atropin, D-AP5 und CNQX).

B Obere Spur: ACh-induzierter Membranstrom in Anwesenheit von Atropin (Applikationspuls: 50 ms, 0.7 bar, 0.1 mM ACh). **Mittlere Spur:** ACh-Membranstrom nach Applikation von D-AP5 (10 μ M), CNQX (10 μ M) und Gabazine (1 μ M). **Untere Spur:** GABAerge Komponente des ACh-induzierten Stromes.

Ähnliche Versuche wurden bei insgesamt acht Neuronen durchgeführt. Die GABA_A-Rezeptorantagonisten bewirkten eine Reduktion der mittleren ACh-Stromamplitude auf 16.7 ± 4.2 % und der mittleren Fläche auf 37.0 ± 15.5 % des Kontrollwertes (Abb. 21). Der Unterschied der Stromamplituden, gemessen in Gegenwart von Gabazin/Bicucullin, zu den Amplituden unter Kontrollbedingungen war hochsignifikant ($p < 0.0001$; one-sample t-Test; $n = 8$). Für die Unterschiede in den Stromflächen fand sich eine Signifikanz von $p < 0.005$ (one-sample t-Test; $n = 8$).

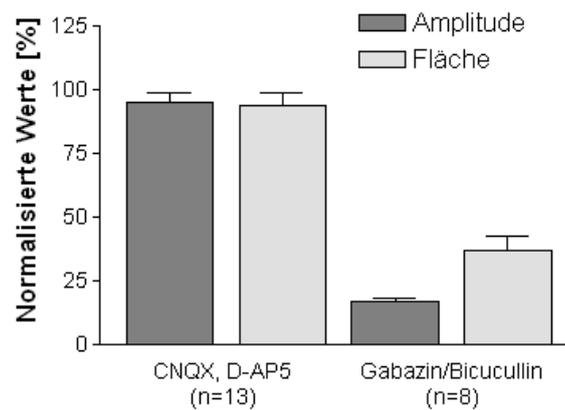


Abb. 21: Einfluss von CNQX, D-AP5 und Gabazin/Bicucullin auf Amplitude und Fläche des ACh-induzierten Membranstromes in Pyramidenzellen der Schicht 2/3. Die in Gegenwart der Antagonisten gemessenen Amplituden bzw. Flächen wurden in Bezug auf die Kontrollwerte normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM). Verwendete Konzentrationen: CNQX 10 μ M, D-AP5 10 μ M, Gabazin 1 μ M, Bicucullin 10 μ M.

Diese Versuche zeigten, dass der größte Teil des Einwärtsstromes, den man in neocorticalen Pyramidenzellen der Schicht 2/3 durch Druckapplikation von ACh in Gegenwart von Atropin auslösen kann, über GABA_A-Rezeptoren vermittelt wurde, das heißt höchstwahrscheinlich durch cholinerge Aktivierung vorgeschalteter GABAerger Interneurone.

3.3.1.2 Blockade von Aktionspotenzialen durch Tetrodotoxin (TTX)

Unter physiologischen Bedingungen ist die Voraussetzung für synaptische Transmission die Ausbildung eines Aktionspotenzials im präsynaptischen Neuron. Dieses Aktionspotenzial depolarisiert die Membran des synaptischen Terminals und aktiviert auf diese Weise spannungsabhängige Calciumkanäle in dieser Membran. Die Folge davon ist die Initiation der Vesikelexocytose und damit eine Freisetzung von Neurotransmitter. Werden die Aktionspotenziale pharmakologisch unterdrückt, so wird auch die Transmitterfreisetzung und damit die synaptische Übertragung verhindert. Auf diese Weise kann ein Neuron im Experiment von jeglichem synaptischen Zustrom isoliert werden. Membranströme, die unter diesen Bedingungen nach Applikation einer Testsubstanz auftreten, müssen deshalb auf der Aktivierung von postsynaptischen Rezeptoren beruhen.

In den Pyramidenzellen der Schicht 2/3 führte der Na⁺-Kanalblocker TTX (1 µM) innerhalb von wenigen Minuten zu einer Hemmung von Aktionspotenzialen sowie jeglicher synaptischer Aktivität. In vier von 11 untersuchten Neuronen bewirkte TTX zudem eine Inhibition der ACh-induzierten Membranströme (TTX-sensitive Membranströme), in den restlichen sieben Pyramidenzellen war dies nicht der Fall (TTX-insensitive Membranströme).

Die Abbildung 22A zeigt Messungen aus einem Neuron mit einem TTX-sensitiven ACh-induzierten Strom, die Abbildung 22B Ableitungen aus einer anderen Pyramidenzelle, bei der TTX die ACh-Effekte reduzieren, aber nicht vollständig hemmen konnte. Im letzteren Fall kam es nach zusätzlicher Gabe des GABA_A-Rezeptorblockers Bicucullin zu einer Hemmung der spontanen synaptischen Aktivität und zu einem Verschwinden der schnellen ACh-induzierten Stromantwort. Die langsame Stromkomponente blieb dagegen erhalten. Allerdings konnte die durch Bicucullin hervorgerufene Blockade der schnellen Stromkomponente nicht in allen untersuchten Neuronen (n = 3) beobachtet werden.

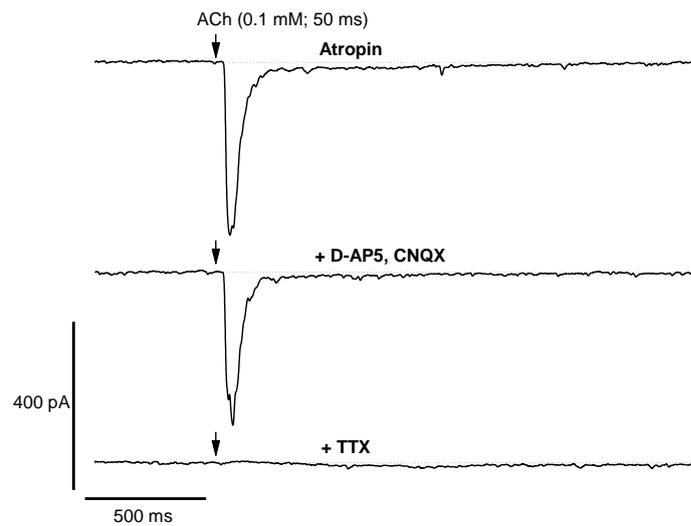
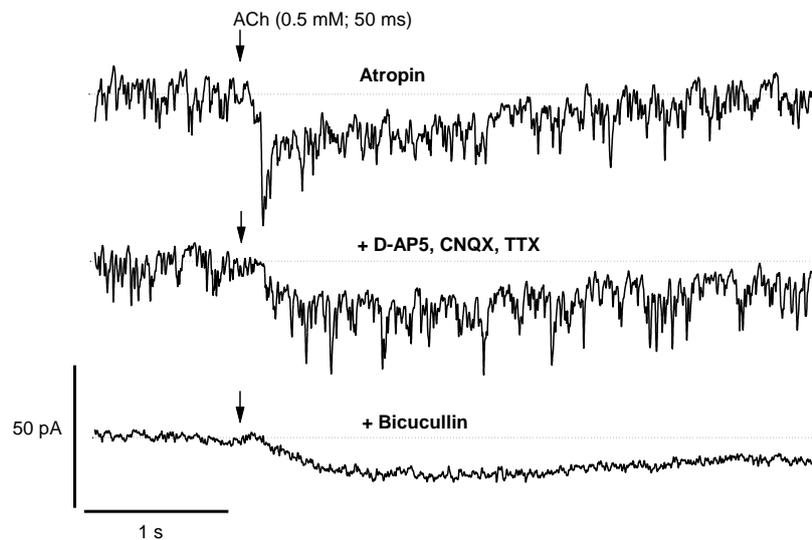
A TTX-sensitive Membranströme**B TTX-insensitive Membranströme**

Abbildung 22: ACh-induzierte Membranströme vor und nach Applikation des Natriumkanalblockers TTX. Messungen an zwei unterschiedlichen Pyramidenzellen der neocorticalen Schicht 2/3.

Die Experimente wurden im Voltage-Clamp-Modus bei einem Haltepotenzial von -70 mV in Gegenwart von Atropin (1 μ M) durchgeführt. Jede Spur repräsentiert den Mittelwert von fünf nacheinander registrierten Ableitungen. Die Zeitpunkte der ACh-Applikationen werden durch die Pfeile angegeben.

A Obere Spur: Kontrollmessung in Gegenwart von Atropin. **Mittlere Spur:** Stromantwort nach Applikation der glutamatergen Antagonisten D-AP5 und CNQX. **Untere Spur:** Messung nach Zugabe von TTX. Hier handelte es sich um einen TTX-sensitiven Membranstrom.

B Obere Spur: Kontrollmessung in Gegenwart von Atropin. **Mittlere Spur:** Ableitung nach Applikation von D-AP5 (10 μ M), CNQX (10 μ M) und TTX (1 μ M). **Untere Spur:** Zusätzliche Applikation des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (10 μ M).

Die Abbildung 23 fasst die Beobachtungen zusammen. In der Gruppe der Pyramidenzellen mit den TTX-sensitiven ACh-induzierten Membranströmen ($n = 4$) wurde immer ein vollständiger Block der Ströme durch den Natriumkanalblocker beobachtet. Bei den Neuronen mit den TTX-insensitiven Strömen ($n = 7$) kam es nach Applikation des Blockers zu einer mittleren Abnahme der Amplituden um ca. 2 % (auf 98.3 ± 13.3 % der Kontrolle) und zu einer mittleren Abnahme der Fläche um ca. 30 % (auf 69.4 ± 13.3 % der Kontrolle). Diese Veränderungen waren statistisch jedoch nicht signifikant (one-sample-t-Test). Nach Applikation von Bicucullin ($n = 3$) kam es zu einer weiteren Abnahme der schnellen Stromamplitude auf 60.0 ± 23.1 % der Kontrolle, aber zu keiner weiteren Veränderung der Fläche (i.e. langsame Stromkomponente, 70.5 ± 22.6 %). Obwohl Bicucullin die schnelle Stromamplitude des TTX-insensitiven Stromes um fast 40 % reduzierte, fand sich, wahrscheinlich auf Grund der zu geringen Anzahl der untersuchten Zellen, keine statistische Signifikanz (Mann-Whitney-Test).

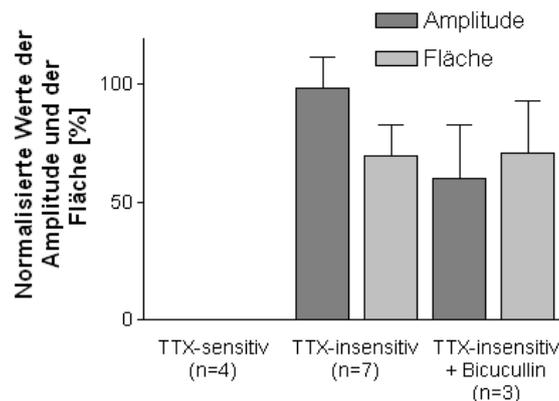


Abbildung 23: Verhalten der nikotinischen Ströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3 nach Zugabe von TTX und Bicucullin.

Vier Neurone reagierten sensitiv auf die Applikation von TTX, d.h. die Amplitude und die Fläche wurden vollständig blockiert. Dagegen zeigten sieben Neurone in Schicht 2/3 kaum eine Reaktion auf TTX. Bei drei dieser Neurone wurde nach Applikation von TTX zusätzlich Bicucullin appliziert.

3.3.2 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5

3.3.2.1 Hemmung der glutamatergen und GABAergen Signalübertragung und synaptische Isolation durch TTX

An insgesamt 14 Pyramidenzellen der neocorticalen Schicht 5 wurden Experimente analog zu denen, wie sie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben wurden, durchgeführt. Die Abbildung 24 zeigt zwei Beispiele solcher Messungen. Das in Abbildung 24A dargestellte Neuron reagierte auf ACh-Applikation (in Gegenwart von Atropin) mit einem Typ IB-Strom (bestehend aus schneller und langsamer Komponente), das in Abbildung 24B gezeigte Neuron mit einem Typ II-Strom (langsame Komponente). In beiden Pyramidenzellen führte die Applikation der glutamatergen und GABAergen Rezeptorantagonisten zu einer starken Reduktion des Membranrauschens, was auf die Unterdrückung der spontanen glutamatergen bzw. GABAergen synaptischen Aktivität zurückzuführen ist. In keinem der 14 untersuchten Neurone war es möglich, den ACh-induzierten Membranstrom durch Applikation von TTX vollständig zu hemmen.

Die Abbildung 25 fasst die Experimente quantitativ zusammen. Die alleinige Applikation der glutamatergen Rezeptorantagonisten bewirkte eine Zunahme von Amplitude und Fläche des Stromes (Amplitude: Zunahme auf 110.8 ± 4.5 % des Kontrollwertes; Fläche: Zunahme auf 131.4 ± 6.6 % des Kontrollwertes). Allerdings ist nur die Veränderung der Stromfläche statistisch signifikant ($p < 0.05$; one-sample t-Test, $n = 3$). Nach zusätzlicher Gabe des GABA_A-Rezeptorantagonisten Gabazin ($n = 7$) kam es zu einer statistisch nicht signifikanten Abnahme der Amplituden (83.0 ± 7.2 % bezogen auf Kontrolle) und einer ebenfalls nicht signifikanten Zunahme der Fläche (106.9 ± 9.6 % bezogen auf Kontrolle). Nach weiterem Zusatz des Natriumkanalblockers TTX zur Badlösung ($n = 14$) beobachtete man eine signifikante Reduktion der Stromamplituden auf 70.8 ± 3.9 % des Kontrollwertes ($p < 0.0001$; one-sample t-Test). Die gleichzeitige Abnahme der Fläche auf 93.5 ± 9.1 % der Kontrolle war aber nicht signifikant.

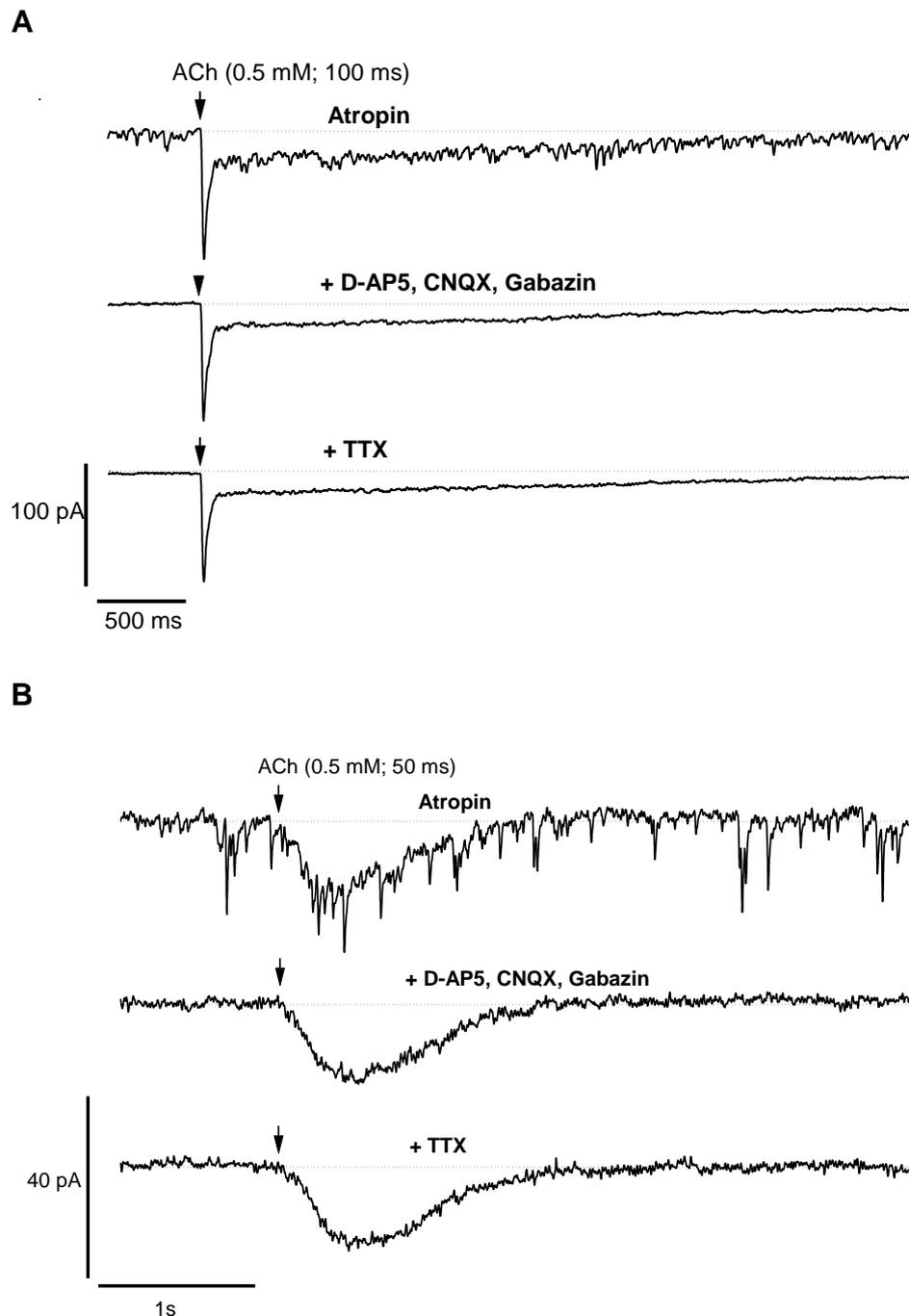


Abbildung 24: ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5 nach Blockade der glutamatergen und GABAergen Übertragung sowie nach Applikation von TTX.

Voltage-Clamp-Messungen an zwei verschiedenen Neuronen bei einem Haltepotenzial von -70 mV in Gegenwart von Atropin (1 μ M). Die einzelnen Spuren repräsentieren Mittelwerte von jeweils fünf nacheinander registrierten Ableitungen. Die Zeitpunkte der ACh-Applikationen werden durch die Pfeile angezeigt.

A *Oben:* Typ IB-Strom gemessen in Anwesenheit von Atropin; *Mitte:* Messung nach Applikation von CNQX (10 μ M), D-AP5 (10 μ M) und Gabazine (1 μ M); *Unten:* Ableitung nach zusätzlicher Applikation von TTX (1 μ M).

B *Oben:* Typ II-Strom gemessen in Anwesenheit von Atropin; *Mitte:* Messung nach Applikation von CNQX (10 μ M), D-AP5 (10 μ M) und Gabazine (1 μ M); *Unten:* Ableitung nach zusätzlicher Applikation von TTX (1 μ M).

NB: Starke Abnahme des Membranrauschens nach Zugabe der glutamatergen und GABAergen Antagonisten zur Badlösung.

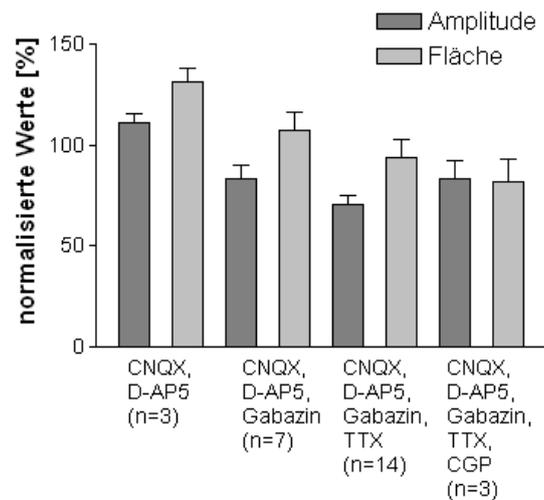


Abbildung 25: Wirkung von glutamatergen und GABAergen Rezeptorantagonisten sowie von TTX auf ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5.

Die in Gegenwart der verschiedenen Pharmaka gemessenen Amplituden bzw. Flächen der Ströme wurden in Bezug auf die entsprechenden Parameter der Kontrollmessungen normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Verwendete Konzentrationen: CNQX 10 μ M, D-AP5 10 μ M, Gabazin 1 μ M, TTX 1 μ M, CGP 35348 10 μ M. Alle Messungen wurden in Gegenwart von Atropin (1 μ M) durchgeführt.

Neben den GABA_A-Rezeptoren spielen auch die GABA_B-Rezeptoren bei der Vermittlung der GABAergen Hemmung im Neocortex eine Rolle (Sutor und Luhmann 1998). Aus diesem Grund wurde in drei Neuronen überprüft, ob der GABA_B-Rezeptorantagonist CGP 35348 (10 μ M) die ACh-induzierten Membranströme beeinflussen kann. In keiner der untersuchten Pyramidenzellen war ein signifikanter Effekt dieses Antagonisten nachweisbar (Amplitude: 83.1 ± 8.9 % der Kontrolle; Fläche: 81.6 ± 11.6 % der Kontrolle; one-sample t-Test).

3.3.3 Vergleich der Neuronenpopulationen in Schicht 2/3 und 5

In beiden Schichten wurde untersucht, in welcher Weise der durch ACh-Applikation hervorgerufene Membranstrom durch Hemmung der GABAergen und glutamatergen Signalübertragung verändert wird. Wie aus der Abbildung 26 zu ersehen ist, kam es in den Neuronen der Schicht 2/3 unter dem Einfluss von GABA_A-Rezeptorantagonisten zu einer signifikanten Abnahme von Amplitude und Fläche des ACh-induzierten Stromes, während die entsprechenden Parameter in Pyramidenzellen der Schicht 5 nahezu gleich blieben. Vergleicht man die Meßdaten aus den Neuronen beider Schichten mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests, so stellt man fest, dass in Gegenwart von Gabazin oder Bicucullin sowohl die Abnahme der Stromamplitude ($p = 0.0003$) als auch die Verringerung der Fläche ($p = 0.0093$) in

den Neuronen der Schicht 2/3 ($n = 8$) signifikant größer war als in den Zellen der Schicht 5 ($n = 7$).

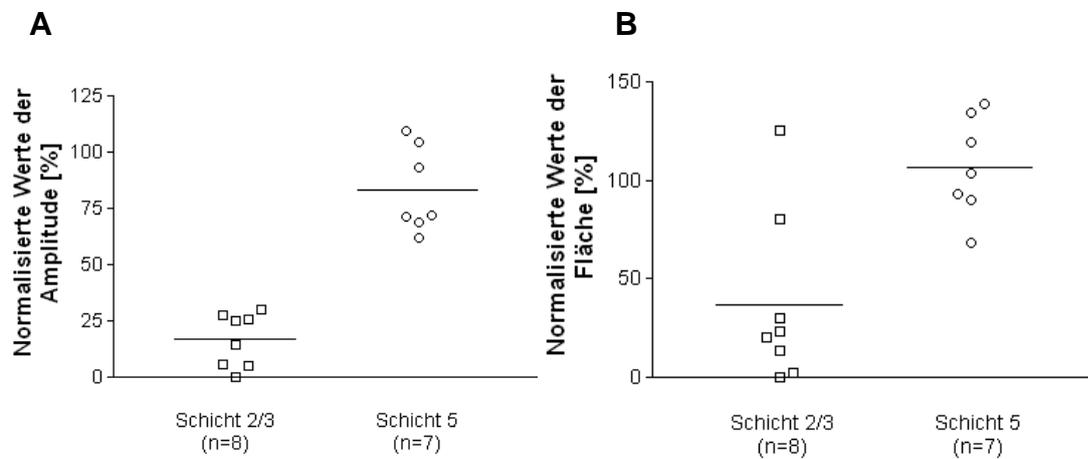


Abb. 26: Veränderung von Amplitude (A) und Fläche (B) des ACh-induzierten Membranstromes in Gegenwart von GABA_A-Rezeptorantagonisten. Vergleich zwischen Neuronen der Schichten 2/3 und 5.

Die Punkte repräsentieren die Veränderungen der Amplituden bzw. Flächen nach Applikation von Gabazin (1 μ M) oder Bicucullin (10 μ M) in Relation zu den Messungen in Anwesenheit von Atropin (1 μ M), CNQX (10 μ M) und D-AP5 (10 μ M). Die waagrechte Linie gibt den Mittelwert wieder.

3.4 Charakterisierung der ACh-induzierten Membranströme mittels selektiver nikotinischer Rezeptorantagonisten

3.4.1 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3

Zur pharmakologischen Identifizierung der Komponenten der ACh-induzierten Membranströme wurden folgende nAChR-Antagonisten verwendet: **(1)** Methyllycaconitin (MLA), das in der eingesetzten Konzentration (10 nM) selektiv nAChR vom α_7 -Subtyp blockiert und **(2)** Dihydro- β -Erythroidin (DH β E), welches bei Konzentrationen zwischen 1 – 10 μ M als selektiver Antagonist für den $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp des nAChR angesehen wird (Raggenbass und Bertrand 2002).

Die Abbildung 27 zeigt Messungen an zwei unterschiedlichen Pyramidenzellen der Schicht 2/3. In einem Neuron (Abb. 27A) bewirkte die lokale Applikation von ACh (in Gegenwart von Atropin, CNQX und D-AP5) einen Strom, bestehend aus einer schnellen und einer langsamen Komponente. Zudem waren der Ableitung spontane synaptische Ströme, sehr wahrscheinlich GABA-vermittelte Ströme, überlagert. Bereits fünf Minuten nach Hinzufügen von MLA (10 nM) zur Badlösung konnte eine Hemmung der schnellen Antwort beobachtet werden. Die langsame Stromkomponente blieb unverändert. Erst die zusätzliche Gabe von DH β E (1 μ M) führte zu einer Blockade dieser Komponente.

Abbildung 27B stellt Messungen an einem Neuron dar, das in Anwesenheit von Atropin, CNQX und D-AP5 auf ACh-Applikation nur mit einer langsamen Stromantwort reagierte. In diesem Falle konnte der ACh-induzierte Membranstrom vollständig durch DH β E (1 μ M) inhibiert werden.

Die Wirkung der nAChR-Antagonisten wurde in vier Neuronen der Schicht 2/3 mit schneller und langsamer ACh-induzierter Stromkomponente untersucht. Dabei führte die Applikation von MLA (10 nM) zu einer Abnahme der Amplitude auf 23.8 ± 9.2 % (Mittelwert \pm SEM) des Kontrollwertes und zu einer Reduktion der Fläche auf 92.5 ± 3.8 % der Kontrolle. Die Verringerung der Amplitude war statistisch signifikant ($p = 0.0037$; one-sample t-Test), die der Fläche nicht. Durch die anschließende Zugabe von DH β E (1 μ M) kam es zu keiner meßbaren Amplitudenänderung (26.3 ± 11.3 %

der Kontrolle), aber zu einer sehr deutlichen Flächenabnahme auf $9.5 \pm 8.8 \%$ des Kontrollwertes.

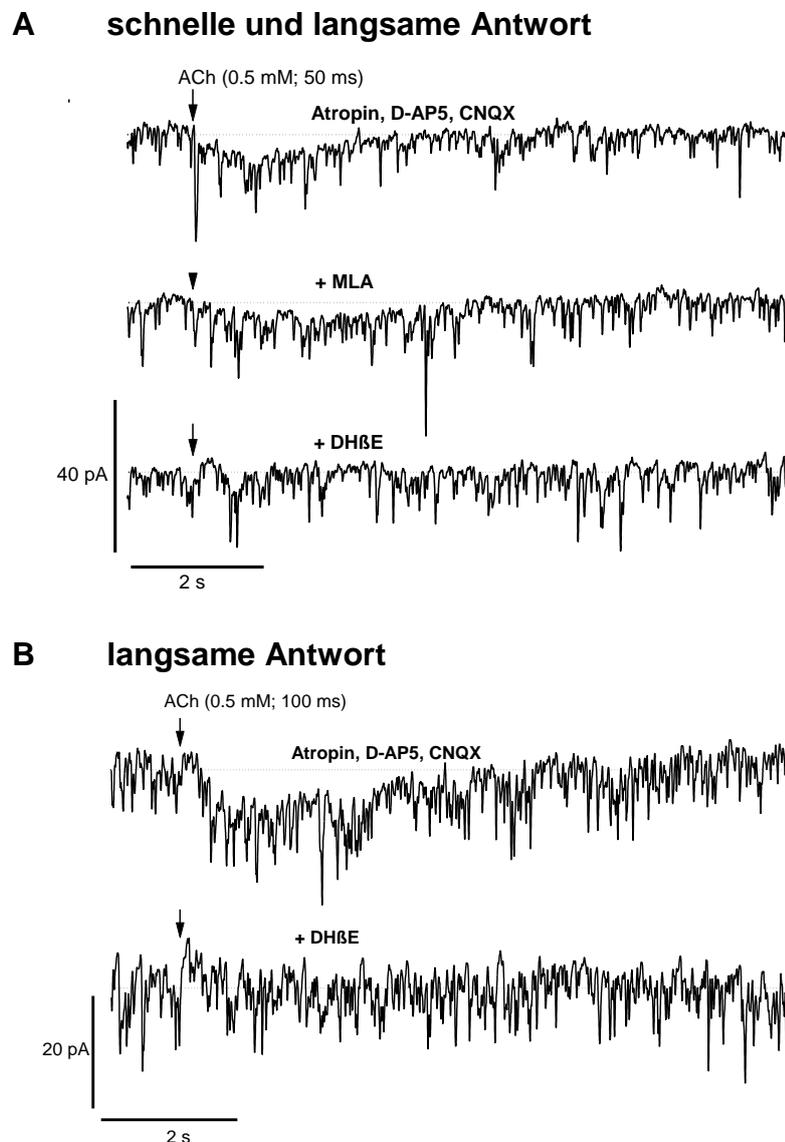


Abbildung 27: Wirkung der nAChR-selektiven Antagonisten MLA und DHβE auf ACh-induzierte Ströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3.

Voltage-Clamp-Messungen bei einem Haltepotenzial von -70 mV. Die Kontrollmessungen (jeweils obere Spuren in A und B) wurden in Anwesenheit von Atropin ($1 \mu\text{M}$), CNQX ($10 \mu\text{M}$) und D-AP5 ($10 \mu\text{M}$) durchgeführt. Die Spuren stellen Mittelungen von jeweils fünf nacheinander registrierten Einzelmessungen dar.

A Neuron mit einer schnellen und einer langsamen Stromkomponente. MLA (10 nM, mittlere Spur) blockierte nur die schnelle, DHβE ($1 \mu\text{M}$, untere Spur) nur die langsame Komponente.

B Neuron mit nur langsamer Stromkomponente. Hier wurde der ACh-induzierte Membranstrom vollständig durch DHβE ($1 \mu\text{M}$) inhibiert.

In weiteren vier Neuronen, die nur mit einer langsamen Stromkomponente auf ACh-Applikation reagierten, fand sich nach Hinzufügen von DHβE ($1 \mu\text{M}$) zur Badlösung sowohl eine Reduktion der Amplitude auf $1.5 \pm 1.5 \%$ als auch der Fläche auf $21.0 \pm$

6.4 % des Kontrollwertes. Beide Mittelwerte waren mit $p < 0.0001$ bzw. $p = 0.001$ (one-sample t-Test) signifikant verschieden von der Kontrolle (100 %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass MLA die Amplitude der schnellen Stromantwort um ca. 80 % vermindern konnte, die Fläche hingegen nur um maximal 10 %. DH β E reduzierte die Fläche, die als Referenz für die langsame Antwort angesehen werden kann, um ca. 90 %, leistete aber keinen Beitrag zur Reduktion der Amplitude der schnellen Komponente.

Betrachtet man die Neurone mit langsamer Stromantwort, so sieht man, dass hier die Fläche durch DH β E um ca. 80 % reduziert wurde. Ebenso kam es zu einer Verminderung der Amplitude der langsamen Komponente um ca. 98 %.

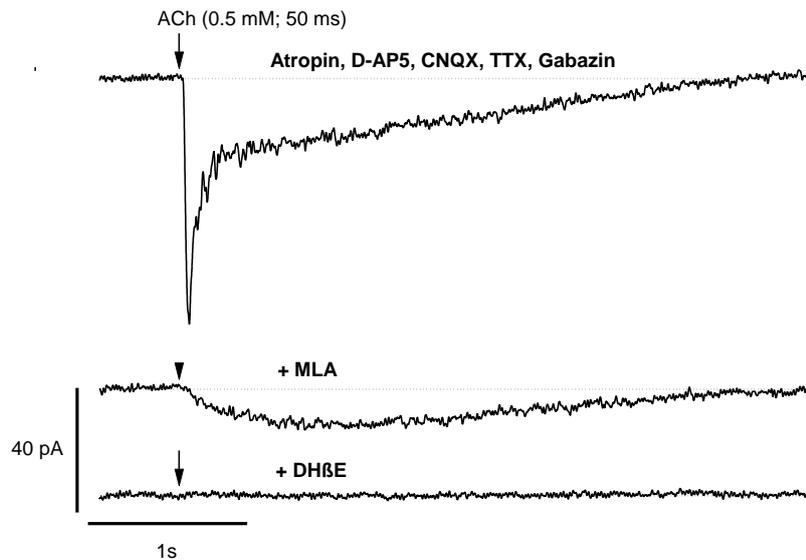
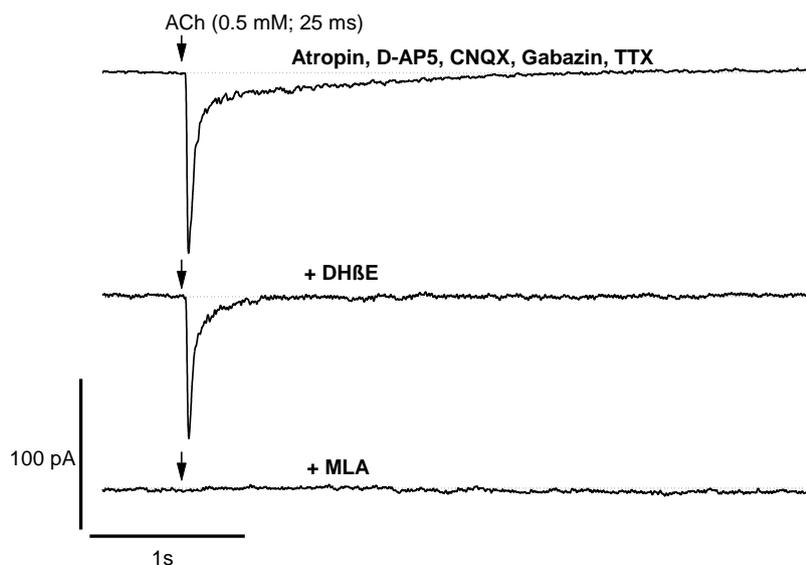
3.4.2 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5

3.4.2.1 Pharmakologische Charakterisierung

Die Wirkung der nAChR-Antagonisten MLA und DH β E wurde in acht Neuronen der Schicht 5 analysiert. In Abbildung 28 sind beispielhaft die Messungen an zwei verschiedenen Pyramidenzellen dargestellt. Die Zellen reagierten mit einem Typ-IB-Strom (schnelle und langsame Komponente) auf ACh-Applikation. Alle Messungen wurden in Anwesenheit von Atropin, D-AP5, CNQX, TTX und Gabazin durchgeführt. In dem Experiment, das in Abbildung 28A zu sehen ist, kam es nach Zugabe von MLA (10 nM) zur Badlösung nur zu einer Hemmung der schnellen Komponente. Der langsame Stromanteil konnte erst durch zusätzliche Gabe von DH β E (1 μ M) unterdrückt werden. Im zweiten Versuch, dargestellt in Abbildung 28B, wurde die Reihenfolge der Antagonistenapplikation umgekehrt. DH β E bewirkte hier eine Inhibition des langsamen Stromes, ohne deutlichen Effekt auf die schnelle Komponente. Diese wurde dann durch MLA gehemmt.

Die folgenden Mittelwerte von Amplitude und Fläche sind entweder direkt gemessene Werte (dann, wenn der Antagonist zuerst appliziert wurde) oder indirekt ermittelte Werte. „Indirekt ermittelt“ bedeutet eine elektronische Subtraktion der Messung in Gegenwart des zuerst verabreichten Antagonisten von der Kontrollmessung (Abb. 30, Kap. 3.4.2.2). Daraus resultiert die zweite Stromkomponente, die dann immer durch den zweiten Antagonisten vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 28).

MLA (10 nM) bewirkte in den acht untersuchten Neuronen eine Reduktion der Amplitude der schnellen Komponente auf 18.1 ± 7.3 % (Mittelwert \pm SEM) des Kontrollwertes und eine Verminderung der Fläche auf 61.3 ± 11.6 %. Sowohl die Amplitudenänderung ($p < 0.0001$; one-sample t-Test) als auch die Flächenänderung ($p < 0.05$; one-sample t-Test) unterschieden sich signifikant von der Kontrolle. DH β E (1 μ M) reduzierte die Amplitude der langsamen Komponente auf 71.5 ± 7.9 % und ihre Fläche auf 34.2 ± 9.0 % des Kontrollwertes ($n = 7$). Auch hier waren wieder beide Veränderungen statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle (Amplitude: $p < 0.05$, Fläche: $p < 0.001$; one-sample t-Test).

A Neuron mit schneller und langsamer Antwort**B Neuron mit schneller und langsamer Antwort****Abbildung 28: Wirkung von selektiven nAChR-Antagonisten auf ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5.**

Voltage-Clamp-Messungen an zwei unterschiedlichen Neuronen bei einem Haltepotenzial von -70 mV. Die Badlösung enthielt (vor Applikation der nikotinischen Antagonisten): Atropin (1 μ M), CNQX (10 μ M), D-AP5 (10 μ M), Gabazin (1 μ M) und TTX (1 μ M). Alle Spuren zeigen Mittelwerte von 5 nacheinander registrierten Messungen.

A *Oben*: Kontrollmessung, *Mitte*: MLA (10 nM), *Unten*: zusätzlich DH β E (1 μ M).

B *Oben*: Kontrollmessung, *Mitte*: DH β E (1 μ M), *Unten*: zusätzlich MLA (10 nM).

Vergleicht man die Flächen- und Amplitudenänderungen nach MLA-Zugabe mit denen nach DH β E-Applikation so erkennt man, dass sich nur die Amplitudenänderungen signifikant voneinander unterscheiden ($p < 0.005$, Mann-Whitney-Test), nicht aber die Flächenänderungen (Abb. 29).

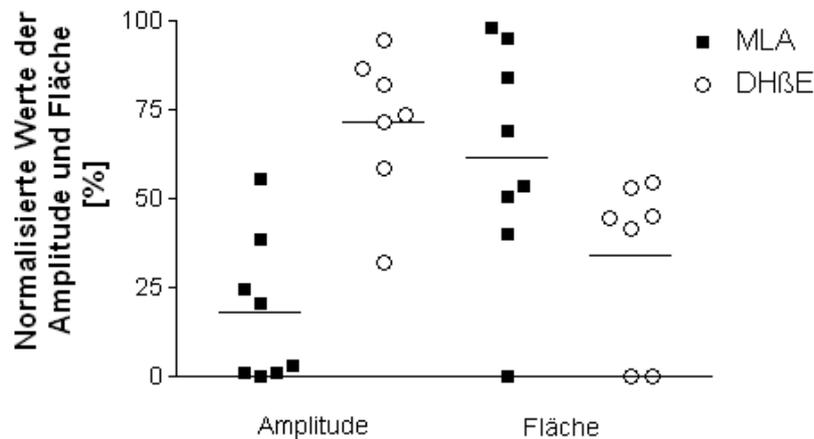


Abbildung 29: Effekt der nAChR-selektiven Antagonisten MLA und DHβE auf nikotinische Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5.

Amplituden- und Flächenänderungen wurden in Relation zu den entsprechenden Kontrollmessungen normalisiert. Die waagrecht Linien geben die Mittelwerte wieder.

3.4.2.2 Kinetik der Stromkomponenten

Das oben erwähnte digitale Subtraktionsverfahren ermöglichte es, die beiden Komponenten der ACh-induzierten Membranströme isoliert darzustellen und ihre kinetischen Eigenschaften zu bestimmen. Die Abbildung 30 zeigt zwei Beispiele für dieses Analyseverfahren. In dem Experiment, das in Abbildung 30A zu sehen ist, bewirkte über die Badlösung appliziertes DHβE (1 μ M) eine weitgehende Hemmung der langsamen Komponente. Der verbliebene Strom konnte durch MLA vollständig inhibiert werden und entsprach somit der MLA-sensitiven Komponente. Subtrahiert man den MLA-sensitiven Stromanteil von der Kontrollmessung, erhält man die DHβE-sensitive Komponente. Die Abbildung 30B stellt das umgekehrte Vorgehen dar, das heißt, dass zunächst durch Applikation von MLA die DHβE-sensitive Komponente isoliert wurde, um dann durch Subtraktion den MLA-sensitiven Stromteil zu erhalten.

Folgende Messungen wurden an den auf die beschriebene Weise isolierten Stromkomponenten durchgeführt: Amplitude, Fläche, Stromanstiegszeit (entspricht der Zeit zwischen dem 10 % - und dem 90 % - Wert der maximalen Stromamplitude), und die schnellen sowie langsamen Abfallszeitkonstanten (Bestimmung durch Anpassen einer Exponentialfunktion mit zwei Termen).

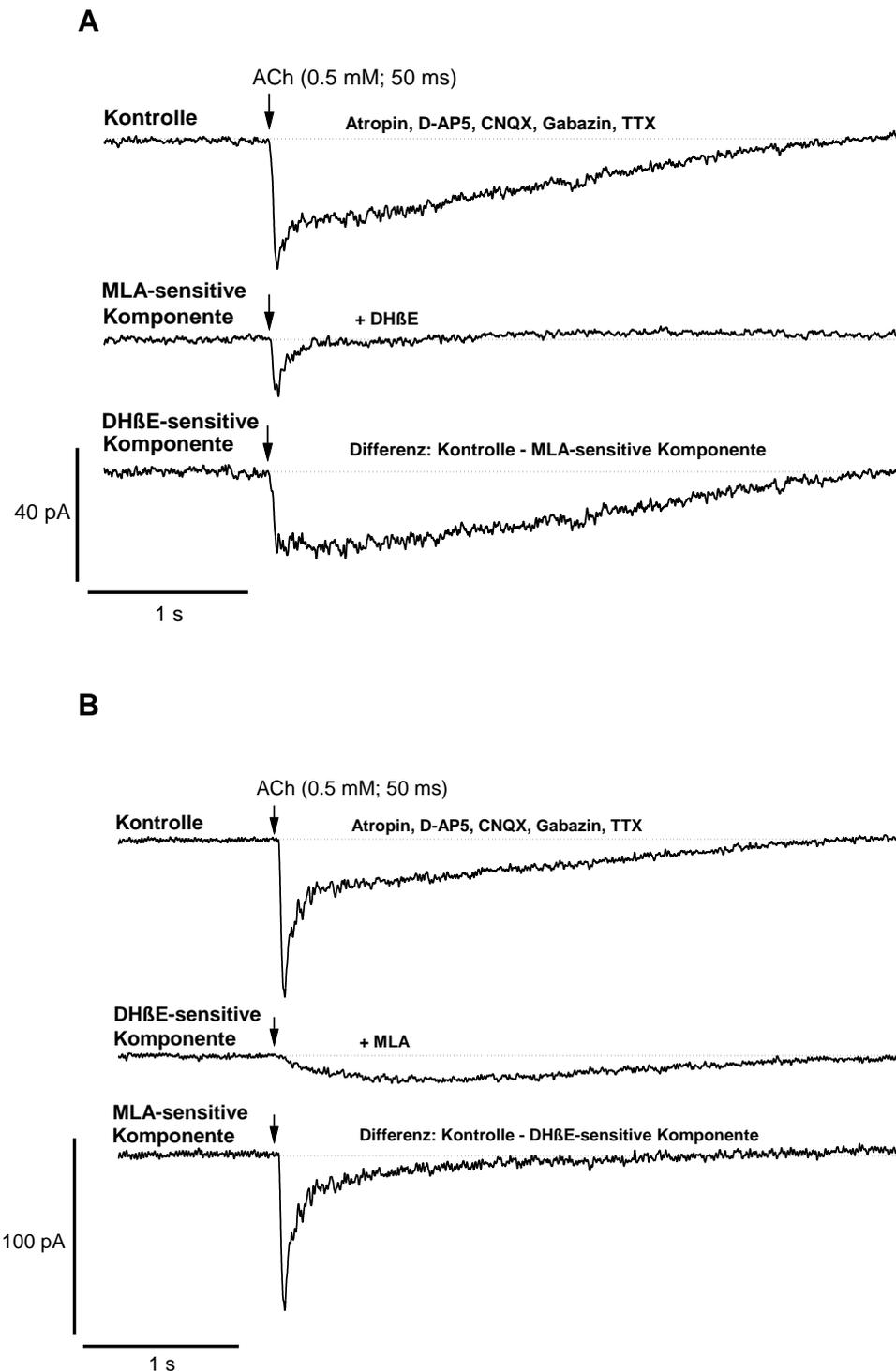


Abbildung 30: Isolierung der MLA- und DHβE-sensitiven Stromkomponenten durch digitale Subtraktion.

Voltage-Clamp-Messungen an zwei unterschiedlichen Neuronen bei einem Haltepotenzial von -70 mV. Vor Applikation der nikotinischen Antagonisten enthielt die Badlösung bereits Atropin (1 μM), CNQX (10 μM), D-AP5 (10 μM), Gabazin (1 μM) und TTX (1 μM). Die oberen und mittleren Spuren sind Mittelwerte von fünf nacheinander registrierten Ableitungen.

A *Oben*: Kontrollmessung, *Mitte*: Ableitung in Gegenwart von DHβE (1 μM), es resultierte die MLA-sensitive Komponente, *Unten*: DHβE-sensitive Komponente ermittelt durch Subtraktion des MLA-sensitiven Stromanteils von der Kontrollmessung.

B *Oben*: Kontrollmessung, *Mitte*: DHβE-sensitive Komponente, *Unten*: MLA-sensitive Komponente.

Die Tabelle 10 fasst die kinetischen Eigenschaften der beiden Anteile der ACh-induzierten Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5 zusammen. Die MLA-sensitive Komponente steuerte ca. 90 % zur Amplitude des gesamten Stromes bei, während es sich bei der DH β E-sensitiven Komponente höchstens um 20 % handelte. Bei den Stromflächen ergab sich ein umgekehrtes Bild. Hier nahm die MLA-sensitive Komponente den kleineren Teil (ca. 35 %) und die DH β E-sensitive Komponente den größeren Teil mit ca. 70 % ein. Die Stromanstiegszeit der schnellen MLA-sensitiven Komponente war nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle, die der langsamen DH β E-sensitiven Komponente dagegen schon. Der Abfall der MLA-sensitiven Komponente konnte mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden, die sich beide nicht signifikant von der Kontrolle unterschieden. Der Abfall der DH β E-sensitiven Komponente konnte mit einer Zeitkonstanten hinreichend charakterisiert werden; diese war nicht signifikant verschieden von der Abfallszeitkonstanten der Kontrollmessungen.

Tabelle 10: Kinetische Eigenschaften der nikotinischen Ströme von Schicht 5 Pyramidenzellen

	Kontrolle	MLA-sensitive Komponente	DH β E-sensitive Komponente
Amplitude [pA] \pm SD	-99 \pm 74 (n = 8)	-88.5 \pm 76.6 (n = 8)	-20.1 \pm 8.6 (n = 7)
		n.s. (Kontrolle) ⁽¹⁾	p < 0.05 (Kontrolle) ⁽¹⁾ n.s. (MLA-sensitive Komponente) ⁽¹⁾
Fläche [nA*ms] \pm SD	33.5 \pm 13.7 (n = 8)	11.4 \pm 8.3 (n = 8)	24.2 \pm 11.8 (n = 7)
		p < 0.001 (Kontrolle) ⁽¹⁾	n.s. (Kontrolle) ⁽¹⁾ n.s. (MLA-sensitive Komponente) ⁽¹⁾
Anstiegszeit [ms] \pm SD	14.7 \pm 8.1 (n = 8)	18.7 \pm 10.5 (n = 7)	641.6 \pm 597.8 (n = 7)
		n.s. (Kontrolle) ⁽¹⁾	p < 0.01 (Kontrolle) ⁽¹⁾ p < 0.01 (MLA-sensitive Komponente) ⁽¹⁾
Schnelle Abfallszeitkonstante [ms] \pm SD	42.5 \pm 39.6 (n = 8)	57.8 \pm 46.5 (n = 8)	---
		n.s. (Kontrolle) ⁽²⁾	
Langsame Abfallszeitkonstante [s] \pm SD	7.0 \pm 10.6 (n = 7)	0.8 \pm 0.7 (n = 2)	9.7 \pm 17.0 (n = 7)
		n.s. (Kontrolle) ⁽¹⁾	n.s. (Kontrolle) ⁽¹⁾ n.s. (MLA-sensitive Komponente) ⁽¹⁾

Signifikanzniveau 5%; n.s. = nicht signifikant; ⁽¹⁾ One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Tests;
⁽²⁾ unverbundener, zweiseitiger t-Test

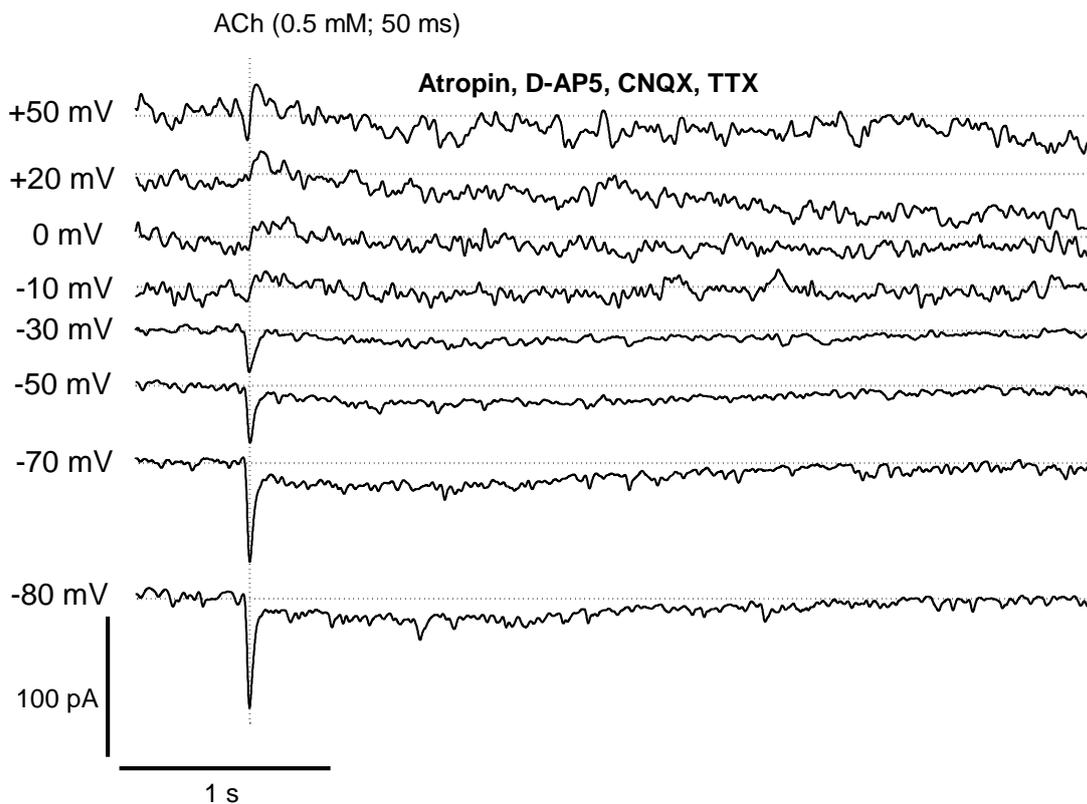
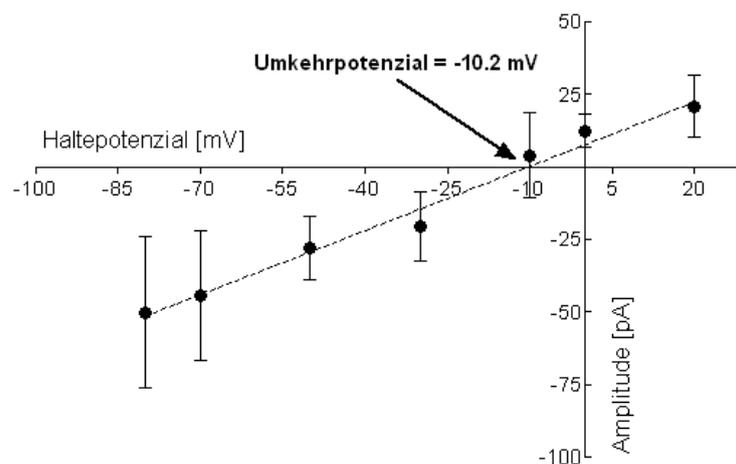
3.5 Umkehrpotenzial der nikotinischen postsynaptischen Membranströme

3.5.1 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3

Das Umkehrpotenzial der ACh-induzierten Ionenströme wurde in vier Pyramidenzellen der Schicht 2/3 bestimmt. Dazu wurde die Amplitude des durch ACh hervorgerufenen Membranstroms in Anwesenheit von Atropin, D-AP5, CNQX und TTX bei verschiedenen Haltepotenzialen zwischen -80 und +20 mV immer zum selben Zeitpunkt gemessen (Abb. 31A, gestrichelte Linie). Die Amplitudenwerte aus den vier Neuronen wurden gemittelt und in einem X-Y-Diagramm gegen das jeweilige Haltepotenzial aufgetragen (Abb. 31B). Mit dem one-sample t-Test wurde geprüft, ob die Amplitudenwerte signifikant von 0 verschieden waren, dies war bis auf den Punkt bei -10 mV ($p = 0.62$; $n = 4$) der Fall.

Die durchgezogene Linie stellt eine lineare Regression zwischen den Punkten -80 mV bis +20 mV (ohne -10 mV) dar. Die Gleichung dieser linearen Regression lautet: $I(\text{pA}) = 7.5(\text{pA}) + 0.7(\text{pA/mV}) * V_m(\text{mV})$. Daraus ergibt sich ein Umkehrpotenzial von -10.2 mV.

Auf Grund der variablen Effekte der GABA_A-Rezeptorantagonisten (siehe oben), wurden diese in diesen Versuchen nicht der Badlösung zugesetzt. Das hier gefundene Umkehrpotenzial kann demnach dem Umkehrpotenzial eines postsynaptischen (TTX-insensitiven) ACh-Stromes entsprechen, aber auch dem eines postsynaptischen GABA_A-Rezeptor-vermittelten Stromes, da die Pipettenlösung eine hohe Chloridkonzentration enthielt und das Chlorid-Gleichgewichtspotenzial nach der Nernstschen Gleichung bei -0.6 mV zu erwarten war.

A**B****Abbildung 31: Umkehrpotenzial von nikotinischen Strömen in Schicht 2/3 - Pyramidenzellen.**

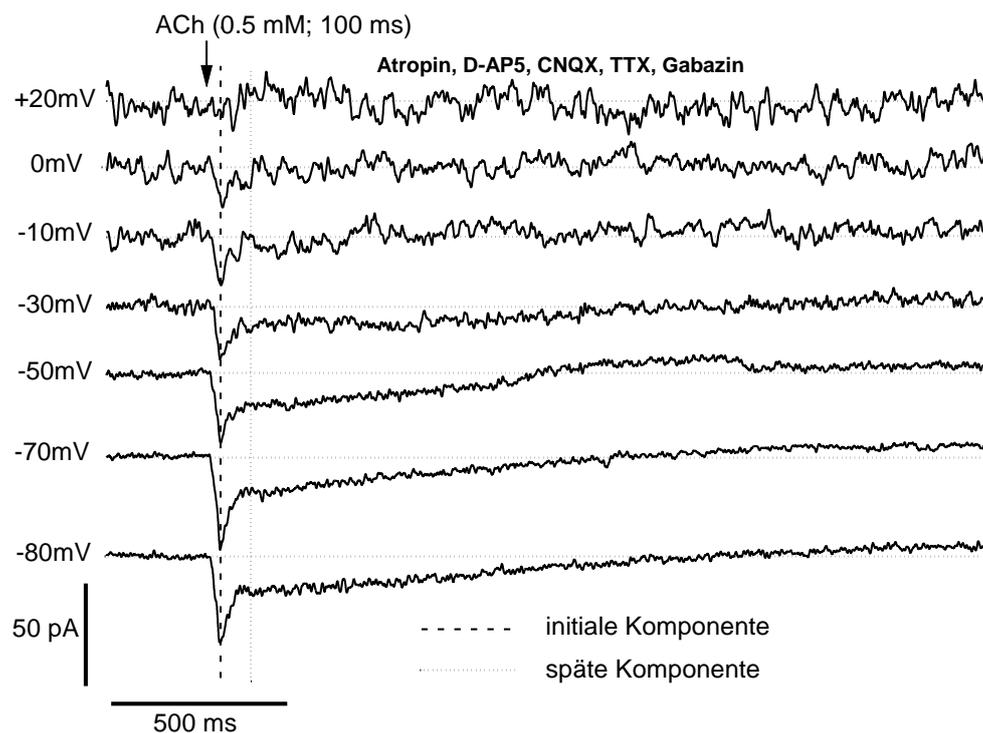
A Nikotinische Membranströme gemessen bei verschiedenen Haltepotenzialen. Jede Spur zeigt den Mittelwert von 3 Messungen. Das Haltepotenzial zwischen den Registrierungen betrug -70 mV. Während der Messungen wurde das Haltepotenzial für 1 s auf den vorgegebenen Wert eingestellt, danach wieder auf -70 mV für 60 Sekunden. Die vertikale gestrichelte Linie zeigt den Punkt an, an dem die Amplitude gemessen wurde. Alle Aufnahmen wurden in Anwesenheit von Atropin, D-AP5, CNQX und TTX durchgeführt.

B Strom-Spannungs-Kurve. Der Mittelwert ($n = 4$; \pm SD) der Amplituden wurde in einem X-Y-Diagramm gegen das Haltepotenzial aufgetragen. Die Linie resultiert aus einer linearen Regression zwischen -80 mV und +20 mV (ohne -10 mV).

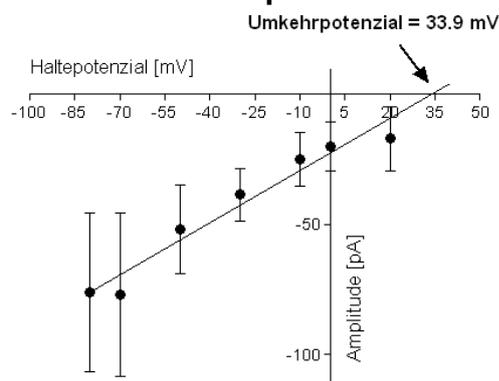
3.5.2 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5

Die Bestimmung des Umkehrpotenzials der nikotinischen Ströme in Pyramidenzellen der Schicht 5 wurde in Gegenwart von Atropin (1 μM), CNQX (10 μM), D-AP5 (10 μM), Bicucullin (10 μM) oder Gabazin (1 μM) und TTX (1 μM) durchgeführt. Die Amplituden der durch ACh-Applikation hervorgerufenen Membranströme wurden immer zum gleichen Zeitpunkt nach Applikation bei verschiedenen Membranpotenzialen (von -80 mV bis 20 mV) gemessen und als Funktion des Haltepotenzials aufgetragen. Die Abbildung 32A zeigt ein Beispiel einer solchen Messung. In den Abbildungen 32B und C sind die entsprechenden Diagramme, in denen die Messungen an sechs Neuronen zusammengefasst sind, zu sehen. Die Amplitudenmessung erfolgte dabei **(1)** zu dem Zeitpunkt, zu dem die initiale Komponente bei einem Haltepotenzial von -70 mV ihr Maximum erreicht hatte (Abb. 32B) und **(2)** zu dem Zeitpunkt, zu dem die späte Komponente bei einem Haltepotenzial von -70 mV ihr Maximum erreicht hatte (Abb. 32C). Für den frühen Stromanteil ergab die lineare Regression ein Umkehrpotenzial von +33.9 mV, die Gleichung für die lineare Regression der initialen Komponente lautet: $I(\text{pA}) = -22.6(\text{pA}) + 0.7(\text{pA/mV}) * V_m(\text{mV})$. Wichtig dabei ist, dass alle Mittelwerte der Amplituden bei den verschiedenen Haltepotenzialen signifikant unterschiedlich von Null waren (one-sample t-Test). Für die späte Stromkomponente wurde ein Umkehrpotenzial von +26.3 mV gefunden, bei einer linearen Regression mit der Gleichung: $I(\text{pA}) = -4.8(\text{pA}) + 0.2(\text{pA/mV}) * V_m(\text{mV})$. Dabei gingen die Mittelwerte an den Haltepotenzialen -10 mV, 0 mV und 20 mV nicht mit ein, da sie sich nicht signifikant von Null unterschieden haben (one-sample t-Test). Dies bedeutet, dass sich die Amplitude der späten Komponente ab einem Haltepotenzial von -10 mV nicht mehr signifikant verändert hat. Diese Beobachtung weist auf die bereits bekannte Einwärtsrektifikation der nikotinischen Membranströme hin (Haghighi und Cooper 2000). Einwärtsrektifikation bedeutet, dass die nAChR zwar Einwärtsströme bei negativen Potenzialen leiten, aber keine Auswärtsströme bei positiven Potenzialen.

A



B initiale Komponente



C späte Komponente

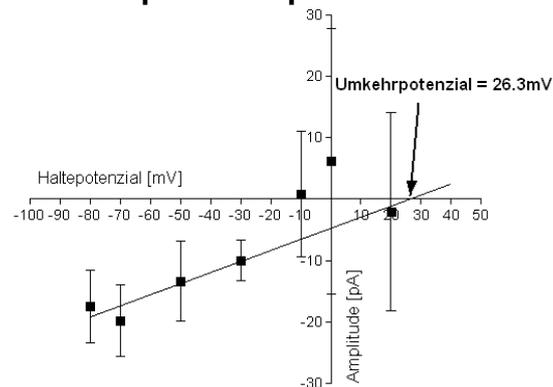


Abbildung 32: Umkehrpotenzial von postsynaptischen nikotinischen Membranströmen in Pyramidenzellen der Schicht 5

A Voltage-Clamp-Messungen von ACh-induzierten Membranströmen bei verschiedenen Haltepotenzialen. Die Badlösung enthielt Atropin (1 μ M), CNQX (10 μ M), D-AP5 (10 μ M), Gabazin (1 μ M) und TTX (1 μ M). Jede Spur repräsentiert den Mittelwert aus drei nacheinander registrierten Ableitungen. Dabei wurde für jede einzelne Messung das Haltepotenzial für eine Sekunde auf den vorgegebenen Wert eingestellt. Während dieser Zeit wurde ACh appliziert. Danach wurde das Haltepotenzial für mindestens 60 Sekunden auf -70 mV zurückgesetzt. Die vertikale gestrichelte Linie zeigt den Zeitpunkt an, zu dem die Amplitude der initialen Komponente gemessen wurde, die gepunktete Linie benennt den Meßzeitpunkt für die Amplitude der späten Komponente.

B Strom-Spannungs-Verhalten der initialen Komponente. Der Mittelwert ($n = 6$; \pm SD) der Amplituden der initialen Komponenten wurde gegen das Haltepotenzial aufgetragen. Die Linie resultiert aus einer linearen Regression zwischen -80 mV und +20 mV, dabei wurde kein Punkt ausgeschlossen.

C Strom-Spannungs-Verhalten der späten Komponente. Der Mittelwert ($n = 6$; \pm SD) der Amplituden der späten Komponente wurde gegen das Haltepotenzial aufgetragen. Die Linie resultiert aus einer linearen Regression zwischen -80 mV und +20 mV. Die Mittelwerte bei -10 mV, 0 mV und 20 mV wurden ausgeschlossen.

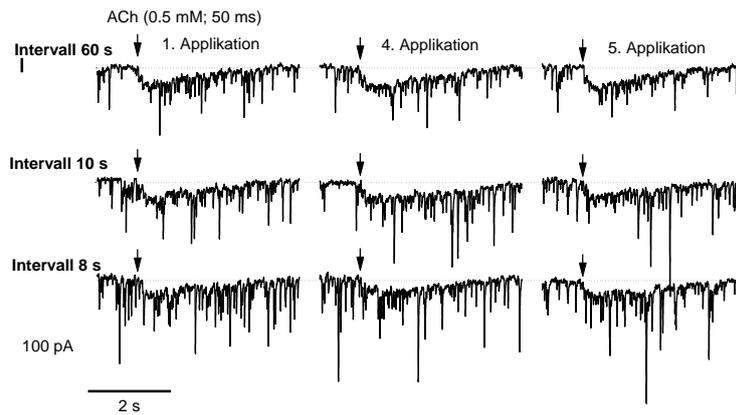
3.6 Desensitisierungsverhalten der nAChR

3.6.1 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 2/3

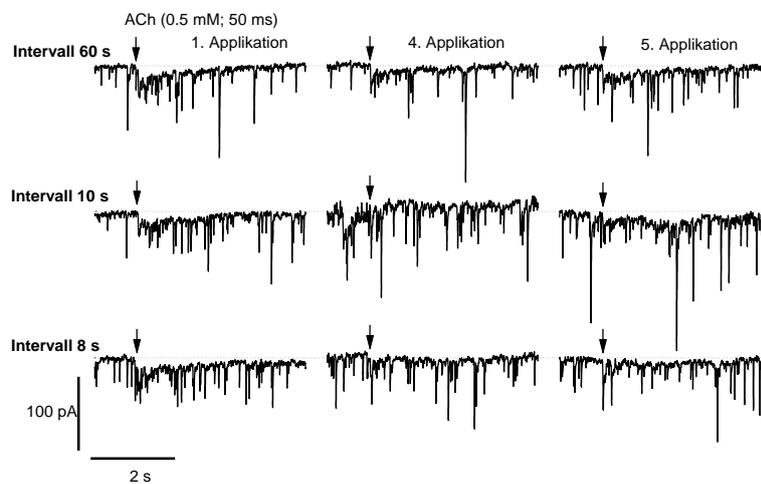
Nikotinische AChRs zeigen eine schnelle und ausgeprägte Desensitisierung nach einer anhaltenden oder wiederholten Applikation von nikotinischen Agonisten (Zoli et al. 1998, Quick und Lester 2002; Guo und Lester 2007). In Pyramidenzellen der Schicht 2/3 des Neocortex der Maus wurde untersucht, ob man hier eine solche Desensitisierung beobachten kann. Dazu wurden fünf ACh-Pulse nacheinander mit unterschiedlichen Zeitabständen (8 s, 10 s und 60 s) appliziert. Zwischen den einzelnen Applikationsserien lag ein Intervall von fünf Minuten. Diese Versuche wurden an sechs Neuronen in Gegenwart von Atropin (1 μ M) durchgeführt. Die Abbildung 33 zeigt drei Beispiele für derartige Experimente. Abbildung 33A stellt die Messungen an einem Neuron dar, das auf ACh-Applikation nur mit einer langsamen Komponente reagierte, Abbildung 33B ein Neuron mit schneller und langsamer Komponente und Abbildung 33C ein Neuron nur mit schneller Komponente.

Die Amplituden und Flächen der Ströme wurden in Relation zu den entsprechenden Parametern der Antwort auf die erste Applikation normalisiert. Wie aus dem Diagramm der Abbildung 34A zu ersehen ist, fand sich bei keinem der Applikationsintervalle ein statistisch signifikantes Anzeichen für eine Desensitisierung (60 s: n = 6, 10 s: n = 6, 8 s: n = 4, One-Sample t-Test). Die Ausnahme ist der Wert der Stromfläche bei der fünften Applikation bei einem Intervall von 8 Sekunden (Abb. 34B). Hier beobachtete man eine Reduktion der Fläche auf 26.6 ± 16.7 % des Kontrollwertes ($p < 0.05$, One-Sample t-Test).

A langsame Antwort



B schnelle und langsame Antwort



C schnelle Antwort

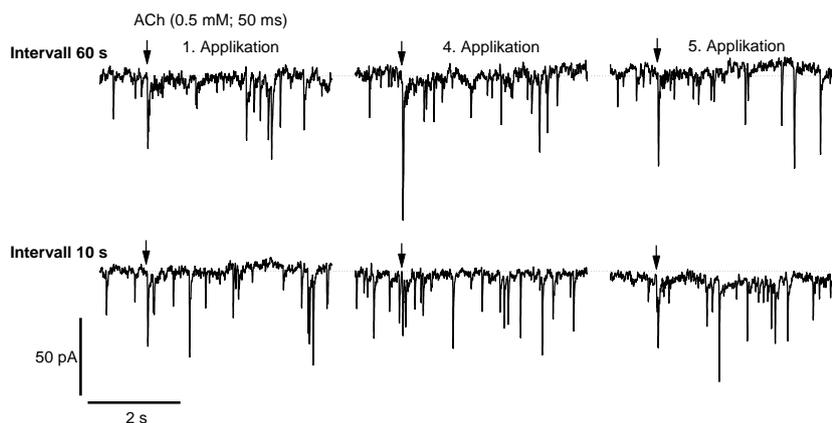


Abbildung 33: Desensitierung nikotinischer Ströme in Schicht 2/3 Pyramidenzellen bei repetitiver Applikation von ACh mit verschiedenen Intervallen.

Die Messungen wurden bei einem Haltepotenzial von -70 mV und in Anwesenheit von Atropin ($1 \mu\text{M}$) durchgeführt. Die erste, vierte und fünfte Aufnahme von insgesamt fünf Registrierungen wurden dargestellt. Jeweils 5 Aufnahmen wurden bei Intervallen von 60 s, 10 s und 8 s aufgezeichnet und hatten einen Zwischenabstand von 5 min. Die Abbildung zeigt Einzelableitungen.

A Neuron mit langsamer Stromantwort; **B** Neuron mit schneller und langsamer Stromkomponente; **C** Neuron mit schnellem ACh-induziertem Membranstrom.

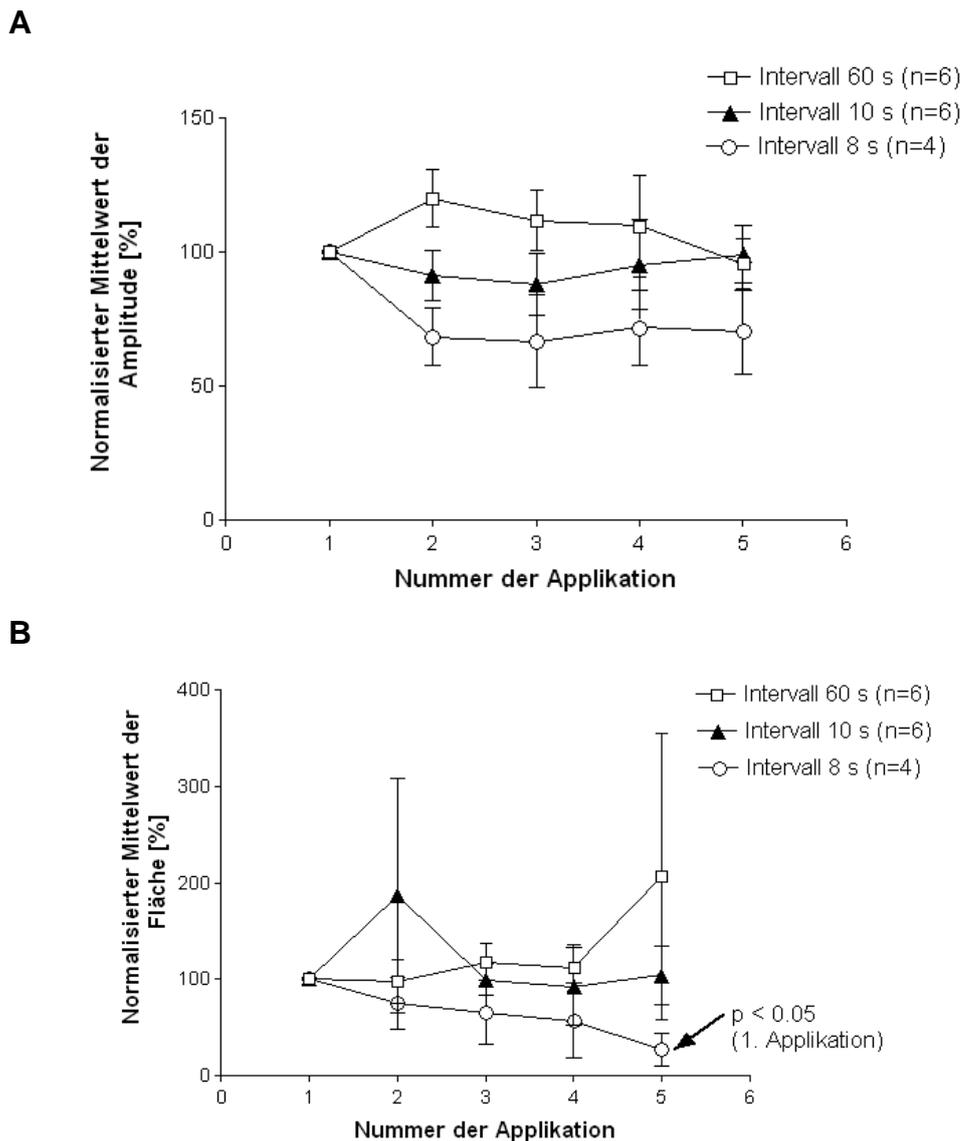


Abb. 34: Desensitierung der nikotinischen Membranströme in Schicht 2/3 Pyramidenzellen.

A Abhängigkeit der Stromamplitude von der Intervalldauer. ACh (0,5 mM) wurde mit Pulsen von 50 ms Dauer bei einem Druck von 700 mbar appliziert.

B Abhängigkeit der Fläche von der Intervalldauer.

3.6.2 Pyramidenzellen in Neocortexschicht 5

Das Desensitierungsverhalten der ACh-induzierten Membranströme wurde in sechs Pyramidenzellen der Schicht 5 mit der gleichen Vorgehensweise, wie unter 3.6.1 beschrieben, analysiert.

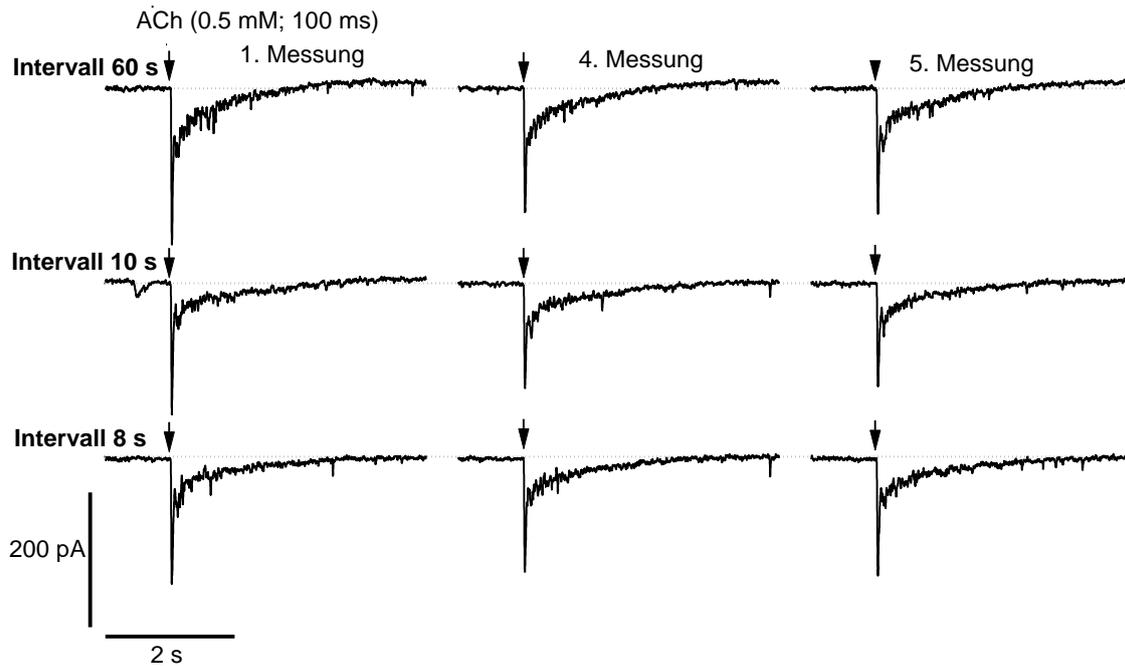


Abbildung 35: Desensitisierung nikotinischer Membranströme in Schicht 5 - Pyramidenzellen bei repetitiver Applikation von ACh bei verschiedenen Intervallen.

Die Messungen wurden bei einem Haltepotenzial von -70 mV und in Anwesenheit von Atropin (1 μ M) durchgeführt. Die erste, vierte und fünfte Aufnahme von insgesamt fünf Registrierungen wurden dargestellt.

In diesen Pyramidzellen war nun eine statistisch signifikante Desensitisierung des ACh-induzierten Membranstromes zu beobachten. Bei einem Applikationsintervall von 8 Sekunden kam es zu einer Reduktion der Stromamplitude auf 57.6 ± 8.0 % des Kontrollwertes (Abb. 36A, 5. Applikation, $p < 0.01$, One-Sample t-Test). Die Stromflächen blieben statistisch gesehen unverändert (Abb. 36B).

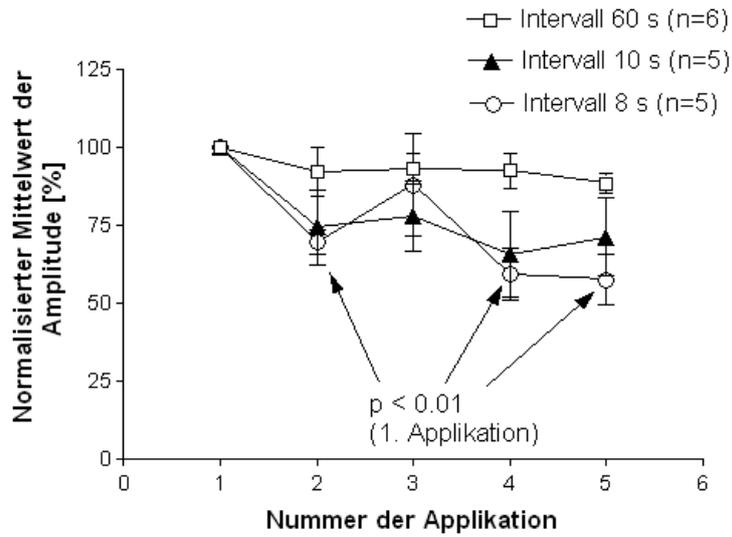
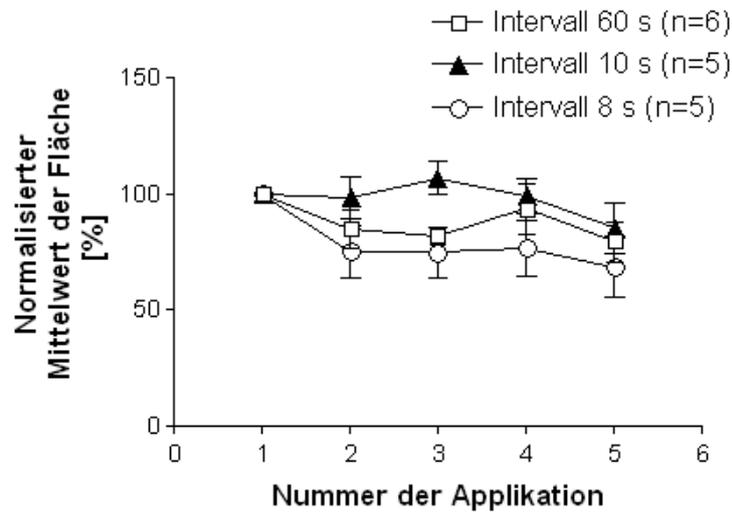
A**B**

Abbildung 36: Desensibilisierung der nikotinischen Membranströme in Schicht 5 – Pyramidenzellen.

A Abhängigkeit der Amplitude von der Intervalldauer zwischen zwei Applikationen. ACh (0.5 mM) wurde mit Pulsen von 100 ms Dauer bei 700 mbar Druck verabreicht. Die Badlösung enthielt Atropin (1 μ M).

B Abhängigkeit der Fläche von der Intervalldauer.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften von neocorticalen Pyramidenzellen in Schicht 2/3 und 5

Pyramidenzellen repräsentieren die größte Neuronenpopulation des cerebralen Cortex. Sie stellen die Ausgangsneurone des Neocortex dar. Ihre Funktion ist die Integration der Informationen subcorticaler Afferenzen sowie lokaler Schaltkreise und ihre Übertragung in andere corticale und subcorticale Strukturen (Degenetais et al. 2002). In elektrophysiologischen Studien wurden mehrere Pyramidenzellklassen beschrieben, hauptsächlich auf der Basis der Antwort der Neurone auf intrazelluläre Strominjektion sowie der Charakteristika ihrer Aktionspotenziale (Connors und Gutnick 1990). Danach gibt es zwei Hauptklassen, nämlich die regulär entladenden (regular spiking, RS) Pyramidenzellen und die Pyramidenzellen, die in der Lage sind, kurzdauernde, hochfrequente Aktionspotenzialsalven (Bursts) zu generieren (intrinsic bursting, IB) (Connors et al. 1982).

In der vorliegenden Arbeit handelte es sich bei den registrierten Pyramidenzellen in beiden Schichten durchwegs um RS - Zellen. Die Neurone antworteten auf einen überschwelligem depolarisierenden Strompuls mit einer Salve von Aktionspotenzialen. Dabei war die Entladungsfrequenz zu Beginn hoch und nahm dann schnell auf einen Gleichgewichtswert ab (Adaptation). Die Zellpopulationen der verschiedenen Schichten unterschieden sich lediglich in der Frequenz im Gleichgewicht, wobei die Neurone der Schicht 2/3 zu diesem Zeitpunkt höhere Frequenz aufwiesen. Der Grund hierfür ist vermutlich die Zellgröße. Pyramidenzellen der Schicht 2/3 sind kleiner als die der Schicht 5. Die Konsequenz daraus wäre ein höherer Eingangswiderstand in Neuronen der Schicht 2/3. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass der Mittelwert des Eingangswiderstandes in diesen Pyramidenzellen signifikant über dem der Schicht 5 - Pyramidenzellen liegt. Ebenso war das Ruhemembranpotenzial der Schicht 2/3 - Neurone signifikant negativer als das der Zellen in Schicht 5.

Bei der Überprüfung der ACh-Sensitivität fand sich in der Schicht 2/3 eine Gruppe von Neuronen (25 % aller getesteten Zellen), die nicht auf die Applikation von ACh

reagierten. Der Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften der ACh-sensitiven mit denen der ACh-insensitiven Zellen ergab, dass die Neurone ohne Reaktion, die alle als RS-Pyramidenzellen identifiziert wurden, ein negativeres mittleres Ruhemembranpotenzial und einen höheren mittleren Eingangswiderstand hatten. Zudem fand sich eine signifikant größere Entladungsfrequenz im Gleichgewicht. Somit existieren in der Schicht 2/3 des Neocortex der Maus zumindest zwei Pyramidenzellpopulationen, die sich in den elektrophysiologischen Eigenschaften und in ihrer ACh-Sensitivität unterscheiden.

Die Experimente haben gezeigt, dass die nikotinischen Rezeptoren, die die ACh-induzierten Antworten in den Neuronen der Schicht 2/3 vermittelten, überwiegend auf präsynaptischen Strukturen liegen müssen. Zudem ergab sich, dass es sich hier vor allem um Strukturen GABAerger Interneurone handeln muss (Soma, präsynaptische Terminale), da zum einen glutamaterge Rezeptorantagonisten den ACh-induzierten Membranstrom nicht beeinflussen konnten und zum anderen GABA_A-Rezeptorantagonisten in der Lage waren, diesen Strom drastisch zu reduzieren oder vollständig zu blockieren. Vor diesem Hintergrund sind folgende Gründe für die ACh-Insensitivität einer Gruppe von Pyramidenzellen in Schicht 2/3 denkbar:

(1) Es gibt eine geringe Anzahl an RS-Zellen im Neocortex, die nicht Pyramidenzellen, sondern GABAerge Interneurone sind und die außerdem nicht auf ACh reagieren (Kawaguchi 1993). Interneurone unterscheiden sich morphologisch deutlich von Pyramidenzellen, so dass man davon ausgehen kann, dass bei der Identifizierung der Neurone während des Experiments nur selten (wenn überhaupt) ein Interneuron anstatt einer Pyramidenzelle selektiert wurde. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die ausgewählte „ACh-insensitive“ Pyramidenzelle eben durch ein solches ACh-insensitives Interneuron GABAerg innerviert wurde. Diese Möglichkeit erlaubt folgende Spekulation: es existiert eine Gruppe von Pyramidenzellen in der Schicht 2/3 des Neocortex, die sich elektrophysiologisch von anderen Pyramidenzellen der gleichen Schicht unterscheidet und die zudem durch GABAerge Interneurone innerviert werden, die keine nAChR besitzen. Demzufolge gäbe es in dieser Schicht nAChR-positive und nAChR-negative neuronale Schaltkreise.

(2) Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass die nAChR auf den GABAergen Interneuronen sehr stark desensibilisierten.

4.2 Mögliche Mechanismen der nAChR-vermittelten Wirkung auf corticale Pyramidenzellen

4.2.1 Mechanismus in Cortexschicht 2/3

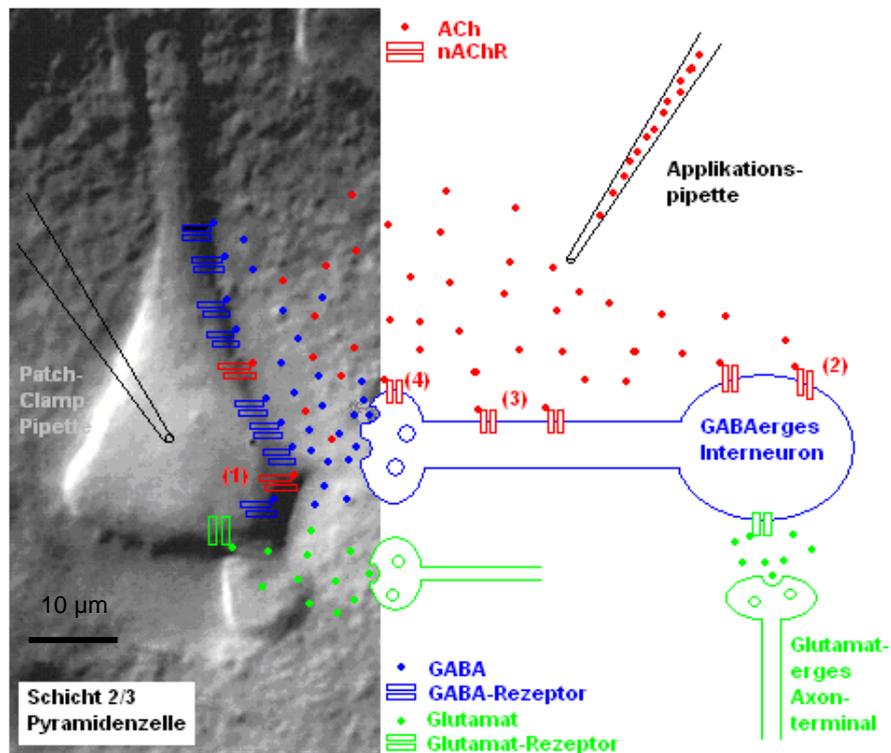


Abbildung 37: Darstellung des nAChR-vermittelten Mechanismus in Schicht 2/3.

(1) postsynaptische Lokalisation von nAChR auf dem Soma der Pyramidenzelle, (2) somatodendritische Lokalisation von nAChR auf einem der Pyramidenzelle vorgeschaltetem inhibitorischen Interneuron, (3) präterminal gelegene nAChR auf dem Axon eines inhibitorischen Interneurons und (4) präsynaptisch lokalisierte nAChR auf dem Axonterminal eines inhibitorischen Interneurons.

Durch ACh-Applikation (Applikationspipette in Abb. 37) in die Nähe einer Pyramidenzelle der Schicht 2/3 des Neocortex einer Maus, kann an eben diesem Neuron ein Einwärtsstrom registriert werden, der ungefähr eine Amplitude von -50 pA und eine Fläche von 30 nA*ms aufweist. Es gibt nun mehrere Möglichkeiten, wie es zu diesem Einwärtsstrom kommen kann (siehe Abbildung 37, rote Zahlen in Klammern):

(1) In mehreren elektrophysiologischen Studien wurden funktionelle postsynaptische nAChR auf neocorticalen Pyramidenzellen gefunden. So wiesen Zolles et al. (2009) auf dem Soma von Schicht 5 Pyramidenzellen des Neocortex der Ratte funktionelle nAChR nach. Roerig et al. (1997) beschrieben im Neocortex des Frettchens und Chu et al. (2000) im Neocortex der Ratte postsynaptische nAChR auf Pyramidenzellen. Für neocorticale Pyramidenzellen der Maus fehlte bisher ein solcher Nachweis.

Bei Aktivierung von postsynaptischen nAChR kommt es zu einem Einwärtsstrom. Dieser muss nach synaptischer Isolation der Neurone bestehen bleiben, da sich die Rezeptoren direkt in den Somata oder an den Dendriten der Pyramidenzellen befinden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der durch ACh hervorgerufene Membranstrom in Pyramidenzellen der Schicht 2/3 des Neocortex der Maus zum größten Teil nicht durch postsynaptische nAChR hervorgerufen wurde. Bei Applikation von Gabazin, einem GABA_A-Rezeptorblocker, kam es zu einer Amplitudenabnahme des Einwärtsstroms von bis zu 80 %. Dies zeigt, dass dieser ACh-induzierte Einwärtsstrom zum überwiegenden Teil aus einer GABAergen Komponente bestand. Der Reststrom (20 % der Gesamtamplitude) könnte durch einige wenige postsynaptische nAChR auf dem Soma der Pyramidenzelle verursacht worden sein. Denkbar sind auch nAChR an den distalen Dendriten der Pyramidenzelle, die bei ACh-Applikation lokal eine Depolarisation bzw. einen Einwärtsstrom erzeugen. Diese Veränderungen könnten aber auf Grund eines Dekrements oder der unvollständigen Kontrolle des Membranpotenzials während Voltage-Clamp-Ableitungen bei somatischer Messung nur schwach ausgeprägt oder gar nicht registrierbar sein.

Die große GABA_A-Rezeptor-vermittelte Komponente des ACh-induzierten Membranstromes in Schicht 2/3-Pyramidenzellen deutet daraufhin, dass der größte Teil der bei ACh-Applikation aktivierten nAChR auf GABAergen Interneuronen liegt, die der registrierten Pyramidenzelle vorgeschaltet sind. Man kann also davon ausgehen, dass die Dichte der postsynaptischen nAChR auf Schicht 2/3 - Pyramidenzellen im Neocortex der Maus gering ist.

(2) In mehreren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass es im Neocortex inhibitorische Interneurone gibt, auf denen funktionelle postsynaptische nAChR

somatodendritisch lokalisiert sind (McCormick und Prince 1986, Nicoll et al. 1996, Roerig et al. 1997, Xiang et al. 1998, Porter et al. 1999, Alkondon et al. 2000, Chu et al. 2000, Christophe et al. 2002, Couey et al. 2007). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Erregung der inhibitorischen Interneurone und folglich zu einer Inhibition der Pyramidenzellen, die von diesen Interneuronen innerviert werden. Eine ganze Reihe von Ergebnissen der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass der in Schicht 2/3 - Pyramidenzellen gemessene ACh-evozierte Einwärtsstrom indirekt durch Aktivierung von GABAergen Interneuronen entstand: **(a)** der Einwärtsstrom konnte zu 80 % durch GABA_A-Rezeptorantagonisten geblockt werden; **(b)** für die Patch-clamp Messungen wurde eine Pipettenlösung verwendet, deren Chloridkonzentration ungefähr der extrazellulären Chloridkonzentration (d.h. der in der ACSF) entsprach. Nach der Nernst-Gleichung würde man unter diesen Bedingungen (28°C) ein Chloridgleichgewichtspotenzial von -0.6 mV erwarten und Ströme, die durch Chlorid-permeable Kanäle vermittelt werden, sollten in Einwärtsrichtung fließen. Dies war bei den ACh-induzierten Membranströmen in Schicht 2/3 - Pyramidenzellen der Fall. Das Umkehrpotenzial dieser Ströme lag bei -10.2 mV, also nahe am berechneten Chloridgleichgewichtspotenzial; **(c)** eine Blockade von Na⁺-Kanälen durch TTX bewirkte bei ca. 30 % der Neurone eine Amplitudenreduktion des Einwärtsstroms von bis zu 90 % (TTX-sensitive Neurone). Eine Möglichkeit, dies zu erklären wäre, dass durch ACh-Applikation somatische und/oder dendritische nAChR auf den Interneuronen aktiviert wurden. Die dadurch hervorgerufenen Depolarisationen erzeugten, wenn sie überschwellig waren, GABA-Freisetzung an den Axonterminalen, die sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen in den registrierten Neuronen als Einwärtsstrom zeigt. In Gegenwart von TTX kann aber diese Übertragung auf Grund der Blockade der Aktionspotenziale nicht mehr stattfinden.

(3) Eine weitere Möglichkeit, die TTX-Sensitivität zu erklären, wären nAChR, die sich auf den Axonen der Interneurone, außerhalb des Terminalbereiches, befinden. Eine solche Lokalisation der nAChR bezeichnet man als präterminal gelegene Rezeptoren (Wonnacott 1997). Diese erzeugen bei Aktivierung ein Aktionspotenzial, das zum Axonterminal fortgeleitet wird und dort die Transmitterausschüttung faszilitiert. Werden die hierzu notwendigen Na⁺-Kanäle durch TTX blockiert, dann wird die Transmitterfreisetzung reduziert oder vollständig unterdrückt.

Die vorliegenden Versuchsdaten erlauben es nicht, zwischen den unter (2) und (3) beschriebenen Mechanismen zu unterscheiden. Die TTX-Sensitivität der nAChR-vermittelten Membranströme in Schicht 2/3-Pyramidenzellen des Neocortex der Maus kann also auf der Aktivierung von somatischen/dendritischen nAChR und/oder von präterminalen nAChR vorgeschalteter GABAerger Interneurone beruhen.

(4) Ungefähr 70 % der in dieser Arbeit untersuchten Pyramidenzellen der Schicht 2/3 zeigten keine Veränderungen der ACh-induzierten Einwärtsströme nach TTX-Gabe. Damit ist eine somatisch/dendritische und eine präterminale Lokalisation der hierbei aktivierten nAChR auf den vorgeschalteten GABAergen Interneuronen ausgeschlossen. Wonnacott (1997) und Jones et al. (1999) beschrieben im cerebralen Cortex sogenannte präsynaptische nAChR. Diese liegen direkt in der Membran der Axonterminalen von inhibitorischen Interneuronen und können entweder die Transmitterfreisetzung faszilitieren oder, v.a. im Fall der stark Calcium-permeablen α_7 -homopentameren Rezeptoren, die Transmitterfreisetzung induzieren. Im Falle der Freisetzungsenduktion wären auf Grund der Calcium-Permeabilität und der depolarisierenden Wirkung der nAChR keine Natriumkanäle für die Transmitterausschüttung notwendig, was die TTX-Insensitivität des Vorgangs erklärt. Es besteht also einiger Grund zur Annahme, dass die nAChR-vermittelten Membranströme in Schicht 2/3-Pyramidenzellen des Neocortex der Maus auf der Aktivierung von präsynaptischen nAChR beruhen, die sich auf den Axonterminalen GABAerger Interneurone befinden.

Zusammenfassend ergibt sich also für die Pyramidenzellen der Schicht 2/3 des Neocortex der Maus folgendes Bild: Die Dichte der postsynaptischen nAChR auf diesen Neuronen scheint gering zu sein, da durch pharmakologische synaptische Isolation der Zellen der größte Teil der Stromantwort blockiert werden konnte. Der überwiegende Anteil des Stromes wurde durch Aktivierung von den Pyramidenzellen vorgeschalteten GABAergen Interneuronen hervorgerufen. Sehr wahrscheinlich spielen hierbei präsynaptische nAChR auf den Axonterminalen der Interneurone die größte Rolle.

4.2.2 Mechanismus in Schicht 5

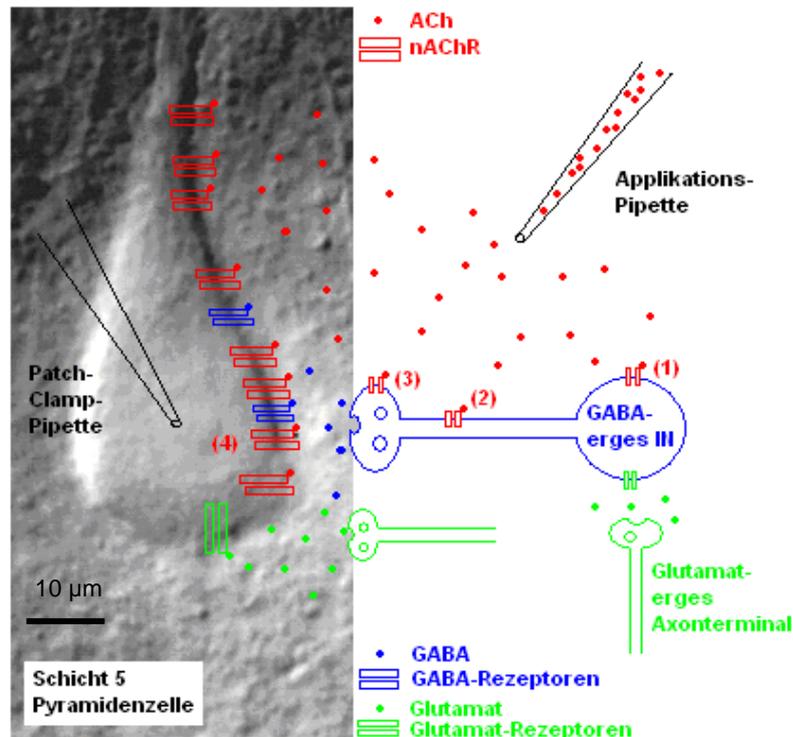


Abbildung 38: Darstellung des nAChR-vermittelten Mechanismus in Schicht 5

(1) Somatodendritisch gelegene nAChR, (2) präterminal lokalisierte nAChR und (3) präsynaptisch gelegene nAChR auf einem inhibitorischen Interneuron. (4) Postsynaptisch lokalisierte nAChR auf dem Soma und dem Dendritenbaum einer Pyramidenzelle

Prinzipiell muss man auch hier wieder vier mögliche Mechanismen, die zur Entstehung des Einwärtsstromes führen können, unterscheiden (siehe Abbildung 38, rote Zahlen in Klammern):

(1), (2) und (3) Denkbar wäre auch hier die Aktivierung von nAChR, die auf vorgeschalteten inhibitorischen Interneuronen lokalisiert sind.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass nach Blockade der GABA_A-Rezeptoren (in Gegenwart von Glutamatrezeptorantagonisten) sich die Amplitude des gemessenen Einwärtsstromes um ca. 15 % reduzierte, was auf eine kleine GABAerge Komponente, vermittelt durch Interneurone, hindeutet. Wurde nach Applikation der GABA_A-Rezeptorantagonisten zusätzlich TTX appliziert, kam es zu

einer weiteren Reduktion der Amplitude (um 15 %), für die es im Augenblick keine Erklärung gibt.

(4) Bei gleichzeitiger Applikation von muskarinischen Antagonisten (Atropin), Glutamatrezeptorantagonisten (D-AP5, CNQX), GABA_A-Rezeptorantagonisten (Gabazin, Bicucullin) und TTX kann man davon ausgehen, dass das untersuchte Neuron weitgehend synaptisch isoliert ist. Der Einwärtsstrom, der nach ACh-Applikation in die Nähe der Somata der abgeleiteten Neurone beobachtet wurde, kann also nur auf der Aktivierung von postsynaptischen nAChR beruhen, die sich in der Somamembran der Pyramidenzellen befinden.

Somit wurden ca. 70 % des ACh-induzierten Einwärtsstromes in Schicht 5 Pyramidenzellen durch postsynaptische nAChR vermittelt. Bei den restlichen 30% handelte es sich um eine präsynaptische Komponente, wobei v.a. GABAerge Interneurone von Bedeutung zu sein scheinen.

Der postsynaptische nAChR-vermittelte Membranstrom in Schicht 5 - Pyramidenzellen wies ein Umkehrpotenzial von 33.9 mV auf, was für einen kationenleitenden Kanal (Na⁺, K⁺ und Ca²⁺), wie den nAChR, spricht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die initiale Stromkomponente die bereits bekannte Einwärtsrektifikation der nikotinischen Ströme aufwies (Haghighi und Cooper 1998; Christophe et al. 2002).

In den Pyramidenzellen der Schicht 5 des Neocortex der Maus besteht der durch ACh hervorgerufene Einwärtsstrom zum überwiegenden Teil (70%) aus einer Komponente, die auf Aktivierung von postsynaptischen nAChR beruht. Der durch präsynaptische Mechanismen vermittelte Anteil ist gering.

4.3 Verteilung der funktionellen nAChR-Subtypen in beiden Cortexschichten

4.3.1 Verteilung in Schicht 2/3

Um die Subtypen der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren zu bestimmen, wurden die selektiven nAChR-Antagonisten MLA und DHβE verwendet. MLA ist in einer

Konzentration ≤ 10 nM ein selektiver Antagonist an α_7 -nAChR (Berg und Conroy 2002; Raggenbass und Bertrand 2002). $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren dagegen sind insensitiv gegenüber MLA, werden aber selektiv durch DH β E in einer Konzentration von 10 μ M blockiert (Zoli et al. 1998, Raggenbass und Bertrand 2002).

In Schicht 2/3 handelte es sich bei dem durch ACh-Applikation hervorgerufenen Einwärtsstrom zu 80 % um einen durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Membranstrom. Die nAChR, die durch ACh aktiviert werden, sitzen auf GABAergen Interneuronen und faszilitieren deren Transmitterfreisetzung. Die verbleibenden 20 % des Stromes beruhen wahrscheinlich auf postsynaptischen nAChR der Pyramidenzelle selbst. Der Membranstrom bestand aus einer initialen schnellen Komponente, einer späten langsamen Komponente oder aus einer Kombination von beiden. Es handelte sich hier zwar hauptsächlich um einen GABAergen Strom, sein Zeitverlauf wird aber durch den Zeitverlauf der nikotinergen Ströme in den Interneuronen festgelegt (Alkondon und Albuquerque 1993).

In dieser Arbeit wurden bei 4 Schicht 2/3 - Pyramidenzellen Typ IB – Ströme mit MLA und DH β E geblockt. Die Amplitude konnte durch MLA um ca. 75 % reduziert werden, die Fläche wurde durch DH β E um ca. 90 % geblockt. Somit sind für die schnelle Komponente des Typ IB – ähnlichen Stroms in Schicht 2/3 Pyramidenzellen α_7 -Untereinheiten des nAChR und für die langsame Komponente $\alpha_4\beta_2$ -Untereinheiten verantwortlich. Ebenso konnte bei 4 weiteren Neuronen, die nur einen Typ II – Strom zeigten, allein durch Applikation von DH β E sowohl die Amplitude als auch die Fläche um ca. 80 % reduziert werden. Also können für diese Stromart nur $\alpha_4\beta_2$ -nAChR verantwortlich gemacht werden. Letztendlich konnte damit wahrscheinlich gemacht werden, dass GABAerge Interneurone der Schicht 2/3 des Neocortex der Maus sowohl α_7 - als auch $\alpha_4\beta_2$ -Untereinheiten besitzen. Diese können somatodendritisch, präterminal oder präsynaptisch lokalisiert sein. Durch Aktivierung dieser Rezeptoren wird die Transmitterfreisetzung der inhibitorischen Interneurone faszilitiert, wodurch es zu einer Inhibition von Pyramidenzellen in Schicht 2/3 kommt.

4.3.2 Verteilung in Cortexschicht 5

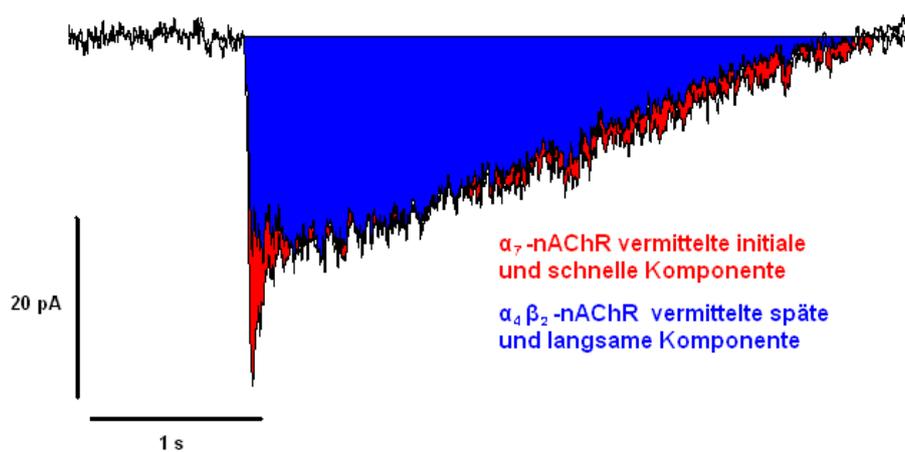
Nachdem diese Pyramidenzellen vollständig synaptisch isoliert worden waren, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um einen postsynaptischen Strom handelte, der durch Aktivierung von nAChR auf dem Soma der Pyramidenzellen hervorgerufen wurde. Es konnten also die Untersuchungen direkt an nikotinergen Strömen durchgeführt werden. Diese hatten die gleichen Zeitverläufe wie sie bei Alkondon und Albuquerque (1993) für hippocampale Pyramidenzellen beschrieben wurden. In Schicht 5 - Pyramidenzellen fanden sich drei Stromtypen: Typ IA, Typ IB und Typ II, wobei der größte Anteil durch den Typ IB – Strom gestellt wurde.

Pharmakologisch wurde der Membranstrom durch alternierende Applikation von MLA und DH β E charakterisiert. Bei Applikation von MLA konnte die Amplitude, die die initiale und schnelle Antwort darstellt, um ca. 80 % reduziert werden, die Fläche um ca. 40 %. DH β E verminderte die Amplitude um ca. 25 % und die Fläche um ca. 60 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die schnelle, v.a. MLA-sensitive Komponente hauptsächlich durch die Aktivierung von α_7 -nAChR, bis zu einem gewissen Grad aber auch durch die Aktivierung von $\alpha_4\beta_2$ -nAChR erzeugt wird. Bei der langsamen, späten Komponente ist es umgekehrt. Diese wird zum größten Teil durch $\alpha_4\beta_2$ -nAChR vermittelt, wobei aber auch α_7 -nAChR ca. 40 % zur gesamten Fläche beitragen. In Abbildung 39 werden zwei Beispielneurone gezeigt, bei denen durch Applikation von MLA und DH β E die beteiligten nAChR-Subtypen identifiziert und deren Anteile am Membranstrom farblich hinterlegt wurden.

Bei Neuron A wird fast der gesamte Einwärtsstrom von $\alpha_4\beta_2$ -nAChR vermittelt, inklusive der initialen schnellen Stromantwort. Neuron B dagegen antwortete auf ACh-Applikation mit einem Einwärtsstrom, der zum größten Teil von α_7 -nAChR vermittelt wurde. Vor allem die schnelle initiale Komponente wurde fast ausschließlich von diesem Rezeptorsubtyp bestimmt.

Damit wird gezeigt, dass auf Schicht 5 - Pyramidenzellen zwei verschiedene Subtypen des nAChR vorhanden sind, die α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -Subtypen. Diese beiden Subtypen kommen aber in unterschiedlicher Häufigkeit und Verteilung auf den Pyramidenzellen vor, so dass die Einwärtsströme meist von einem Subtyp dominiert werden.

A



B

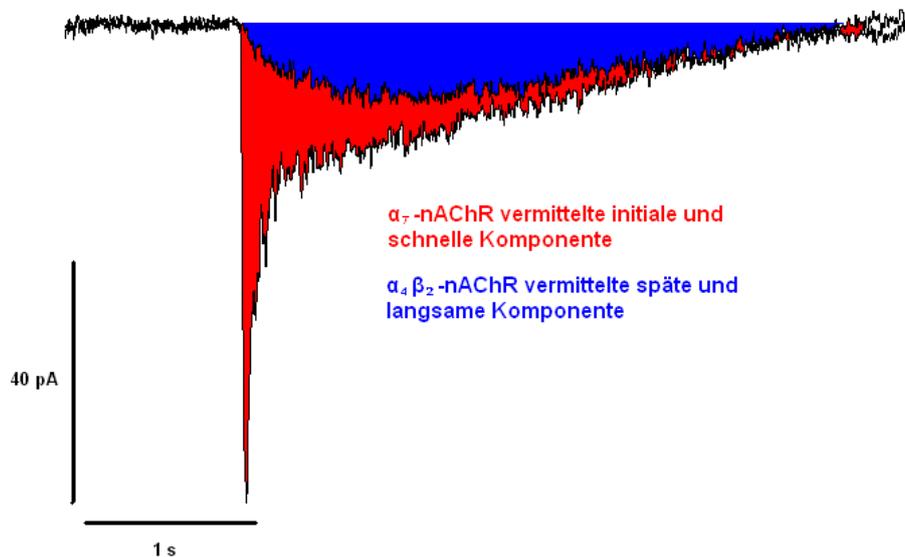


Abbildung 39: Darstellung der Anteile der α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -nAChR am Gesamtstrom.

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung wurde zwischen der MLA-sensitiven und somit α_7 -nAChR vermittelten und der DH β E-sensitiven, $\alpha_4\beta_2$ -vermittelten Komponente unterschieden und deren Stromanstiegszeiten sowie Stromabfallszeiten mit zwei Zeitkonstanten bestimmt. Die Stromanstiegszeit der initialen Komponente lag im Bereich von 20 ms und war somit wesentlich schneller als die der späten Komponente mit 650 ms. Die schnelle Zeitkonstante der Stromabfallszeit konnte nur für die MLA-sensitive Komponente gemessen werden und betrug 60 ms. Die langsame Zeitkonstante war jedoch bei beiden Komponenten nachzuweisen und war bei der schnellen Komponente mit 1 s deutlich, wenn auch nicht signifikant schneller als bei der langsamen Komponente mit 10 s. Diese

Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Zolles et al. (2009), deren Werte hierfür in ähnlichen Bereichen lagen.

4.4 Desensitisierung der nAChR

Nikotinische AChRs zeigen eine schnelle und ausgeprägte Desensitisierung nach einer anhaltenden oder wiederholten Applikation von nikotinischen Agonisten (Zoli et al. 1998, Quick und Lester 2002; Guo und Lester 2007).

In dieser Arbeit konnte bei Schicht 2/3 - Pyramidenzellen nach fünf Applikationen in einem Abstand von 8 s eine Reduktion der Amplitude um 30% und der Fläche um 70% beobachtet werden. Die Ausprägung der Desensitisierung zeigte sich bei der Maus weniger stark als bei der Ratte (Zolles et al. 2009). Mögliche Gründe für diese Diskrepanz sind: **(1)** Der nAChR benötigt ca. 10 s, um aus dem desensitisierten Zustand in den aktivierbaren Zustand zurückzugelangen (Quick und Lester 2002). Bei einem Applikationsintervall von 8 s könnte ein signifikanter Anteil der nAChR wieder in den aktivierbaren Zustand übergegangen sein. Zolles et al. (2009) haben an Schicht 5 - Pyramidenzellen der Ratte Applikationsintervalle von 5 s verwendet und auf diese Weise einen größeren Anteil an nAChR im desensitisierten Zustand registrieren können. **(2)** In Schicht 2/3 - Pyramidenzellen beinhaltet der ACh-induzierte Strom eine starke GABAerge Komponente. Es besteht nun die Möglichkeit, dass die Aktivierung der nAChR auf den GABAergen Interneuronen nicht 1:1 in eine Stromantwort der Pyramidenzellen umgesetzt wird. Existiert ein großer Verstärkungsfaktor (d.h. wenige nAChR der Interneurone produzieren starke Ströme in den Pyramidenzellen), dann kann es sein, dass selbst bei Desensitisierung eines signifikanten Anteils der nAChR keine Veränderung des Stromes in den Pyramidenzellen beobachtet werden kann. **(3)** Die nAChR sind in hohem Maße Calcium-permeabel. Dieser Ca^{2+} -Einstrom könnte ein physiologischer Regulator der nAChR-Desensitisierung sein. Es wurde beschrieben, dass v.a. die Geschwindigkeit der Erholung von der Desensitisierung durch Ca^{2+} beeinflusst wird (Fenster et al. 1997). Calcium beschleunigt diesen Vorgang, was zur Folge hat, dass die Desensitisierung weniger stark ausfällt. **(4)** Ferner ist bekannt, dass durch Proteinphosphorylierung die Übergangsrate vom aktivierten zum desensitisierten

Zustand beeinflusst werden kann (Quick und Lester 2002). Phosphorylierte Rezeptoren kehren schneller aus dem desensitisierten Zustand in den aktivierbaren Zustand zurück. Dies hätte zur Folge, dass es bei synaptischer Stimulation mit hoher Frequenz nicht zu einer Kumulation von desensitisierten Rezeptoren kommen würde (Paradiso und Brehm 1998). Schließlich kann die Phosphorylierung noch dazu führen, eine Balance zwischen dem desensitizierbaren und aktivierbaren Zustand des Rezeptors in Abwesenheit eines Liganden herzustellen (Fenster et al. 1999a). Insgesamt könnte der Phosphorylierung von nAChR folgende Funktion zugesprochen werden: Indem die Zahl der verfügbaren Rezeptoren an einer Synapse reguliert wird, kann die synaptische Funktion ohne den Bedarf an neuen Rezeptoren moduliert werden (Galzi und Changeux 1995). Inwiefern dies auf die Projektion von GABAergen Interneuronen auf Pyramidenzellen zutrifft, ist nicht geklärt. Die Langzeitinaktivierung des Rezeptors, möglicherweise auch in Verbindung mit der Phosphorylierung, spielt vielleicht eine große Rolle bei der Funktion und Dysfunktion der neuronalen nAChR (Lester und Dani 1994).

Auch in den Schicht 5 - Pyramidenzellen der Maus war die Desensitisierung der nAChR nicht sehr stark ausgeprägt. Hier kam es nach fünf Applikationen mit einem Intervall von 8 s und einer Applikationsdauer von 100 ms zu einer durchschnittlichen Amplitudenreduktion von ca. 40% und einer Flächenreduktion von ca. 30%. Auch hier könnte das für die Versuche gewählte Intervall von 8 s möglicherweise zu lang gewesen sein. Andererseits könnten bezüglich der Desensitisierung von nAChR aber auch Unterschiede zwischen den Spezies bestehen.

4.5 Physiologische und klinische Relevanz von post- und präsynaptischen nAChR

4.5.1 Mögliche Relevanz von präsynaptischen nAChR auf GABAergen Interneuronen der Cortexschicht 2/3

Nikotinische AChR auf GABAergen Interneuronen sind an inhibitorischen und disinhibitorischen Mechanismen im Cortex beteiligt (Alkondon et al. 2000). Zum einen stellen GABAerge Interneurone direkte synaptische Verbindungen mit Pyramidenzellen her. Durch Aktivierung von nAChR auf den Interneuronen kommt es

zu einer Transmitterfreisetzung aus diesen und folglich zu einer Hemmung der nachgeschalteten Neurone. In diesem Fall könnten nAChR dazu dienen, das Signal-Rausch-Verhältnis in neocorticalen Kreisläufen zu verbessern. Besteht eine synaptische Verbindung an den Dendriten der Pyramidenzellen, könnten durch nAChR aktivierte Interneurone eingehende dendritische exzitatorische Impulse kurzschließen.

Andererseits können nAChR-besetzte GABAerge Interneurone wiederum neocorticale Interneurone inhibieren, was zu einer Faszilitierung eines exzitatorischen Signals in der Pyramidenzelle führt. Mit Hilfe dieses disinhibitorischen Mechanismus könnte die Aktivierung von nAChR auf inhibitorischen Interneuronen über zwischengeschaltete andere Interneurone zu einer synaptischen Verstärkung führen, wie sie bei der Langzeitpotenzierung gesehen wird, dem vermeintlichen Korrelat des Lernens und des Gedächtnisses.

Nachdem Alkondon et al. (2000) diesen Sachverhalt schon im Cortex des Menschen beschrieben haben, konnte dies jetzt auch in Schicht 2/3 des Neocortex der Maus gezeigt werden. Somit scheint die nAChR-vermittelte GABA_A-Freisetzung ein wichtiger Mechanismus zu sein, mit welchem das cholinerge System die Neuronenaktivität in neocorticalen Kreisläufen reguliert.

Die cholinerge Innervation des Neocortex der Ratte entstammt der CH4 Zellgruppe des Nucleus basalis Meynert (NbM) (Mesulam et al. 1983, Everitt et al. 1988). Diese Fasern folgen verschiedenen Bahnen zwischen dem NbM und dem Neocortex (Selden et al. 1998). Sie treten in den Cortex ein und verlaufen anfangs in der Schicht 6 und enden in den Schichten 5 und 1 (Kristt et al. 1985). In Schicht 1 herrscht die höchste Dichte an ACh-positiven Axonen und Varicositäten (Mechawar et al. 2000) und könnte deshalb die Hauptlokalisation des ACh-Inputs in den Neocortex darstellen. Die Zellen, die in Schicht 1 durch ACh aktiviert werden, sind GABAerge Interneurone (Winer und Larue 1989, Li und Schwark 1994, Prieto et al. 1994, Gabbott und Bacon 1997), welche auf ihrem Soma sowohl α_7 - als auch nicht- α_7 -nAChR besitzen (Christophe et al. 2002). Diese kontaktieren hauptsächlich „Nicht-Pyramidenzellen“ der Schicht 2/3 (Christophe et al. 2002). Obwohl die Identität dieser Zellen noch nicht eindeutig geklärt ist, bleibt anzunehmen, dass es sich hierbei wieder um GABAerge Interneurone handelt, die auf Pyramidenzellen der Schicht 2/3

projizieren. Somit kommt es durch die cholinerge Aktivierung der Schicht 1 - Interneurone zu einer Disinhibition der Pyramidenzellen in darunterliegenden Schichten (Alkondon et al. 1997a, Albuquerque et al. 2000). Diese Disinhibition könnte synaptische Kurz- und Langzeitplastizität fördern.

Die hier gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass auch die GABAergen Interneurone in Schicht 2/3 somatodendritische nAChR besitzen, die aber unter physiologischen Bedingungen kaum angesprochen werden, da die cholinerge Innervation hauptsächlich in Schicht 1 endet.

Wie schon erwähnt, gibt es einige neurologische Störungen, deren Pathogenese mit der Fehlfunktion von neuronalen nAChR zumindest teilweise erklärt werden können. So können z.B. Schizophreniepatienten auditorische Informationen nicht selektieren. Diese Fähigkeit wird normalerweise zum Teil durch GABAerge Interneurone vermittelt, die präsynaptische nAChR besitzen (Weinberger 1997, van Kammen et al. 1998). Eine der möglichen Mechanismen, die für die Alzheimer- oder die Parkinsonkrankheit verantwortlich sein sollen, ist die Glutamat-vermittelte Excitotoxizität. Diese kann durch nAChR-induzierte GABA-Freisetzung aus Interneuronen gesteuert werden (Dalack et al. 1998). Auch in der Epileptogenese spielen nAChR-besetzte Interneurone eine Rolle (Elmslie et al. 1997, Kuryatov et al. 1997).

4.5.2 Mögliche Relevanz von postsynaptischen nAChR auf Pyramidenzellen der Cortexschicht 5

Pyramidenzellen der Schicht 5 im Neocortex der Ratte besitzen funktionelle postsynaptische nAChR (Zolles et al. 2009). Dies konnte in dieser Arbeit auch für Schicht 5 - Pyramidenzellen des Neocortex der Maus nachgewiesen werden.

Wie oben beschrieben, schickt die CH4 Zellgruppe des Nucleus basalis Meynert cholinerge Fasern unter anderem direkt in die Schicht 5 des Neocortex. Die meisten dieser Fasern bilden Synapsen an Dendritenästen, aber auch an Zellsomata von Schicht 5 - Pyramidenzellen (Houser et al. 1985, Turrini et al. 2001) und faszilitieren deren Aktivität. Da diese Zellen die größte Efferenz aus dem Cortex darstellen, kann man sagen, dass ACh die höheren mentalen Funktionen durch die Modulation dieser Pyramidenzellen kontrolliert (Turrini et al. 2001). Auch die Tatsache, dass unter den

gefundenen postsynaptischen nAChR solche vom α_7 -Typ sind, führt zu der Annahme, dass ACh die glutamaterge synaptische Übertragung von Schicht 5 - Pyramidenzellen faszilitiert oder disfaszilitiert. Tatsächlich gibt es einige Studien, die Beweise dafür liefern, dass die Aktivierung von nAChR neocorticale Plastizität beeinflusst (Aramakis und Metharate 1998, Hasselmo 2006, Levy et al. 2006, Couey et al. 2007, Rozsa et al. 2008).

Eine Beeinträchtigung des cholinergen Systems des Neocortex könnte mitunter für kognitive Defizite verantwortlich sein, die während des normalen Alterns und bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, auftreten.

5 Zusammenfassung

I. In Schicht 2/3 und in Schicht 5 des Neocortex der Maus wurde mit Hilfe von Patch-clamp Messungen die Wirkung der Aktivierung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) auf diese Zellen untersucht. Die Neurone wurden mittels DIC-Mikroskopie anhand der Form ihrer Somata morphologisch identifiziert und elektrophysiologisch charakterisiert. In beiden Schichten handelte es sich um sogenannte regulär feuernde Neurone, wobei ein Schichten-spezifischer Unterschied des Entladungsverhaltens festgestellt wurde.

II. Bei der Untersuchung der Wirkung von lokal appliziertem Acetylcholin (ACh) auf die neocorticalen Neurone, in Gegenwart des muskarinischen Antagonisten Atropin, zeigte sich, dass 25 % der Schicht 2/3 - Pyramidenzellen nicht auf ACh-Applikation reagierten. Dagegen antworteten nahezu alle untersuchten Neurone der Schicht 5 auf die ACh-Applikation mit einem Einwärtsstrom. Die Gruppe der ACh-insensitiven Pyramidenzellen in Schicht 2/3 unterschied sich in ihrem Entladungsverhalten von der Gruppe der ACh-sensitiven Neurone.

III. In allen untersuchten Neuronen fanden sich ACh-induzierte Membranströme, die sich in ihrem Zeitverlauf unterschieden: **(1)** Einwärtsströme mit schnellem Anstieg und Abfall (Typ IA), **(2)** Einwärtsströme mit langsamen Anstieg und Abfall (Typ II) und **(3)** Einwärtsströme, die sich aus schnellen und langsamen Komponenten zusammensetzten (Typ IB). In Schicht 2/3 - Pyramidenzellen traten die unterschiedlichen Stromtypen gleichmäßig verteilt auf, während in den Schicht 5-Pyramidenzellen fast nur der Typ IB - Strom zu finden war. Auch waren in den Schicht 5 - Zellen sowohl Stromamplitude als auch Stromfläche größer.

IV. Nach synaptischer Isolation der Neurone durch Applikation von Glutamat- und GABA-Rezeptorantagonisten sowie des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin (TTX) ergab sich, dass der ACh-induzierte Membranstrom in den Schicht 2/3 - Pyramidenzellen eine ausgeprägte GABAerge Komponente aufwies (80 % des Gesamtstromes). Das bedeutet, dass die durch ACh aktivierten nAChR nicht auf den Pyramidenzellen lagen, sondern auf vorgeschalteten GABAergen Interneuronen. In den Schicht 5 - Pyramidenzellen war die GABAerge Komponente wesentlich geringer

(20 %). Bei diesen Neuronen ergab sich, dass der ACh-induzierte Membranstrom durch postsynaptische nAChR vermittelt wurde.

V. In den Schicht 2/3 - Pyramidenzellen wurde eine Stromkomponente beobachtet, die sensitiv gegenüber GABA_A-Rezeptorantagonisten war, aber nicht gegenüber TTX. Hier handelte es sich wahrscheinlich um einen Membranstrom, der durch Aktivierung von Calcium-permeablen, präsynaptischen nAChR entstand.

VI. Zur Differenzierung der nAChR-Subtypen, die an der Generierung der ACh-induzierten Membranströme beteiligt waren, wurden die selektiven nikotinischen Antagonisten Methyllycaconitin (MLA, ≤ 10 nM, selektiv für α_7 -homopentamere Rezeptoren) und Dihydro- β -Erythroidin (DH β E, 1- 10 μ M, selektiv v.a. für den $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp) verwendet. In Schicht 2/3 - Pyramidenzellen konnten die schnellen Stromkomponenten durch MLA und die langsamen Komponenten durch DH β E signifikant reduziert werden. Die pharmakologische Charakterisierung der Einwärtsströme in Schicht 5 - Pyramidenzellen, ergab entsprechend der zusammengesetzten Natur der Ströme eine MLA-sensitive und eine DH β E-sensitive Komponente.

VII. Bei repetitiver Applikation von ACh fand sich nur eine geringe Reduktion der Membranströme, was für eine mäßig ausgeprägte Desensibilisierung der nAChR spricht.

VIII. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Schicht 2/3 - Pyramidenzellen nur eine geringe Dichte an funktionellen postsynaptischen Rezeptoren aufweisen. Die Membranströme, die nach Applikation von ACh in Gegenwart von Atropin in diesen Zellen beobachtet werden können, entstehen zum überwiegenden Teil durch Aktivierung von nAChR auf vorgeschalteten GABAergen Interneuronen. Die nAChR auf den Interneuronen können dem α_7 -Subtyp und wahrscheinlich dem $\alpha_4\beta_2$ -Subtyp zugeordnet werden. Schicht 5 - Pyramidenzellen haben eine hohe Dichte an funktionellen postsynaptischen nAChR. Ein großer Teil des Membranstromes (70 %), der durch ACh induziert wird, kann auch noch nach vollständiger synaptischer Isolierung der Neurone gemessen werden. Dieser Schichten-spezifische Unterschied

spricht für unterschiedliche Funktionen von nAChR in den neuronalen Schaltkreisen der infra- und der supragranulären Cortex-Schichten.

6 Literaturverzeichnis

Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EF, Castro NG, Schratzenholz A, Barbosa CT, et al.

Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Pharmacological characterization and modulation of synaptic function.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 280:1117-1136

Albuquerque EX, Pereira EF, Mike A, Eisenberg HM, Maelick A, Alkondon M

Neuronal nicotinic receptors in synaptic function in humans and rats : physiological and clinical relevance.
Behav Brain Res. 2000; 113:131-141

Alkondon M, Albuquerque EX

Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. Part I: Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993; 265:1455-1473

Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX

Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices.
J Pharmacol Exp Ther. 1997a; 283:1396-1411

Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX

Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons.
Eur J Neurosci. 1997b; 9:2734-2742

Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX

Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks.
J Neurosci. 2000; 20:66-75

Aramakis VB, Metherate R

Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex.
J. Neurosci. 1998; 18:8485-8495

Bean BP

The action potential in mammalian central neurons.
Nature Reviews Neurosci. 2007; 8:451-465

Beaulieu C, Somogyi P

Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat.
J Comp Neurol. 1991; 304:666-680

Benwell ME, Balfour DJ, Anderson JM

Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain.

J Neurochem. 1988; 50:1243-7

Berg DK, Couroy WG

Nicotinic alpha7 receptors: synaptic options and downstream signaling in neurons.

J. Neurobiol. 2002; 53:512-523

Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Bertrand S, Changeux JP

Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha7 nicotinic receptor.

Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90:6971-6975

Bertrand D, Valera S, Bertrand S, Ballivet M, Rungger D

Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors.

Neuroreport. 1991; 2:227-280

Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC, Leonard S

Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 282:7-13

Broide RS, O'Connor LT, Smith MA, Smith JA, Leslie FM

Developmental expression of alpha7 neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus.

Neuroscience. 1995; 67:83-94

Butcher LL, Semba K

Reassessing the cholinergic basal forebrain: nomenclature schemata and concepts.

Trends Neurosci. 1989; 12:483-485

Castro NG, Albuquerque EX

Alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability.

Biophys. J. 1995; 68:516-524

Charpantier E, Barnéoud P, Moser P, Besnard F, Sgard F

Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area.

Neuroreport. 1998; 9:3097-3101

Christophe E, Roebuck A, Staiger JF, Lavery DJ, Charpak S, Audinat E

Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons.

J Neurophysiol. 2002; 88:1318-1327

Chu ZG, Zhou FM, Hablitz JJ

Nicotinic acetylcholine receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex.

Brain Res. 2000; 887: 399-405

Cimino M, Marini P, Fornasari D, Cattabeni F, Clementi F

Distribution of nicotinic receptors in cynomolgus monkey brain and ganglia: Localization of alpha3 subunit mRNA, alpha-bungarotoxin and nicotine binding sites.

Neuroscience. 1992; 51:77-86

Clarke PB, Reuben M

Release of ^3H noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal ^3H dopamine release.

Br. J. Pharmacol. 1996; 117:595-606

Clarke PB, Schwartz RD, Paul SM, Pert CB, Pert A

Nicotinic binding in rat brain: Autoradiographic comparison of ^3H acetylcholine, ^3H nicotine and ^{125}I -alpha-bungarotoxin.

J Neurosci. 1985; 5:1307-1315

Connors BW, Gutnick MJ.

Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons.

Trends Neurosci. 1990; 13:99-104

Connors BW, Gutnick MJ, Prince DA

Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro.

J Neurophysiol. 1982 Dec;48(6):1302-20

Connors BW, Malenka RC, Silva LR

Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABA_A and GABA_B receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat.

Journal of Physiology; 1988; 406:443-468

Conroy WG, Berg DK

Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions.

J. Biol. Chem. 1995; 9:4424-4431

Conroy WG, Vernallis AB, Berg DK

The alpha5 gene product assembles with multiple acetylcholine receptor subunits to form distinctive receptor subtypes in brain.

Neuron. 1992; 9:679-691

Cooper E, Couturier S, Ballivet M

Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal acetylcholine receptor

Nature. 1991; 350:235-238

Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP

Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice.

Trends Pharmacol Sci. 2000; 21:211-217

Couey JJ, Meredith RM, Spijker S, Poorthuis RB, Smit AB, Brussaard AB, Mansvelder HD

Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex.
Neuron. 2007; 54:73-87

Court J, Clementi F

Distribution of nicotinic subtypes in human brain.
Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1995; 9:6-14

Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M

A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homooligomeric channel blocked by α -BTX.
Neuron. 1990; 5:847-856

Dalack GW, Healy DJ, Meador-Woodruff JH

Nicotine dependence in schizophrenia: clinical phenomena and laboratory findings.
Am J Psychiatry. 1998; 155: 1490-1501

Dani JA

Properties underlying the influence of nicotinic receptors on neuronal excitability and epilepsy.
Epilepsia. 2000; 41:1063-1065

Dani JA

Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system.
Biol Psychiatry. 2001; 49:166-174

Dani JA, Heinemann S

Molecular and cellular aspects of nicotine abuse.
Neuron. 1996; 16:905-908

Dani JA, Mayer ML

Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors.
Curr. Opin. Neurobiol. 1995; 5:310-317

Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI

Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas.
Eur. J. Pharmacol. 2000; 393:31-38

Decker ER, Dani JA

Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant.
J. Neurosci. 1990; 10:3413-3420

Degenetais E, Thierry A-M, Glowinski J, Gioanni Y

Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: An in vivo intracellular recording study.
Cerebral Cortex. 2002; 12:1-16

Descarries L, Aznavour N, Hamel E

The acetylcholine innervation of cerebral cortex: new data on its normal development and its fate in the hAPP(SW, IND) mouse model of Alzheimer's disease.
J. Neural Transm. 2005; 112:149-162

Dilger JP, Liu Y

Desensitization of acetylcholine receptors in BC3H-1 cells.
Pflugers Arch. 1992; 420:479-485

Eckenstein FP, Baughman RW, Quinn J

An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex.
Neuroscience. 1988; 25:457-474

Elmslie FV, Rees M, Williamson MP, Kerr M, Kjeldsen MJ, Pang KA, Sundqvist A, Friis ML, Chadwick D, Richens A, Covanis A, Santos M, Arzimanoglou A, Panayiotopoulos CP, Curtis D, Whitehouse WP, Gardiner RM

Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q.
Hum Mol Genet. 1997; 6: 1329-1334

Everitt BJ, Sirkia TE, Roberts AC, Jones GH, Robbins TW

Distribution and some projections of cholinergic neurons in the brain of the common marmoset *Callithrix jacchus*.
J Comp Neurol. 1988; 271: 533-558

Fairclough RH, Josefs R, Richman DP

Imaging ligand binding sites on the Torpedo acetylcholine receptor.
Ann. N Y Acad. Sci. 1993; 681:113-125

Fenster CP, Beckman ML, Parker JC, Sheffield EB, Whitworth TL, Quick MW, Lester RA

Regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C.
Mol Pharmacol. 1999a; 55:432-443

Fenster CP, Hicks JH, Beckman ML, Covernton PJ, Quick MW, Lester RA

Desensitization of nicotinic receptors in the central nervous system.
Ann N Y Acad Sci. 1999; 868:620-623

Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA

Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine.
J Neurosci. 1997; 17: 5747-5759

Franke C, Hatt H, Parnas H, Dudel J

Recovery from the rapid desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channels on mouse muscle.

Neurosci Lett. 1992; 140:169-172

Gabbott PL, Bacon SJ

Vasoactive intestinal polypeptide containing neurons in monkey medial prefrontal cortex (mPFC): colocalization with calretinin.

Brain Res. 1997; 744: 179-184

Galzi JL, Changeux JP

Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations.

Neuropharmacology. 1995; 34:563-582

Gil Z, Connors BW, Amitai Y

Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity.

Neuron. 1997; 19:679-686

Girod R, Barazangi N, McGehee D, Role LW

Facilitation of glutamatergic neurotransmission by presynaptic nicotinic acetylcholine receptors.

Neuropharmacology. 2000; 39:2715-2725

Gotti C, Clementi F

Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology.

Prog Neurobiol. 2004; 74:363-396

Gotti C, Fornasari D, Clementi F

Human neuronal nicotinic receptors.

Prog. Neurobiol. 1997; 53:199-237

Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC

Characterization of nicotinic receptor-mediated ^3H dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum.

J. Neurochem. 1992; 59:848-856

Guo X, Lester RA

Regulation of nicotinic acetylcholine receptor desensitization by Ca^{2+} .

J Neurophysiol. 2007; 97:93-101

Haghighi AP, Cooper E

A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 4$ und $\alpha 4\beta 2$ receptors.

J Neurosci. 2000; 20:529-541

Hasselmo HE

The role of acetylcholine in learning and memory.

Curr Opin Neurobiol. 2006; 16: 710-715

-
- Hellström-Lindahl E, Gorbounova O, Seiger A, Mousavi M, Nordberg A**
Regional distribution of nicotinic receptors during prenatal development of human brain and spinal cord.
Dev. Brain Res. 1998; 108:147-160
- Hellström-Lindahl E, Mousavi M, Zhang X, Ravid R, Nordberg A**
Regional distribution of nicotine receptor subunit mRNAs in human brain : comparison between Alzheimer and normal brain (In Process Citation).
Brain Res. Mol. Brain Res. 1999; 66:94-103
- Henny P, Jones BE**
Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons.
Eur J Neurosci. 2008; 27:654-670
- Hill JA Jr., Zoli M, Burgeois JP, Changeux JP**
Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: the beta2-subunit.
J. Neuroscience 1993; 13:1551-1568
- Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE**
Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: A study of cholinergic neurons and synapses.
J. Comp. Neurol. 1985; 234: 17-34
- Howe JR, Sutor B, Zieglgänsberger W**
Characteristics of long-duration inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical neurons in vitro.
Cellular and Molecular Neurobiology; 1987; 7:1-18
- Huganir RL, Greengard P**
Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation.
Neuron. 1990; 5:555-567
- Jones S, Sudweeks S, Yakel JL**
Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function.
Trends Neurosci. 1999; 22:555-561
- Karlin A**
Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors.
Nat Rev Neurosci. 2002; 3:102-114
- Kawaguchi Y**
Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex
J Neurophysiol. 1993; 69:416-431

Kristt DA, McGowan RA Jr, Martin-MacKinnon N, Solomon J

Basal forebrain innervation of rodent neocortex: studies using acetylcholinesterase histochemistry. Golgi and lesion strategies. Brain Res. 1985; 337: 19-39

Kuryatov A, Gerzanich V, Nelson M, Olale F, Lindstrom J

Mutation causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy alters Ca^{2+} permeability, conductance and gating of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. J Neurosci. 1997; 17: 9035-9047

Lena C, Changeux JP

Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. Trends Neurosci. 1993; 16:181-186

Lena C, Changeux JP, Mulle C

Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. J Neurosci. 1993; 13:2680-2688

Lester RA, Dani JA

Time-dependent changes in central nicotinic acetylcholine channel kinetics in excised patches. Neuropharmacol. 1994; 33:27-34

Levin ED

Nicotinic receptor subtypes and cognitive function J. Neurobiology. 2002; 53:633-640

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH

Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. Psychopharmacology. 2006; 184:523-539

Levy RB, Reyes AD, Aoki C

Nicotinic and muscarinic reduction of unitary excitatory postsynaptic potentials in sensory cortex; dual intracellular recording in vitro. J Neurophysiol. 2006; 95: 2155-2166

Lewis PR, Shute CC

The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. Brain. 1967; 90:521-540

Li J, Schwark HD

Distribution and proportions of GABA-immunoreactive neurons in cat primary somatosensory cortex. J Comp Neurol. 1994; 343: 353-361

Lindstrom J

Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease.
Mol. Neurobiol. 1997; 15:193-222

Luetje CW, Patrick J, Seguela P

Nicotinic receptors in the mammalian brain.
FASEB J. 2000; 4:2753-2760

Lysakowski A, Wainer BH, Bruce G, Hersh LB

An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex.
Neuroscience. 1989; 28:291-336

McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA

Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex
J. Neurophysiol. 1985; 54:782-806

McCormick DA, Prince DA

Mechanism of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro.
J Physiol. 1986; 375:169-194

McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW.

Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors.
Science. 1995; 269:1692-1696

McGehee DS, Role LW

Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons.
Annu. Rev. Physiol. 1995; 57:521-546

Mechawar N, Cozzari C, Descarries L

Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description.
J Comp Neurology. 2000; 428:305-318

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI

Central cholinergic pathways in the rat : an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6).
Neuroscience. 1983; 10:1185-1201

Mulle C, Léna C, Changeux JP.

Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons.
Neuron. 1992; 8:135-143

Nakayama H, Shioda S, Okuda H, Nakai Y

Immunocytochemical localization of nicotinic acetylcholine receptor in rat cerebral cortex.
Brain Res Mol Brain Res. 1995; 32:321-328

Newhouse PA, Potter A, Singh A

Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance.
Curr Opin Pharmacol. 2004b; 4:36-46

Newhouse P, Singh A, Potter A

Nicotine and Nicotinic Receptor Involvement in Neuropsychiatric Disorders.
Curr Top Med Chem. 2004a; 4:267-282

Nicoll A, Kim HG, Connors BW

Laminar origins of inhibitory synaptic inputs to pyramidal neurons of the rat neocortex.
J Physiol. 1996; 497:109-117

Olale F, Gerzanich V, Kuryatov A, Wang F, Lindstrom J.

Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha3, alpha4, and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes.
J Pharmacol Exp Ther. 1997 Nov;283(2):675-83.

Papke RL, Bencherif M, Lippiello P

An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha7 subtype.
Neurosci Lett. 1996; 213:201-204

Paradiso K, Brehm P

Long-term desensitization of nicotinic acetylcholine receptors is regulated via protein kinase A-mediated phosphorylation
J Neurosci. 1998; 18:9227-9237

Paterson D, Nordberg A

Neuronal nicotinic receptors in the human brain.
Prg Neurobiol. 2000; 61:75-111

Pereira EF, Reinhardt-Maelicke S, Schratzenholz A, Maelicke A, Albuquerque EX

Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993; 265:1474-1491

Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL, Zachariou V

Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior.
Neuropsychopharmacology. 2000; 22:451-465

Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E

Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors.
J Neurosci. 1999; 19:5228-5235

Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA

Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex.

J Comp Neurol. 1994; 344: 349-382

Quick MW, Lester RA

Desensitization of neuronal nicotinic receptors.

J Neurobiol. 2002; 53:457-478

Radcliffe KA, Dani JA

Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission.

J. Neurosci. 1998; 12:2888-2900

Radcliffe KA, Fisher J, Gray R, Dani JA

Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons.

Ann N Y Acad Sci. 1999; 868:591-610

Raggenbass M, Bertrand D

Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy.

J Neurobiol. 2002; 53:580-589

Ramirez-Latorre J, Yu C, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L

Functional contributions of $\alpha 5$ subunit to neuronal acetylcholine receptor channels.

Nature. 1996; 380:347-351

Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S

Nicotinic modulation of ^3H dopamine release from striatal synaptosomes: pharmacological characterisation.

J. Neurochem. 1990; 54:937-945

Reitstetter R, Lukas RJ, Gruener R.

Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure.

J Pharmacol Exp Ther. 1999; 289:656-60

Roerig B, Nelson DA, Katz LC

Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex.

J Neuroscience. 1997; 17:8353-8362

Role LW, Berg DK

Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses.

Neuron. 1996; 16:1077-1085

Rozsa B, Katona G, Kaszas A, Szipocs R, Vizi ES

Dendritic nicotinic receptors modulate backpropagating action potentials and long-term plasticity of interneurons.

Eur J Neurosci. 2008; 27: 364-377

Rowell PP, Duggan DS

Long-lasting inactivation of nicotinic receptor function in vitro by treatment with high concentrations of nicotine.

Neuropharmacology. 1998;37:103-111

Rubboli F, Court JA, Sala C, Morris C, Perry E, Clementi F

Distribution of neuronal nicotinic receptor subunits in human brain.

Neurochem. Int. 1994a; 25:69-71

Rubboli F, Court JA, Sala C, Morris C, Chini B, Perry E, Clementi F

Distribution of nicotinic receptors in the human hippocampus and thalamus

Eur. J. Neurosci. 1994b; 6:1596-1604

Sargent PB

The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

Annu. Rev. Neurosci. 1993; 16:403-443

Sarter M, Bruno JP, Givens B

Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory?

Neurobiol Learn Mem. 2003; 80:245-256

Schoepfer R, Conroy W, Whiting P, Gore M, Lindstrom J

Brain α -Bungarotoxin binding protein cDNAs and mAbs reveal subtypes of the branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily.

Neuron. 1990; 5:35-48

Schrattenholz A, Pereira EF, Roth U, Weber KH, Albuquerque EX, Maelicke A

Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands.

Mol. Pharmacol. 1996; 49:1-6

Schroder H, de Vos RA, Jansen EN, Birtsch C, Wevers A, Lobron C, Nowacki S, Schroder R, Maelicke A

Gene expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit in the frontal cortex in Parkinson's disease patients.

Neurosci. 1995; Lett 187:173-176

Schwaber JS, Rogers WT, Satoh K, Fibiger HC

Distribution and organization of cholinergic neurons in the rat forebrain demonstrated by computer-aided data acquisition and three-dimensional reconstructions.

J Comp Neurol. 1987; 263:309-325

Schwartz RD, Kellar KJ

In vivo regulation of [3H]acetylcholine recognition sites in brain by nicotinic cholinergic drugs.

J Neurochem. 1985; 45:427-33.

Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW

Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain α_7 : A nicotinic cation channel highly permeable to calcium.
J. Neurosci. 1993; 13:596-604

Selden NR, Gitelman DR, Salamon-Murayama N, Parrish TB, Mesulam MM

Trajectories of cholinergic pathways within the cerebral hemispheres of the human brain.
Brain. 1998; 121: 2249-2257

Semba K

Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity and roles in vigilance.
Behav Brain Res. 2000; 115:117-141

Soliakov L, Gallagher T, Wonnacott S

Anatoxin-a-evoked [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes.
Neuropharmacology. 1995; 34:1535-1541

Sutor B, Grimm C, Polder HR

Voltage-clamp-controlled current-clamp recordings from neurons: an electrophysiological technique enabling the detection of fast potential changes at preset holding potentials.
Pflugers Arch – Eur J Physiol. 2003; 446:133-141

Sutor B, Luhmann HJ

Involvement of GABAB receptors in convulsant-induced epileptiform activity in rat neocortex in vitro.
Eur. J. Neurosci. 1998; 10:3417-3427

Sutor B, Zieglgänsberger W

A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons in vitro.
Pflugers Arch. 1987 Sep;410(1-2):102-11

Sutor B, Zolles G

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors and autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a critical review.
Pflugers Arch. 2001; 442:642-651

Svensson AL, Nordberg A

Tacrine interacts with an allosteric activator site on alpha4beta2 nAChRs in M10 cells.
Neuroreport. 1996; 7:2201-2205

Turrini P, Casu MA, Wong TP, DE Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC

Cholinergic nerve terminals establish classical synapses in the rat cerebral cortex: synaptic pattern and age-related atrophy.
Neuroscience. 2001; 105: 277-285

Van Kammen DP, Petty F, Kelley ME, Kramer GL, Barry EJ, Yao JK, Gurklis JA, Peters JL

GABA and brain abnormalities in schizophrenia.
Psychiatry Res. 1998; 82:25-35

Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA

Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.
Neuron. 1992; 8:127-134

Vernino S, Rogers M, Radcliffe KA, Dani JA

Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors.
J. Neurosci. 1994; 14:5514-5524

Vidal C, Changeux JP

Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro.
Neuroscience. 1993; 56:23-32

Wada E, McKinnon D, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW

The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family $\alpha 5$ in the rat central nervous system.
Brain Res. 1990; 526:45-53

Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW

Distribution of alpha2, alpha3, alpha4 and beta2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat.
J Comp Neurol. 1989; 284:314-335

Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J

Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha 5 subunits with alpha 3, beta 2 and beta 4 subunits.
J. Biol. Chem. 1996; 271:17656-17665

Weinberger DR

The biological basis of schizophrenia: new directions.
J Clin Psychiatry. 1997; 58: 22-27

Wevers A, Jeske A, Lobron C, Birtsch C, Heinemann S, Maelicke A, Schroder R, Schroder H

Cellular distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in the human cerebral cortex as revealed by non-isotopic in situ hybridization.
Brain Res. Mol. Brain Res. 1994; 25:122-128

Wilkie GI, Hutson PH, Stephens MW, Whiting P, Wonnacott S

Hippocampal nicotinic autoreceptors modulate acetylcholine release.
Biochem. Soc. Trans. 1993; 21:429-431

Winer JA, Larue DT

Populations of GABAergic neurons and axons in layer I of rat auditory cortex.
Neuroscience. 1989; 33: 499-515

Wonnacott S

Presynaptic nicotinic ACh receptors.
Trends Neurosci. 1997; 20:92-98

Wonnacott S, Drasdo A, Sanderson E, Rowell P

Presynaptic nicotinic receptors and the modulation of transmitter release.
1990; In: Marsh, J. (Ed.), Ciba Foundation Symposium 152: The Biology of
Nicotine Dependence. Wiley, Chichester, pp. 87-101

Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA

Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks.
Science. 1998; 281:985-988

Yang X, Criswell HE, Breese GR

Nicotine-induced inhibition in medial septum involves activation of presynaptic
nicotinic cholinergic receptors on gamma-aminobutyric-acid-containing
neurons.
J. Pharmacol.Exp.Ther. 1996; 276:482-486

Zheng JQ, Felder M, Connor JA, Poo MM

Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters.
Nature. 1994; 368:140-144

Zoli M, Lena C, Picciotto MR, Changeux JP

Identification of four classes of brain nicotinic receptors using $\beta 2$ -mutant mice.
J of Neurosci. 1998; 18:4461-4472

Zolles G, Wagner E, Lampert A, Sutor B

Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors in rat neocortical
layer 5 pyramidal cells.
Cereb Cortex. 2009;19(5):1079-91

7 **Abbildungsverzeichnis**

Tabelle 1:	Die neuronalen nAChR Untereinheiten
Tabelle 2:	Vier funktionelle Subtypen der nAChR
Tabelle 3:	Liganden an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren
Tabelle 4:	Verteilung der mRNA nikotinischer Untereinheiten im menschlichen Gehirn
Tabelle 5:	Nomenklatur der cholinergen Projektion des basalen Vorderhirns und des oberen Hirnstamms in der Ratte
Tabelle 6:	Vergleich der passiven Eigenschaften von Pyramidenzellen in Schicht 2/3 und 5
Tabelle 7:	Passive Eigenschaften der Neurone mit und ohne Antwort nach ACh-Applikation in Schicht 2/3
Tabelle 8:	ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3 und 5
Tabelle 9:	Vergleich der Amplituden und Flächen der verschiedenen Antwortformen in Pyramidenzellen der Schicht 2/3 und 5
Tabelle 10:	Kinetische Eigenschaften der nikotinischen Ströme von Schicht 5 Pyramidenzellen

Abbildung 1:	Postsynaptische Lokalisation der nAChR
Abbildung 2:	Präsynaptische Lokalisation der nAChR
Abbildung 3:	Präterminale oder axonale Lokalisation der nAChR
Abbildung 4:	Pyramidenzelle in Schicht 2/3
Abbildung 5:	Pyramidenzelle in Schicht 5
Abbildung 6:	Bestimmung der passiven Eigenschaften einer Pyramidenzelle in Schicht 5
Abbildung 7:	Strom-Spannungs-Verhalten einer Pyramidenzelle in Schicht 2/3

-
- Abbildung 8:** Bestimmung der Amplitude, der Dauer und der Latenz des ersten Aktionspotenzials einer Entladungssalve einer Pyramidenzelle in Schicht 5
- Abbildung 9:** Frequenzadaptation von Neuronen in Schicht 2/3
- Abbildung 10:** Frequenzadaptation von Neuronen in Schicht 5
- Abbildung 11:** Bestimmung des Rektifikationskoeffizienten (RR) anhand einer Strom-Spannungs-Kurve, gemessen in einer Pyramidenzelle der Schicht 2/3 und in einem Neuron der Schicht 5
- Abbildung 12:** Latenzabnahme des initialen Aktionspotenzials in beiden Schichten bei steigenden Stromstärken
- Abbildung 13:** Vergleich des Frequenzverhaltens von Aktionspotentialsalven nach Injektion von überschwelligem Strompuls
- Abbildung 14:** Vergleich der Frequenzadaptation in Schicht 2/3 - und Schicht 5 – Neuronen bei 360 pA
- Abbildung 15:** ACh-induzierte Antworten einer Pyramidenzelle in Neocortexschicht 2/3
- Abbildung 16:** Vergleich der Frequenzadaptation in ACh-sensitiven und nicht-sensitiven Pyramidenzellen der Schicht 2/3
- Abbildung 17:** Antwortverhalten der Pyramidenzellen in Schicht 2/3 bei Applikation von Acetylcholin (ACh) in Gegenwart von Atropin (1 μ M)
- Abbildung 18:** Antwortverhalten einer Pyramidenzelle in Schicht 5 auf die lokale Applikation von Acetylcholin (100 μ M; 700 mbar) in Gegenwart von 1 μ M Atropin
- Abbildung 19:** Antwortverhalten von Pyramidenzellen in Schicht 5 bei Applikation von Acetylcholin (ACh) in Gegenwart von Atropin (1 μ M)
- Abbildung 20:** Wirkung von glutamatergen Rezeptorantagonisten und GABA_A-Rezeptorantagonisten auf ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3
- Abbildung 21:** Einfluss von CNQX, D-AP5 und Gabazin/Bicucullin auf Amplitude und Fläche des ACh-induzierten Membranstroms in Pyramidenzellen der Schicht 2/3

-
- Abbildung 22:** ACh-induzierte Membranströme vor und nach Applikation des Natriumkanalblockers TTX. Messungen an zwei unterschiedlichen Pyramidenzellen der neocorticalen Schicht 2/3
- Abbildung 23:** Verhalten der nikotinischen Ströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3 nach Zugabe von TTX und Bicucullin
- Abbildung 24:** ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5 nach Blockade der glutamatergen und GABAergen Übertragung sowie nach Applikation von TTX
- Abbildung 25:** Wirkung von glutamatergen und GABAergen Rezeptorantagonisten sowie von TTX auf ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5
- Abbildung 26:** Veränderung von Amplitude (A) und Fläche (B) des ACh-induzierten Membranstromes in Gegenwart von GABA_A-Rezeptorantagonisten. Vergleich zwischen Neuronen der Schicht 2/3 und 5.
- Abbildung 27:** Wirkung der nAChR selektiven Antagonisten MLA und DHβE auf ACh-induzierte Ströme in Pyramidenzellen der Schicht 2/3
- Abbildung 28:** Wirkung von selektiven nAChR-Antagonisten auf ACh-induzierte Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5
- Abbildung 29:** Effekt der nAChR selektiven Antagonisten MLA und DHβE auf nikotinische Membranströme in Pyramidenzellen der Schicht 5
- Abbildung 30:** Isolierung der MLA- und DHβE-sensitiven Stromkomponenten durch digitale Subtraktion
- Abbildung 31:** Umkehrpotenzial von nikotinischen Strömen in Schicht 2/3 - Pyramidenzellen
- Abbildung 32:** Umkehrpotenzial von postsynaptischen nikotinischen Membranströmen in Pyramidenzellen der Schicht 5
- Abbildung 33:** Desensitisierung nikotinischer Ströme in Schicht 2/3 Pyramidenzellen bei repetitiver Applikation von ACh mit verschiedenen Intervallen
- Abbildung 34:** Desensitisierung der nikotinischen Membranströme in Schicht 2/3 Pyramidenzellen

-
- Abbildung 35:** Desensibilisierung nikotinischer Membranströme in Schicht 5 Pyramidenzellen bei repetitiver Applikation von ACh bei verschiedenen Intervallen.
- Abbildung 36:** Desensibilisierung der nikotinischen Ströme in Schicht 5 Pyramidenzellen
- Abbildung 37:** Darstellung des nAChR-vermittelten Mechanismus in Schicht 2/3
- Abbildung 38:** Darstellung des nAChR-vermittelten Mechanismus in Schicht 5
- Abbildung 39:** Darstellung der Anteile der α_7 - und $\alpha_4\beta_2$ -nAChR am Gesamtstrom

8 Abkürzungsverzeichnis

α -BGT	α -Bungarotoxin
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
ADNFLE	autosomal-dominante nächtliche Fontallappenepilepsie
ADP	Adensoindiphosphat
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic-Acid
ATP	Adenosintriphosphat
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphono-pentansäure
DH β E	Dihydro- β -Erythroidin
DMPP	Dimethylphenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPSCs	exzitatorische postsynaptische Ströme
GABA	γ -Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
κ -Bgt	κ -Bungarotoxin
MLA	Methyllycaconitin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nAChR	nikotinsche Acetylcholinrezeptoren
NbM	Nucleus basalis Meynert
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
RMP	Ruhemembranpotenzial
Rn	Membraneingangswiderstand
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
τ	somatische Membranzeitkonstante
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Sutor für seine großartige Unterstützung bei meiner Dissertation, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut der LMU München und die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie der dazu nötigen Techniken. In seiner Funktion als Doktorvater und Betreuer führte er mich in die Patch-Clamp Techniken sowie in die Auswertung der gewonnenen Daten ein. Bei aufkommenden Fragen oder Problemen stand er mir jederzeit zur Seite und übte konstruktive Kritik.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. Magdalena Götz für die Aufnahme in das Department of Physiological Genomics und allen anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der LMU München. Diese haben mich in allen Bereichen unterstützt. Hervorzuheben sind Frau Roswitha Maul, der ich alle benötigten Nährstofflösungen zu verdanken habe und den wissenschaftlichen Mitarbeitern Herrn Florian Werthart und Frau Angelika Lampert, die jederzeit ein offenes Gehör für meine Fragen hatten.

Ein letzter Dank geht an meine Familie, die mich auf dem gesamten Weg des Medizinstudiums begleitet und jederzeit und ohne Einschränkungen unterstützt haben.

Lebenslauf

Eva Maria Wagner

geboren am 28.12.1984 in Ingolstadt

Anschrift: Pettenkoferstrasse 9
85084 Reichertshofen

E-mail: Ellena1984@web.de

Schulbildung: 2004 Abitur am Apian-Gymnasium Ingolstadt

Studium: 2004 – 2011 Studium der Humanmedizin an der LMU
München

2006 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2011 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit: seit 2011 Assistenzärztin in der Inneren Medizin
Klinikum Ingolstadt, Medizinische Klinik II

Veröffentlichung: Zolles G, Wagner E, Lampert A, Sutor B
Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors in rat
neocortical layer 5 pyramidal cells.

Cereb Cortex. 2009; 19(5):1079-1091

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: