

**Untersuchungen zur muskarinischen
Modulation der GABAergen Transmission
im Colliculus inferior der juvenilen Ratte**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt im Fachbereich
Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Christine Keipert
aus Groß-Umstadt**

**Frankfurt am Main
2005**

Mein aufrichtigster Dank gilt Prof. Dr. Harald Backus für das Thema meiner Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Er hat mich, trotz seiner Erkrankung, immer unterstützt und gefördert.

Großen Dank an Prof. Dr. Heinz Wässle, der sich so schnell und freundlich bereit erklärt hat, die Korrektur und Begutachtung meiner Arbeit zu übernehmen. Ebenfalls großen Dank an Prof. Dr. Manfred Kössl für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke der gesamten AG Backus für das sehr gute und anregende Arbeitsklima und die vielen Male, die wir im Labor miteinander gelacht haben.

Vielen Dank an Dr. Gabi Lahner, Prof. Dr. Herbert Zimmermann und das gesamte Graduiertenkolleg. Guter Rat, Sachmittel und Herausforderungen, aber vor allen Dingen das gewährte Stipendium, haben mir mein Weiterkommen erst ermöglicht.

Vielen Dank an Dr. Christian Müller für seine Unterstützung in der Endphase meiner Arbeit und an alle anderen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Tausend Dank an Dr. Moritz Frech der mich immer unterstützt hat, auch als er schon nicht mehr vor Ort war und der immer ein offenes Ohr für mich hatte, wenn ich im Clinch mit dem Setup, der Statistik oder dem Leben im Allgemeinen lag.

Zuletzt, und das ist keine Wertung der Wichtigkeit, danke ich „meinen Liebsten“: Danke Mama, dass du mir von klein auf deutlich gemacht hast, dass ich alles erreichen kann was ich will und mich immer darin bestärkt und mir beigestanden hast. Danke Papa für deine Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke Sanni, dass du bist wie du bist. Ich bin stolz auf dich! Euch und Oma und Opa oben und Oma Mi und auch meinem lieben Opa Fritz ein aufrichtiges Dankeschön dafür, dass ihr mir immer ein Zuhause und eine Familie seid.

Tausend Dank an Alexander Wuttke. Du warst immer an meiner Seite und hast mich unterstützt wo du konntest. In dir hat meine Seele ein Zuhause gefunden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der muskarinische Acetylcholinrezeptor.....	2
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.3 Die intrazellulären Signalwege, die einer Aktivierung des mAChRs nachgeschaltet sein können.....	6
1.4 Cholinerge Modulation der GABAergen Transmission.....	8
1.5 Der Colliculus inferior (IC).....	9
1.6 Die zeitliche Entwicklung des IC.....	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2. Material und Methode	13
2.1 Versuchstiere.....	13
2.2 Präparation der Hirnschnitte für Patch-Clamp.....	13
2.3 Die Patch-Clamp-Technik.....	14
2.4 Herstellung der Pipetten.....	15
2.5 Aufbau des Messplatzes.....	15
2.6 Experimente.....	17
2.7 Statistik.....	19
2.8 Lösungen und applizierte Substanzen.....	20
3. Ergebnisse.....	22
3.1 Modulation der GABAergen Transmission über muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	22
3.2 Der GABAerge Ursprung der gemessenen IPSCs.....	23
3.3 Die Modulation der IPSCs erfolgt über muskarinische und nicht über nikotinische Rezeptoren.....	25
3.4 Der M3 mAChR ist der Vermittler des frequenzsteigernden Effekts.....	27
3.5 Die Beeinflussung des intrazellulären Signalwegs, der einer Aktivierung des M3-mAChRs nachgeschaltet ist.....	30
3.5.1 Der NO-cGMP-Signalweg.....	30
3.5.1.1 Blockierung der Phospholipase C (PLC).....	31
3.5.1.2 Blockierung des Ca ²⁺ -Calmodulin.....	33
3.5.1.3 Blockierung der NO-Synthase.....	35
3.5.1.4 Blockierung der Guanylatzyklase.....	37
3.5.1.5 Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels.....	39
3.5.1.6 Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels.....	41
3.5.2 Der Signalweg über die PKC.....	44

3.5.3 Der AC-cAMP-PKA-Signalweg.....	49
3.5.3.1 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels.....	49
3.5.3.1 Die Blockierung der Adenylatcyclase.....	51
3.6 Zusammenfassung.....	53
4. Diskussion.....	54
4.1 Die Modulation der GABAergen Transmission über muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	54
4.2 Der GABAerge Ursprung der gemessenen IPSCs.....	55
4.3 Die Beteiligung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren.....	56
4.4 Der M3 (M5?) mAChR ist der Vermittler des frequenzsteigernden Effekts.....	56
4.5 Die Beeinflussung des intrazellulären Signalweges, der einer Aktivierung des M3 mAChR nachgeschaltet ist.....	59
4.5.1 Der NO-cGMP-Signalweg.....	59
4.5.1.1 Die Blockierung der Phospholipase C.....	59
4.5.1.2 Die Blockierung des Ca ²⁺ -Calmodulin.....	60
4.5.1.3 Die Blockierung der NO-Synthase.....	60
4.5.1.4 Die Blockierung der Guanylatzyklase.....	61
4.5.1.5 Die Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels.....	62
4.5.1.6 Die Beteiligung von cGMP.....	63
4.5.2 Der Signalweg über die PKC.....	63
4.5.3 Der AC-cAMP-PKA-Signalweg.....	65
4.5.3.1 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels.....	65
4.5.3.2 Die Blockierung der Adenylatzyklase.....	66
4.6 Die Verknüpfung des M3 (M5) mit der AC.....	67
4.6.1 Der M3 (M5) ist über ein ungewöhnliches G-Protein mit der AC verknüpft.	67
4.6.2 Der M3-Rezeptor ist über einen ungewöhnlichen Signalweg mit der AC verknüpft	69
4.7 Die Bedeutung des Signalweges für die Entwicklung des Netzwerks.....	70
4.8 Zusammenfassung.....	71
5. Literatur.....	73
6. Zusammenfassung.....	96
7. Lebenslauf.....	98

1. Einleitung

An die Signalübermittlung im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren werden, je nach Entwicklungsstadium, sehr unterschiedliche Anforderungen gestellt. Im adulten Gehirn dient sie nicht nur der Nachrichtenübermittlung, sondern auch der aktivitätsbasierten Umgestaltung neuronaler Verbindungen bei Lernprozessen und der regenerativen Umgestaltung nach Verletzungen (Bach-y-Rita, 2003; Kempermann et al., 2000; Rauschecker, 1995; Stiles, 2000). Im sich entwickelnden Gehirn werden schon frühzeitig Nervenzellen elektrisch erregbar und spontan aktiv. Elektrische Aktivität und Transmitterausschüttung spielen bei der selektiven Verknüpfung von Nervenzellen durch Synapsen eine wichtige Rolle (Owens und Kriegstein, 2002; Nguyen et al., 2001; Nomakowski und Hayes, 1999; Johnson, 1999). Die Verarbeitung von Sinnesreizen kann erst postnatal ausreifen. Dabei ist die Modulation der elektrischen Aktivität von großer Bedeutung, da dadurch die Selektion wichtiger Verbindungen stattfindet (Ben-Ari, 2001). Auf diese Weise können Umwelteinflüsse die Entwicklung von Netzwerken mitbestimmen und die zunächst unpräzise angelegten Verbindungen entsprechend ihren Aufgaben stabilisieren (Illing, 2004). Dem Mechanismus dieser aktivitätsabhängigen Selektion folgend, werden Synapsen zwischen Neuronen stabilisiert, wenn prä- und postsynaptisches Neuron zeitgleich aktiv sind. Eine Verbindung in der das nachgeschaltete Neuron aktiv ist, während das vorgeschaltete Neuron inaktiv ist, wird mit der Zeit immer schwächer und schließlich aufgelöst (Okabe, 2002; Cohen-Cory, 2002). Die Mechanismen, die über die elektrische Aktivität zu einer Stabilisierung von Synapsen führen, sind allerdings noch nicht gänzlich aufgeklärt. Drei aktivitätsabhängige Komponenten scheinen allerdings eine große Rolle zu spielen:

- 1) Die von einer Depolarisation abhängige Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Weiss und Burgoyne, 2002).
- 2) Die transmitterabhängige Aktivierung Kalzium-permeabler Rezeptor-Kanal-Komplexe (z.B. der NMDA-Rezeptor als Hebb'scher Koinzidenzdetektor) bewirkt bei gleichzeitiger prä- und postsynaptischer Aktivierung einen besonders starken Kalziumeinstrom. (Zur Übersicht: Tsien, 2000; Froemke et al., 2003)

- 3) Die transmitterabhängige Aktivierung metabotroper Rezeptoren (z.B. metabotrope Glutamatrezeptoren), die über eine intrazelluläre Signalkaskade den intrazellulären Kalziumspiegel verändern (Gu, 2002; Abraham und Tate, 1997).

Neben den häufigsten Transmittern GABA, Glutamat und Glycin, können diese Signale auch durch andere Transmitter, wie z.B. durch die Bindung von Acetylcholin (ACh) an den muskarinischen Acetylcholinrezeptor (mAChR) moduliert werden und dadurch eine bessere Feinabstimmung des Netzwerks ermöglichen.

1.1 Der muskarinische Acetylcholinrezeptor

Im Jahre 1951 entdeckten Riker und Wescoe muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChRn) durch die in der Klinik verwendete Nutzung von Gallamine als Unterstützung von Narkosen. Später konnten Hammer und Kollegen (1980) mit Hilfe von Pirenzepin erstmals unterschiedliche Typen von mAChRn unterscheiden und unterteilten diese in zwei Gruppen: „M1-Rezeptoren mit einer hohen Affinität für Pirenzepin und M2-Rezeptoren mit einer geringen oder keiner Affinität für Pirenzepin“. Inzwischen wurden fünf verschiedene Subtypen von mAChRn (M1-M5) kloniert, deren Gene als m1 bis m5 bezeichnet werden (Kubo et al., 1986 a und b; Bonner et al., 1987 und 1988).

Der mAChR besteht aus einem einzigen Glykoprotein mit sieben hydrophoben Transmembrandomänen, einem extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) mit verschiedenen Glykosylierungsstellen, einem intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus) und einer großen zytoplasmatischen Domäne zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment (siehe Abb. 1, sowie zur Übersicht: Hulme et al., 1990). Der mAChR gehört zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese hat so unterschiedliche Mitglieder wie das Photopigment Rhodopsin, die adrenerge und chemokine Rezeptorfamilie und den GABA_B-Rezeptor (Löffelholz, 1996; Nathanson, 1996; Wess, 1996) und ist die größte Superfamilie von Rezeptoren (Christopoulos und Kenakin, 2002).

Bis heute konnte die Acetylcholin-Bindungsstelle nicht eindeutig identifiziert werden (Allmann et al., 2000). Die intrazelluläre G-Protein-Bindungsstelle wird zwischen der zweiten und dritten zytoplasmatischen Schleife vermutet (Curtis et al., 1989; Haga et al., 1993; Wess et al., 1995).

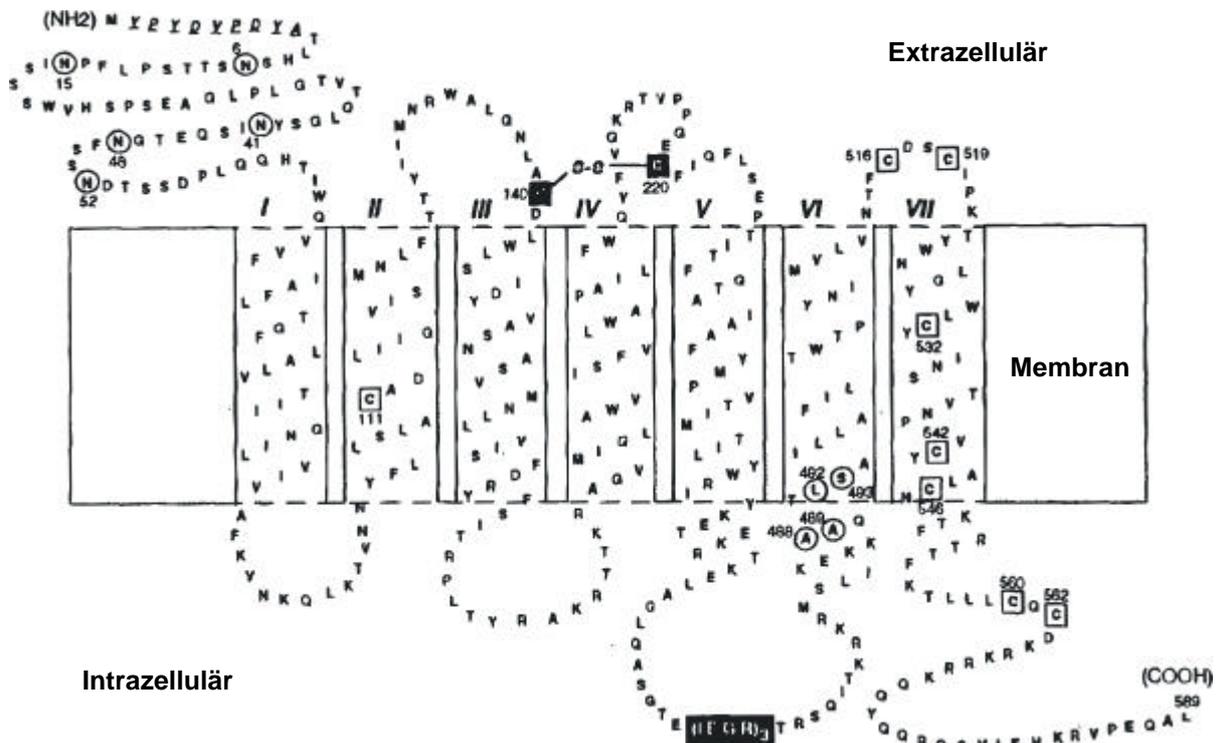


Abb. 1: Die transmembranale Topologie des muskarinischen M3-Rezeptors der Ratte (mod. nach Kostenis et al., 1999)

Jeder Rezeptor-Subtyp interagiert mit verschiedenen G-Proteinen, welche direkt oder über einen sekundären Botenstoff unter anderem die Aktivität von Ionenkanälen modulieren können.

In die von Hammer und Kollegen 1980 aufgestellte Definition von M1-Rezeptoren passen auch die später entdeckten M3- und M5-Rezeptoren. Diese stimulieren über ein Pertussistoxin-insensitives G-Protein ($G_{q/11}$) den Phosphoinositol-Signalweg. Dies führt zur Schließung von K^+ -Kanälen und zur Depolarisation der Zellen. Die M2- und M4-Rezeptoren hemmen die Adenylatzyklase über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein (G_i) und führen dadurch zu einer Inhibition von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Caulfield und Birdsall, 1998; Egan und North, 1986). Die muskarin-vermittelte Signaltransduktion ist jedoch aufgrund von Überschneidungen innerhalb der Signalwege (Caulfield und Birdsall, 1998; Felder, 1995; Nathanson, 2000) und der vielfältigen Kopplung der G-Proteine sehr viel komplexer (Abb. 2).

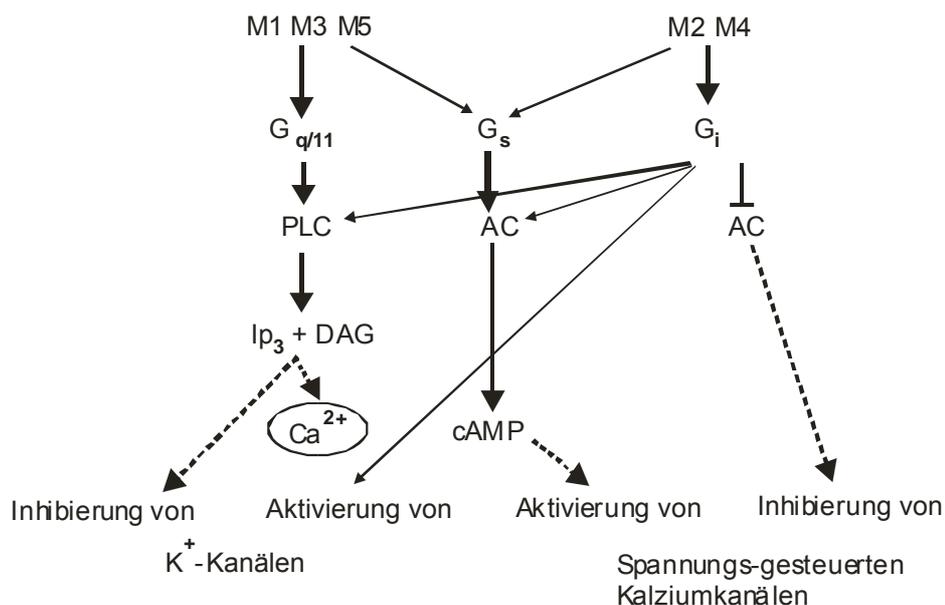


Abb. 2: Vereinfachte Übersicht der intrazellulären Signalwege, die bei der Aktivierung von mACHRen eine Rolle spielen (M1-M5 = mACHR-Subtypen, G_{q/11}, G_s, G_i = G-Proteine, PLC = Phospholipase C, AC = Adenylatzyklase, IP₃ = Inositoltriphosphat, DAG = Diacylglycerol, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat. Mod. nach Lucas-Meuner et al., 2003)

Seit einigen Jahren gibt es einen monoklonalen Antikörper (M35), der alle mACHRen ohne Differenzierung in die Subtypen, erkennt (Van der Zee und Luiten, 1999; Carsi-Gabrenas et al., 1997). Jedoch ist über die genaue Lokalisierung der einzelnen Rezeptorsubtypen im Gehirn bis heute wenig bekannt, auch wenn inzwischen spezifische Antikörper produziert werden. Allerdings ist deren selektive Bindung aufgrund von Kreuzreaktionen nicht optimal und sie führen selten zu aussagekräftigen Ergebnissen.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind mit etwa 720 Mitgliedern eine der größten Proteinfamilien im menschlichen Genom (Wise et al., 2004). Sie reagieren auf eine große Vielfalt von Signalen, wie beispielsweise Licht, Ionen, organische Moleküle und Proteine (Krasel et al., 2004) und beeinflussen unterschiedliche intrazelluläre Effektoren, wie die Adenylatzyklasen, Phosphatasen und verschiedene Ionenkanäle (Tab. 1).

Effektor	Referenz
Adenylatzyklase	Iyengar, 1993; Krupinski et al., 1989; Tang und Gilman, 1991 und 1992 und 1995; Taussig et al., 1993
cGMP-Phosphodiesterase	Hamm, 1991
Phospholipase C	Champs et al., 1992 ; Lee et al., 1992 ; Park et al., 1992 und 1993 ; Taylor et al., 1991
Phosphoinositide-3-Kinase	Stephens et al., 1997
Phospholipase A2	Jelsema und Axelrod, 1987
K ⁺ -Kanäle	Clapham und Kim, 1989; Yatani et al., 1987
Ca ²⁺ -Kanäle	Bristow et al., 1989; Clapham, 1990; Imoto et al., 1988; Shekter et al., 1997; Yang und Tsien, 1993
Na ⁺ -Kanäle	Schubert et al., 1989; Ling et al., 1990
Cl ⁻ -Kanäle	Fargon et al., 1990

Tab. 1: Übersicht über die unterschiedlichen Effektoren der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Alle G-Proteine bestehen aus drei unterschiedlichen Untereinheiten, welche sich stark in Struktur und Funktion unterscheiden (Hepler und Gilman, 1992; Strathmann et al., 1989). Die Klassifizierung erfolgt normalerweise über die α -Untereinheit.

Untereinheiten		Gewebeverteilung	Effektor
a-Untereinheit			
G _s	G α _s	ubiquitär	Adenylatzyklase
	G α _{olf}	Gehirn, olfaktorisch	Adenylatzyklase
G _i	G α _{i-1} bis G α _{i-3}	ubiquitär	Adenylatzyklase, K ⁺
	G α _{oA} und G α _{oB}	Gehirn	K ⁺
	G α _{t1} und G α _{t2}	Retina	Phosphodiesterase
	G α _z		
G _q	G α ₁₅ und G α ₁₆	Myeloid	Phospholipase C β
	G α ₁₄	Stromal, epithelial	Phospholipase C β
	G α ₁₁ und G α _q	ubiquitär	Phospholipase C β
G ₁₂	G α ₁₂	ubiquitär	Cl ⁻ -Kanal
	G α ₁₃	ubiquitär	
b-Untereinheit			
G β	G β ₁₋₄	ubiquitär	
g-Untereinheit			
G γ	G γ ₁	Retina	
	G γ ₂ und G γ ₃	Gehirn	
	G γ ₄ bis G γ ₇	ubiquitär	

Tab. 2: Übersicht über die verschiedenen Untereinheiten von G-Proteinen, ihre Verteilung und Effektoren

Allerdings geht man inzwischen aufgrund der komplexen Vielfalt in der Zusammensetzung des Heterotrimers und der regulatorischen Funktion des $\beta\gamma$ -Dimers (Clapham und Neer, 1993 und 1997) dazu über, die genaue Zusammensetzung des Heterotrimers für die Nomenklatur zu benutzen, sofern diese bekannt ist (Tab. 2).

1.3 Die intrazellulären Signalwege, die einer Aktivierung des mAChRs nachgeschaltet sein können

Hokin und Hokin konnten 1954 zeigen, dass die Aktivierung von mAChRen in der Bauchspeicheldrüse zur Entstehung von Phosphatidylinositol (PI) führt. PI ist Bestandteil der Plasmamembran und kann in zwei weiteren Schritten zu Phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP₂) phosphoryliert werden. Die Aktivierung des mAChRs kann nun zu einer Phospholipase C (PLC) vermittelten Spaltung von PIP₂ führen, wobei Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) entstehen. Beide Substanzen sind sehr potente sekundäre Botenstoffe.

IP₃ fördert die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (Berridge und Irvine, 1984; Streb et al., 1983). Die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium ist an einer Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden beteiligt, die sich auch gegenseitig beeinflussen können. Dies kann u.a. zu einer Calmodulin-vermittelten Aktivierung einer NO-Synthase führen und damit zu einer Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels (McKinney et al., 1990; Hu und El-Fakahany, 1993; Thompson et al., 1995). NO ist ein weiterer wichtiger sekundärer Botenstoff, der einerseits intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren kann (Bolotina et al., 1994; Lander et al., 1993 und 1995), aber andererseits auch durch die Zellmembran diffundieren und gemeinsame Aktionen benachbarter Zellen koordinieren kann (Fukuto, 1995; Kerwin et al., 1995). Eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration kann auch zu einer Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen. Von Astrozyten ist bekannt, dass dort die Aktivierung von mAChRen zu einer Verminderung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Dies geschieht nicht, wie erwartet, über eine Inhibierung der Adenylatzyklase-Aktivität, sondern über die Stimulation einer Calmodulin-regulierten Phosphodiesterase. (Evans et al., 1984; Cochaux et al., 1985).

DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), indem es die Affinität dieser Kinase für Kalzium erhöht, so dass schon geringere Konzentrationen von intrazellulärem Kalzium diese aktivieren (Nathanson, 1987). Auch hier spielt also die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder eine regulatorische Rolle. Die PKC ist bei einer Vielzahl von zellulären und physiologischen Kaskaden beteiligt (zur Übersicht: Nishizuka, 1984) und scheint auch der Vermittler zu sein, der die Aktivierung von mAChRen an die Inhibition von K⁺-Kanälen in Oozyten des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) koppelt (Descal et al., 1985).

Auch die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP spielen bei der Signalübermittlung nach Aktivierung von mAChRen eine wichtige Rolle. Die Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration kann einerseits über die Aktivierung einer Guanylatzyklase durch NO erfolgen (Study et al., 1978; El-Fakahany und Richelson, 1983). Es wird aber auch eine Beteiligung von Metaboliten des Arachidonsäure-Stoffwechsels und der Phospholipase A2 diskutiert (Snider et al., 1984). Bisher sind drei unterschiedliche Zielmoleküle bekannt, die auf eine Erhöhung des cGMP-Spiegels reagieren: die cGMP-abhängige Proteinkinase (Lohmann et al., 1997), eine cGMP-regulierte Phosphodiesterase (Degermann et al., 1997; Houslay und Milligan, 1997) und die CNG-Kanäle (Zagotta und Siegelbaum, 1996). D'Ascenzo und Kollegen fanden 2002 heraus, dass eine NO-gesteuerte Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu einer Hemmung von Kalzium-Kanälen (N-Typ) und damit zu einem verminderten Einstrom und einer geringeren intrazellulären Konzentration von Kalzium führen kann. Phosphodiesterasen ermöglichen eine Verknüpfung zwischen cGMP- und cAMP-Signalwegen, da sie über die Konzentration des einen zyklischen Nukleotids den Abbau des anderen Nukleotids beeinflussen können. cGMP-modulierte CNG-Kanäle sind aus der Retina (Ahmad et al., 1994; Kawai und Sterling, 1999) und aus Hippocampus-Neuronen (Leinders-Zufall et al., 1995; Bradley et al., 2001) bekannt.

Die Aktivierung von mAChRen führt bei vielen Zelltypen zu einer Verminderung der cAMP-Konzentration über die Inhibierung einer Adenylatzyklase (AC) (Watanabe et al., 1978; Jakobs et al., 1979), aber auch der gegenteilige Effekt, nämlich eine Erhöhung der cAMP-Konzentration über verschiedene Signalwege ist möglich (Tanner et al., 1986; Han et al., 1998). Verschiedene Isoformen von Adenylatzyklasen, die ihrerseits wieder von der Proteinkinase A (PKA), der Proteinkinase C (PKC) und der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase reguliert werden können

(Hurley, 1999), werden durch die Aktivierung von mAChRn gesteuert (Nathanson 2000). Dies zeigt die Komplexität dieser verschiedenen, möglicherweise miteinander verknüpften, Signalwege auf. Schließlich können cAMP und cGMP spezielle Ionenkanäle aktivieren, die CNG-Kanäle (zur Übersicht: Kaupp und Seifert, 2002). cAMP-modulierte CNG-Kanäle kennt man hauptsächlich aus Neuronen von Invertebraten, wo diese weit verbreitet sind (Kehoe, 1990 a, b; Sudlow et al., 1993; Hockberger und Swandulla, 1987).

Die G-Proteine, die die Aktivierung des Rezeptors an die sekundären Botenstoffe weitergeben, können ihrerseits das Signal auch direkt mit Ionenkanälen verbinden. Dies ist bekannt von der direkten Kopplung des mAChRs an einwärts gleichrichtende Kalzium-Kanäle oder Kalzium-Kanäle des P/Q-Typs (Clapham und Neer, 1997). Erstere werden aktiviert, wenn ACh bindet, letztere gehemmt.

1.4 Cholinerge Modulation der GABAergen Transmission

Acetylcholin (ACh) ist ein wichtiger Neurotransmitter im ZNS und hat, je nachdem ob es an nikotinische oder muskarinische Rezeptoren bindet, unterschiedliche Wirkungen. Es spielt bei den verschiedensten kognitiven Prozessen eine Rolle, wie z.B. Aufmerksamkeit (Bucci et al., 1998; Voytko et al., 1994), Lernen (Fine et al., 1997; Miranda und Bermudez-Rattoni, 1999), Gedächtnis (Hasselmo et al., 1992; Sarter und Bruno 1997), Stressantwort (Newman et al., 2001), Schlaf (Jasper und Tessiert, 1971; Jimenez-Capdeville und Dykes, 1996) sowie bei der kortikalen Modulation sensorischer Information (Donoghue und Carrol, 1987; Metherate et al., 1992; Pepeu und Blandina, 1998; Rasmusson und Dykes, 1988).

Die synaptische Antwort eines Neurons gründet sich auf eine komplexe Interaktion zwischen exzitatorischen (hauptsächlich glutamatergen) und inhibitorischen (hauptsächlich GABAergen) Signalen. Eine Feinabstimmung dieser Signale ist z.B. durch eine cholinerge Modulationen möglich. So konnte gezeigt werden, dass präsynaptische nikotinische und muskarinische AChRn im präfrontalen Kortex der Ratte die Glutamatfreisetzung erhöhen (Gioanni et al., 1999; Vidal und Changeux. 1993). Radcliffe und Kollegen zeigten 1999, dass auch die Freisetzung von GABA durch die Aktivierung präsynaptischer nAChRn im Hippocampus erhöht werden kann. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass sich die GABAerge synaptische

Übertragung im Colliculus inferior (IC) durch die Aktivierung von mAChRen potenziert lässt. Dabei wurden bei allen untersuchten Neuronen spontane GABAerge postsynaptische Ströme gemessen, deren Frequenz sich durch die Gabe von Muskarin erhöhen ließ (Yigit et al., 2003).

Die Aktivierung von postsynaptischen mAChRen kann, über die Veränderung des Membranpotentials, eine „schnelle Erregbarkeit“ von GABAergen Interneuronen auslösen (McCormick und Prince, 1986), was zu einer erhöhten Freisetzung von GABA führen kann (Kawagushi, 1997). Elektrophysiologische Experimente zeigten, dass die Applikation muskarinischer Agonisten sowohl die exzitatorische, als auch die inhibitorische Transmission (Bonner et al., 1987; Murakoshi, 1995) über prä- oder postsynaptische Mechanismen (Kimura und Baughmann, 1997) verändern kann. Auch eine GABAerge Modulation der cholinergen Transmission ist möglich. So kann ausgeschüttetes GABA extrasynaptisch diffundieren, GABA_A Rezeptoren auf cholinergen Endigungen aktivieren und dadurch die ACh-Freisetzung inhibieren (Materi und Semba, 2001). Zusätzlich kann eine GABAerge Innervation auch die Freisetzung neu synthetisierten Acetylcholins aktivieren (Bonanno et al., 1991), oder mithilfe zweier aufeinander folgender GABAerger Synapsen die Inhibierung der ACh-Freisetzung unterdrücken (Pepeu und Blandina, 1998).

Durch die Doppelfärbung von Cholinacetyl-Transferase (ChAt) und GABA konnte man beispielsweise feststellen, dass 88% der im Kortex vorhandenen cholinergen bipolaren Interneuronen gleichzeitig GABA-Rezeptoren exprimieren (Eckenstein und Thoenen, 1983; Levey et al., 1984; Bayraktar et al., 1997). Von den cholinergen Neuronen des Nucleus basalis magnocellularis (NBM) die zum Cortex projizieren, exprimieren 30-35% gleichzeitig GABA-Rezeptoren (Fisher et al., 1988) und ihre Axone verbinden sich bevorzugt mit GABAergen Interneuronen (Freund und Meskenaite, 1992) um diese zu disinhibieren (Jimenez-Capdeville et al., 1997).

1.5 Der Colliculus inferior

Der Colliculus inferior (IC) ist ein zentraler Kern der Hörbahn von Säugetieren (Abb. 3). Er erhält Eingänge von unterschiedlichen Stammhirn-Kernen, höheren auditorischen und nicht-auditorischen Strukturen und dem kontralateralen IC (zur Übersicht: Faye-Lund und Osen, 1985; Oliver und Shneiderman, 1991). Der IC vermittelt das binaurale Hören, die Lokalisation von Geräuschen, die Analyse von

Frequenzen und spielt zusammen mit anderen auditorischen Strukturen eine große Rolle im Erkennen von Sprache (Pollak et al., 2002; Li und Yue, 2002; Batra und Fitzpatrick, 2002). Der inhibitorische Neurotransmitter GABA spielt dabei eine wichtige Rolle (Caspary et al., 1995 und 2002; Ma et al., 2002; Faingold, 2002). Zusätzlich zu den GABAergen Eingängen aus dem lateralen Lemniscus und dem kontralateralen IC gibt es eine Vielzahl von extrinsischen, intrinsischen und kommissuralen Eingängen, die auf GABA basieren (Adams und Mugnaini, 1984; Helfert et al., 1998; Huffman und Henson, 1990; Shneiderman und Oliver, 1989; Shneiderman et al., 1988 und 1993). Morphologische Studien lassen vermuten, dass die GABAergen Projektionen vom dorsalen Nukleus des lateralen Lemniscus (DNLL) zum zentralen Kern des IC, dem ICC, tonotop angeordnet sind (Palombi und Capary, 1996; Moore et al., 1998; Merchan et al., 1994; Saldana und Merchan, 1992).

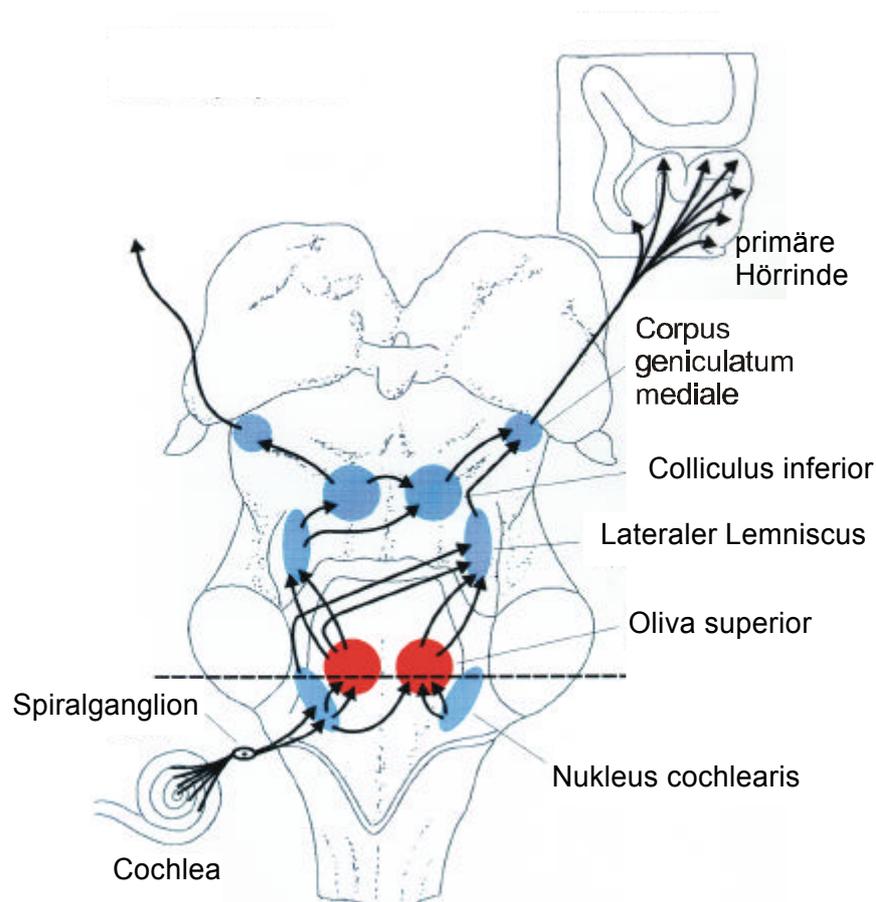


Abb. 3: Schematische Abbildung der Hörbahn. Zur besseren Übersicht sind nur die von einer Seite ausgehenden Verbindungen eingezeichnet (mod. nach: Klinke und Silbernagl, 2001)

Zwei Zelltypen lassen sich morphologisch im ICC unterscheiden. Das sind zu etwa 70% die diskusförmigen Zellen (*disc-shaped cells*), deren Dendriten auf einer Ebene liegen und deren Axone mit vielen anderen diskusförmigen Zellen Synapsen bilden und zu etwa 30% die sternförmigen Zellen (*stellate cells*), die einen unregelmäßig geformten, eher runden Dendritenbaum aufweisen, der typischerweise orthogonal zu den axonalen Bahnen liegt (Oliver und Shneiderman, 1991).

Elektrophysiologisch lassen sich 6 Zelltypen aufgrund ihres Erregungsmusters klassifizieren (zur Übersicht: Sivaramakrishnan und Oliver, 2001). Die Komplexität des neuronalen Netzwerks im IC stellt das folgende Beispiel kurz dar: Binaurale Information werden durch sog. exzitatorische-inhibitorische Neurone (EI-Neurone) kodiert, die so heißen, weil sie durch die Reizung eines Ohres erregt und durch die Reizung des anderen Ohres gehemmt werden. EI-Neurone findet man im lateralen Kern der Oliva superior (LSO), dem DNLL und dem IC. Aktuelle Studien lassen vermuten, dass die EI-Neurone, die in LSO und DNLL spezifiziert werden, auf einzelne Zellen des IC konvergieren. Andere Studien zeigen, dass die Eingänge aus der LSO und dem DNLL eine große Anzahl von Antwort-Transformationen bei einzelnen IC-Zellen generieren. Diese Transformationen, die u.a. Veränderungen in der Reiz-Dauer und der Empfindlichkeit beinhalten, basieren auf inhibitorischer Innervation des IC (Pollak et al., 2002).

Dieses komplexe neuronale Netzwerk muss während der Entwicklung des IC angelegt und die wichtigen synaptischen Verbindungen müssen stabilisiert werden. Wie im nachfolgend Abschnitt deutlich wird, eignet sich der IC für solche Netzwerk-Untersuchungen besonders gut, da die Projektionen zum Zeitpunkt P5 schon wie im erwachsenen IC vorliegen und die Verschaltungen der Neurone bis zum Beginn des Hörens (*Onset of Hearing*) ab etwa P12 nur noch moduliert werden.

1.6 Die zeitliche Entwicklung des IC

Ab dem Embryonaltag 12 (E12) werden in der LSO Zellen gebildet, die zum ipsilateralen IC projizieren (Kudo et al., 1992). Im IC selbst bildet sich eine intermediäre Zone (IZ), die ab E13 große Mengen an Axonen und jungen Neuronen enthält (Repetto-Antoine und Meininger, 1982). Bis zum Tag der Geburt (Postnataler Tag 0, P0) entwickelt sich der IC kontinuierlich (Altman und Bayer, 1981). Ab E14

kommen die ersten Axone von Neuronen des Hirnstamms im IC an (Repetto-Antoine und Meininger, 1982). Kurze Zeit später (E16-17) kann man externe, perizentrale und zentrale Kerne unterscheiden (Repetto-Antoine und Meininger, 1982) und Axone des contralateralen Nucleus cochlearis (CN) dringen in den IC ein, bilden aber erst ab E18 Kollateralen aus (Kandler und Friauf, 1993). Zu diesem Zeitpunkt besitzt der IC bereits seine adulte Gestalt (Marin-Padilla, 1988). Einen Tag später kann man zum ersten Mal Axone aus dem IC im Nucleus geniculate mediale (MG) finden (Asanuma et al., 1986 und 1988). Zum Zeitpunkt P0 findet man Projektionen vom CN und SOC zum zentralen Nucleus des IC (Kandler und Friauf, 1993; Friauf und Kandler, 1990; Maxwell et al., 1988; Coleman 1990). Zu diesem Zeitpunkt ist die Topographie nicht mehr von der des adulten IC zu unterscheiden (Friauf und Kandler, 1990). Schon zum Zeitpunkt P1 kann man Synapsen im IC feststellen (Pysh, 1969). Zum Zeitpunkt P3 sind die Axone aus dem CN auf die ventrale Hälfte des IC beschränkt (Kandler und Friauf, 1993). Ausserdem können zum ersten Mal Projektionen vom auditorischen Kortex festgestellt werden (Maxwell und Coleman, 1989). Ab P4 innervieren die Axone des CN den gesamten IC und ab P5 entspricht das Projektionsmuster dem des adulten IC (Kandler und Friauf 1993; Coleman 1990). Von P8 bis P16 wachsen im IC nur noch die proximalen und intermedialen dendritischen Abschnitte der Neurone (Dardennes et al., 1984). Ab P15 bis P26 kommt es zu einer starken Zunahme an Myelin (Shah et al., 1978) und ab P24 ist das Blutgefäßmuster ausgereift (Andrew und Paterson, 1989).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen im IC der juvenilen Ratte (P5-P12) sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Gibt es eine Modulation der GABAergen Transmission über muskarinische Acetylcholinrezeptoren?
2. Welcher muskarinische Rezeptorsubtyp spielt dabei eine Rolle?
3. Welche intrazelluläre Signalkette wird durch Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors ausgelöst?

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Die in den Versuchen verwendeten Ratten stammten aus klinikinternen Nachzuchten von SD (*Sprague Dawley*) Ratten die über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Sie hatten einen 12h-Tag-Nacht-Zyklus und bekamen Standard-Futter und Wasser ad libitum. Die Haltung erfolgte in Pärchen in Standard-Käfigen.

2.2 Präparation der Hirnschnitte für Patch-Clamp

Für die Patch-Clamp Versuche wurden 5-12 Tage (P5-P12) alte Tiere verwendet. Die Ratte wurde zu Beginn des Versuchstages dekapitiert, wobei der Kopf sofort in eisgekühlte, mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaste Präparationslösung (PRÄP1) überführt wurde. Anschließend wurden die Kopfhaut, sowie die Schädeldecke von caudal nach rostral aufgetrennt und entfernt und das Gehirn wurde aus dem Schädel mit Hilfe eines Spatels herausgehoben (Abb. 4). Ein Teil des Kleinhirns wurde entfernt, so dass die Vierhügelplatte mit Colliculus inferior (IC) und Colliculus superior (SC) gut sichtbar war. Ein Teil des Kortex wurde entfernt, so dass eine gerade Fläche entstand.

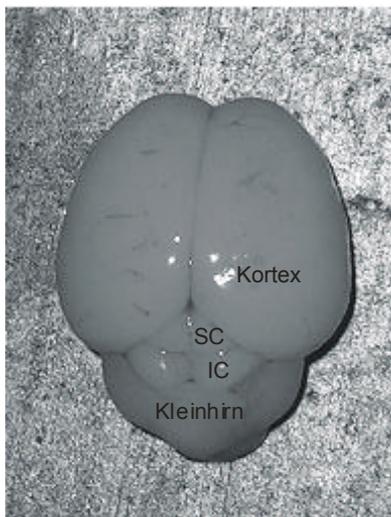


Abb. 4: Aufsicht auf das Gehirn einer sieben Tage alten Ratte (P7). Man sieht Teile des Kleinhirns, sowie den Kortex und dazwischen die Vierhügelplatte mit Colliculus inferior (IC) und Colliculus superior (SC).

Mit Cyanacrylatkleber (Roticoll 1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde das Gehirn mit der so entstandenen ebenen Fläche in die Kammer eines Vibratoms (Leica VT 1000, Leica Bensheim, Deutschland) geklebt und zur Unterstützung des Gewebes mit warmer Gelatine umschichtet. Die gesamte Kammer wurde mit eiskalter PRÄP1 aufgefüllt und mit Carbogen begast. Mit dem Vibratom wurden 250µM dicke, horizontale Schnitte des IC angefertigt. Dabei erhielt man pro Gehirn 2-5 Schnitte. Die Schnitte wurden für eine Stunde in ein Gefäß mit begaster Badlösung überführt bevor sie in die Probenkammer eingebracht und mit einem Netzchen (ein Platindrahtrahmen, bespannt mit einem Nylonnetz) fixiert wurden.

2.3 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist für Untersuchungen von Ionenkanälen und Transmitterrezeptoren biologischer Membranen eines der wichtigsten neurophysiologischen Untersuchungsverfahren und derzeit die meistverwendete Meßmethode in der Elektrophysiologie. Die Technik entwickelte sich in den frühen 1970er Jahren aus der Spannungsklemmen-Technik (*voltage clamp*), mit der Kenneth S. Cole und H. J. Curtis Ende der 1930er Jahre nachwiesen, dass sich die Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle bei Erregung erhöht. Bert Sakmann und Erwin Neher erhielten für die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik, mit der sie die „Funktion einzelner zellulärer Ionenkanäle“ untersuchten, 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Grundlage der Methode ist die elektrische Isolation eines kleinen Membranstücks (*patch*) durch Aufsetzen und Ansaugen einer Glaspipette auf die Zelloberfläche. Diese *cell-attached*-Konfiguration lässt sich nun für unterschiedliche Anwendungen fast beliebig anpassen (Übersicht: Numberger und Draguhn, 1996). Durchreißt man die Membran unter der Pipette mit einem kurzen Saugpuls erhält man einen offenen Zugang zum Zytoplasma und misst die Ströme über die gesamte Zellmembran. Diese Konfiguration wird als Ganzzellklemme (*whole cell-clamp*) bezeichnet und entspricht der konventionellen intrazellulären Ableitung. Sie kann, je nach Untersuchungsobjekt, in der Strom- oder in der Spannungsklemme genutzt werden. Bei der Spannungsklemme (*voltage clamp*) werden Ströme gemessen und sie findet Anwendung z.B. bei der Untersuchung von inhibitorischen und exzitatorischen postsynaptischen Strömen. Im Gegensatz dazu,

wird bei der Stromklemme (*current clamp*) eine Änderung des Membranpotentials gemessen, was sich bei der Untersuchung von Aktionspotentialen anbietet.

Alle Messungen in der vorliegenden Arbeit erfolgen im Ganzzell-Modus in der Spannungsklemm-Konfiguration.

2.4 Herstellung der Pipetten

Bei der Herstellung der Pipetten ist die richtige Auswahl des Glases sehr wichtig. Weiche Gläser, wie z.B. Sodagläser, lassen sich dank ihres niedrigen Schmelzpunktes von unter 700°C gut zu Pipetten mit niedrigem Widerstand ziehen und polieren. Allerdings führen ihre elektrischen Eigenschaften oft zu einem starken Rauschen. Quarzglas, dessen Schmelzpunkt bei etwa 1600°C liegt, hat die besten elektrischen Eigenschaften, kann aber nur von einem speziellen CO₂-Laser stark genug erhitzt werden, um Pipetten ziehen zu können. In dieser Arbeit wurden mittelharte Borosilikat Glaskapillaren (1,5 mm Aussendurchmesser, 0,86 mm Innendurchmesser, mit Filament, Harvard Apparatus LTD, Edenbridge, UK) verwendet. Der Schmelzpunkt von Borosilikatglass liegt bei 700 bis 850°C. An einem vollautomatischen Horizontal-Pipetten-Ziehgerät (DMS-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) wurden Pipetten mit einem Widerstand von 4 bis 6 MΩ gezogen.

2.5 Aufbau des Messplatzes

Auf dem Objektisch eines aufrechten Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde die Probenkammer mit dem IC-Schnitt eingespannt (Abb. 5). Die Glaspipette wurde mit der Pippettenlösung (INCS1) gefüllt, in den Elektrodenhalter (Heka, Lambrecht, Deutschland) eingelegt und über einen chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker des Patch-Clamp-Verstärkers (EPC9, Heka, Lambrecht, Deutschland) verbunden. Der Vorverstärker wurde von einem Mikromanipulator gehalten, so dass die Ableitelektrode genau positioniert werden konnte.

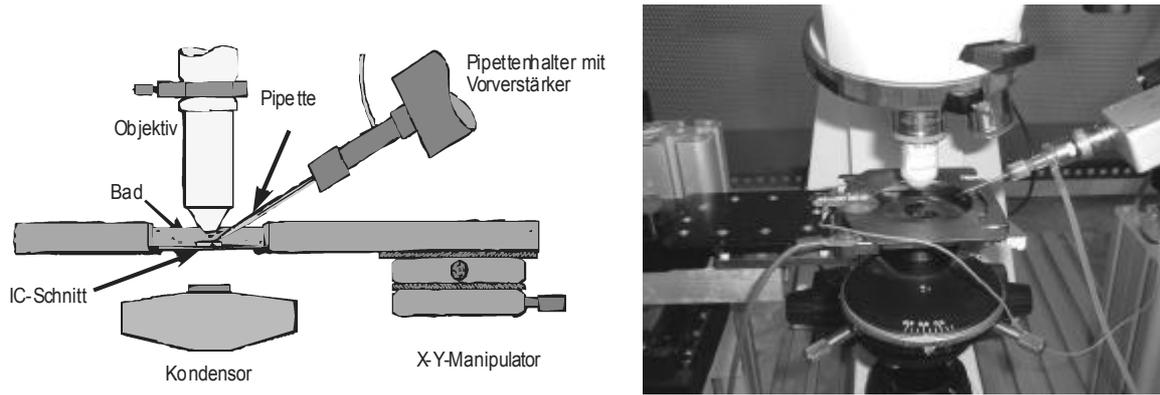


Abb. 5: Anordnung des Objektstischs eines Patch-Clamp Mikroskops mit Patch-Pipette und Vorverstärker.

Die Positionierung der Elektroden und die Herstellung der Messkonfiguration erfolgte unter optischer Kontrolle. Eine Digitalkamera (PCO Computer Optics GmbH, Kelheim, Deutschland) übertrug das Bild des Objektes auf einen Monitor. Als Objektiv diente ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer 40fachen Vergrößerung. Zusätzlich wurde durch einen Optovareinschub (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) das Bild um den Faktor 2,5 vergrößert.

Um Schwingungen zu reduzieren war der Messplatz auf einen Druckluft-gefederten Tisch (Physik-Instruments GmbH, Waldbronn, Deutschland) montiert. Ein auf einem Übertisch montierter Faraday-Käfig diente zur Abschirmung von elektrischem Störungen (Abb. 6).

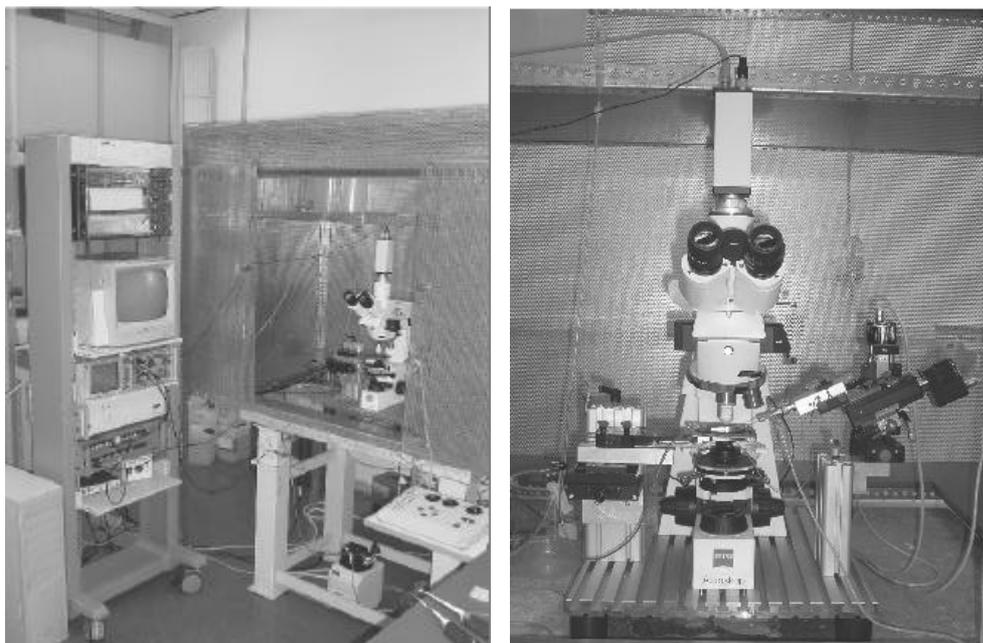


Abb. 6: Links: Das in dieser Untersuchung verwendete Setup. Rechts: Die Anordnung des Mikroskops mit Pipette und Vorverstärker auf dem schwingungsgedämpften Tisch.

Mit Hilfe eines elektrischen Mikromanipulators (LN Mini 25, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) wurde die Patchpipette auf die Membran einer Zelle aufgesetzt und die Ganzzell-Konfiguration hergestellt. Die kapazitiven Eigenschaften der Membran und der Elektrode, sowie der Serienwiderstand zwischen der Pipette und den Membranresten in der Pipette wurden automatisch durch die Software des EPC9-Patch-Clamp-Verstärkers abgeglichen. Die inhibitorischen postsynaptischen Ströme (*inhibitory postsynaptic currents*, IPSCs) wurden Hilfe des Software-Pakets Pulse/PulseFit (EPC9, Heka, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet. Bearbeitet und ausgewertet wurden die Messungen anschließend sowohl mit PulseFit, als auch mit dem Programm MiniAnalysis (Synptosoft, Leonia, NJ, USA), welches der Auswertung von Amplituden und Frequenzen postsynaptischer Ströme dient. Zusätzlich wurden die Messung mit einem Papierschreiber aufgezeichnet.

Während der Versuche waren die Gewebeschnitte mit Extrazellulärlösung (EXS1) umspült. Die Lösung wurde aus einem erhöhten Reservoir in die Messkammer geleitet (schwerkraftgetrieben) und auf der Gegenseite des Zulaufs mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Nach dem gleichen Verfahren wurden die Agonisten und Antagonisten in die Messkammer eingespült (Badapplikation). Auf diese Weise wurden die IC-Schnitte vollständig mit der jeweiligen Lösung umspült.

2.6 Experimente

Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Sie wurden im Ganzzell-Modus unter Verwendung der Spannungsklemm-Konfiguration bei einem Haltepotential von -60mV durchgeführt. Die Abtastrate betrug bei der Aufnahme der Spannungssprungprotokolle 10 kHz und bei der Aufnahme der IPSCs 5 kHz. Die Aufnahmen wurden mit dem internen Tiefpass-Filter des Verstärkers mit 2 kHz gefiltert.

Zuerst wurde zur Charakterisierung der untersuchten Zelle ein Spannungssprungprotokoll ausgeführt. Dabei wurde das Membranpotential sprunghaft von einem Ausgangswert auf ein Testpotential angehoben oder gesenkt. Durch diese Potentialänderungen wird die Membranleitfähigkeit bestimmter Ionen verändert. Dadurch entsteht ein für Nervenzellen charakteristisches Antwortmuster und erlaubt, diese von anderen im IC-Schnitt vorhandenen Zellen zu unterscheiden. Die

Spannungssprünge in diesem Versuch reichten von -100mV bis + 70mV im 10mV-Abstand bei einer Dauer von 100 ms und einem Zeitabstand von 50ms zwischen den Sprüngen.

Anschließend erfolgte die Messung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Ströme (sIPSCs). Die intrazelluläre Chloridkonzentration, die mit der INCS1-Lösung festgelegt wurde, betrug 144 mM und die Chloridkonzentration der Extrazellulärlösung EXS1 betrug 133,5 mM. Daraus ergab sich nach der Nernst-Gleichung ein Gleichgewichtspotential von +3mV für Chlorid. Dies bedeutet, dass durch Chlorid getragene Ströme als Einstrom, d.h. als eine Ablenkung von der Nullstromlinie nach unten, dargestellt werden. Die Grundfrequenz der IPSCs wurde ermittelt und anschließend wurden über Badapplikation, je nach Versuchsvorhaben, unterschiedliche Substanzen appliziert. Die anschließenden Messungen dauerten zwischen 40 Minuten und 2,5 Stunden.

Die Frequenz der IPSCs wurde bei der Auswertung der Versuche mit der MiniAnalysis-Software gemessen. Dabei diente als Grundlage zur Ermittlung der Frequenz der sIPSCs ein Abschnitt von 300s vor der Applikation der ersten Substanz. Dadurch sollte gewährleistet sein, dass die Schwankungen der sIPSC-Frequenz, die häufig zu Beginn eines Experiments beobachtet wurden, nicht in die Berechnung mit eingingen. Wurde anschließend Muskarin appliziert, so dienten hierbei die ersten 120s nach Einsetzen der Wirkung zur Bestimmung einer mittleren Frequenz. Das gleiche Zeitprotokoll wurde auch bei der Co-Applikation von Muskarin mit einem Antagonisten einer Komponente des Signalwegs angewandt. Sollte die Frequenz während der alleinigen Applikation des Signalweg-Antagonisten untersucht werden, so wurde eine Zeitspanne von 120s unmittelbar vor der Co-Applikation von Muskarin ausgewertet. Dies sollte sicherstellen, dass der Antagonist genügend Zeit hatte, um intrazellulär zu wirken. Wurde neben Muskarin ein zweiter Agonist appliziert, so dienten auch hier die ersten 120 s des Effekts zur Bestimmung der mittleren IPSC-Frequenz. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPadPrism 4.03 für Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA) und die Darstellung der Ergebnisse mittels Excel (Microsoft, Office 2000 Paket).

Die extrazelluläre Lösung enthielt standardmäßig 1mM Kynurenat und 0,5 μ M Strychnin um Ströme durch ionotrope Glutamatrezeptoren bzw. Glycin-Rezeptoren

und nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRen), die eine $\alpha 7$ -Untereinheit enthalten, zu blockieren.

2.7 Statistik

Als Standardmethode zur Ermittlung der Signifikanz von Daten verwendet man für gewöhnlich den student'schen T-Test. Leider wird die Aussagekraft dieses Tests immer geringer, je kleiner die Datenmenge ist und (bei gepaarten Daten) je mehr sich die einzelnen Datenpaare unterscheiden. Wenn man wenige Daten hat, die in der Größenordnung sehr streuen, kann man verschiedene Methoden anwenden um trotzdem einen student'schen T-Test anwenden zu können. Zum Einen kann man die Datenmenge erhöhen, indem man die gemessenen Werte mehrmals in die Berechnungen aufnimmt. Dadurch erhöht man die Anzahl der Proben und verringert die Standardabweichung des Mittelwerts. Die zweite Möglichkeit besteht darin, die Daten zu logarithmieren. Die logarithmierten Daten sind vergleichbar in der Größe, ungefähr symmetrisch, und haben ungefähr gleiche Varianzen, so dass man klassische Verfahren wie den student'schen T-Test anwenden kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung des Mann-Whitney-Tests für gepaarte Daten. Dieses Testverfahren ermöglicht den Vergleich von Daten die sich in der Größe stark unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde folgendes Verfahren angewendet:

Die mittleren Frequenzen der einzelnen Zellen in den untersuchten Gruppen wurden in Tabellenform dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde das Verhältnis der Frequenz unter Muskarin und Kontrollmessung, bzw. Agonist/Antagonist und Kontrollmessung für jede einzelne Zelle gebildet und dann über diese Verhältnisse gemittelt. Somit erhielt man den mittleren Effekt des Muskarins.

Mit den dadurch erhaltenen Werten wurde ein einseitiger T-Test gemacht, wobei untersucht wurde, ob der Mittelwert sich signifikant von 1 unterscheidet, denn wenn sich die Frequenz unter Muskarin nicht von der Frequenz der Kontrolle unterscheiden würde, dann wäre der Quotient der beiden Werte gleich 1.

Da es sich um von einander unabhängige Messungen an verschiedenen Zellen handelt, wird der Mittelwert + Standardfehler angegeben und nicht Mittelwert + Standardabweichung.

Dieses Verfahren hat gegenüber den anderen folgende Vorteile: Zum Einen bleiben die errechneten Daten immer noch anschaulich und es wird sofort klar (im Gegensatz zu logarithmierten Daten) inwieweit sich die Frequenz unter Muskarin von der Kontrollfrequenzen unterscheidet. Zum Anderen kann trotz der Varianz der einzelnen Datenpaare ein klassischer T-Test angewendet werden, der gegenüber des eher selten verwendeten Mann-Whitney-Tests den Vorteil hat, das er als Standardmethode allgemein bekannt ist. Dadurch entsteht nicht der Eindruck, dass man mit besonders exotischen Testverfahren versucht, die erhaltenen Daten signifikant zu rechnen.

2.8 Lösungen und applizierte Substanzen

Alle während der Experimente verwendeten Lösungen wurden am Versuchstag frisch angesetzt und mit Carbogen begast. Agonisten und Antagonisten wurden in Lösung bei -20°C aufbewahrt und am Versuchstag frisch zur Superfusionslösung dazugegeben.

Präparationslösung (PRÄP1):

2,5 mM KCl, 26 mM NaHCO_3^- , 260mM Glucose x H_2O , 2 mM Natrium-Pyruvat, 3 mM Myo-Inositol, 2 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

Der pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl auf 7,2 eingestellt

Extrazelluläre Superfusionslösung (EXS1):

125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 26mM NaHCO_3^- , 1,25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10Glucose x H_2O ,
2 $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

Der pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt

Direkt vor Versuchsbeginn wurden $0,5\mu\text{M}$ Strychnin und 1mM Kynurenat dazugegeben.

Intrazelluläre Pipettenlösung (INCS1):

140 mM CsCl, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 10 mM HEPES

Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt.

Direkt vor Versuchsbeginn wurden aus tiefgefrorenen Lösungen noch folgende Substanzen zur INCS1 zugegeben:

3mM Mg²⁺-ATP, 0,5 mM Na⁺-GTP, 12 mM Phosphokreatin

Folgende Modulatoren wurden in den Versuchen eingesetzt:

Substanz	Funktion	Konz.	Bezugsquelle
Chelerythrine chloride (1,2-Dimethoxy-Nmethyl(1,3)benzodioxolo(5,6-c)phenanthridinium chloride)	PKC-Antagonist	5µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine)	PKC/PKA-Antagonist	10µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
U73122 (1-[6-(((17β)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione)	PLC- Antagonist	10µM	Tocris, Köln, Deutschland
W7 (N-(6-Aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride)	Calmodulin-Antagonist	30µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
8-br-cGMP (8-Bromoguanosine-3',5'-cyclomonophosphate sodium salt)	Erhöhung von [cGMP]i	100µM-1mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-NAME (N _w -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride)	NOS- Antagonist	1mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)	sGC- Antagonist	10µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4-DAMP (4-Diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide)	M3/M5 Rezeptor-Antagonist	50nM	Tocris, Köln, Deutschland
Mecamylamine hydrochloride (N,2,3,3-Tetramethylbicyclo [2.2.1]heptan-2-amine hydrochloride)	nAChR- Antagonist	10µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Arginin (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid	NO-Donor	100µM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bicuculline methiodide	GABA _A -Antagonist	10µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(+)-Muskarine chloride	Agonist der mAChR	10-20µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland ICN Biomedicals
Strychnine hydrochloride	Glycinrezeptor-Antagonist	0,5 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kynurenic acid (4-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid)	Antagonist ionotr. Glutamatrezeptoren	1mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SQ 22,536 (9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine)	Adenylatcyclase-Antagonist	100µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
8-br-cAMP (8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate)	Erhöhung von [cAMP]i	100-400µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 3: Die in den Versuchen verwendeten Agonisten und Antagonisten

3. Ergebnisse

3.1 Modulation der GABAergen Transmission über muskarinische Acetylcholinrezeptoren

In diesem Projekt wurden insgesamt 136 Zellen bezüglich der muskarinischen Modulation der GABAergen Transmission untersucht. Die verwendete Superfusionslösung EXS1 enthielt 1mM Kynurenat und 0,5 μ M Strychnin um ionotrope Glutamatrezeptoren, Glycinrezeptoren und nikotinische Acetylcholinrezeptoren, die eine α 7-Untereinheit enthalten, zu blockieren. Bei 41,2 % der Zellen konnte eine Erhöhung der Frequenz der GABAergen IPSCs durch Badapplikation von Muskarin beobachtet werden (n = 56). Dabei nahm ab P10 der Anteil der Zellen, die auf die Muskarin-Applikation mit einer Erhöhung der Frequenz der GABAergen IPSCs reagierten, zu (Abb. 7).

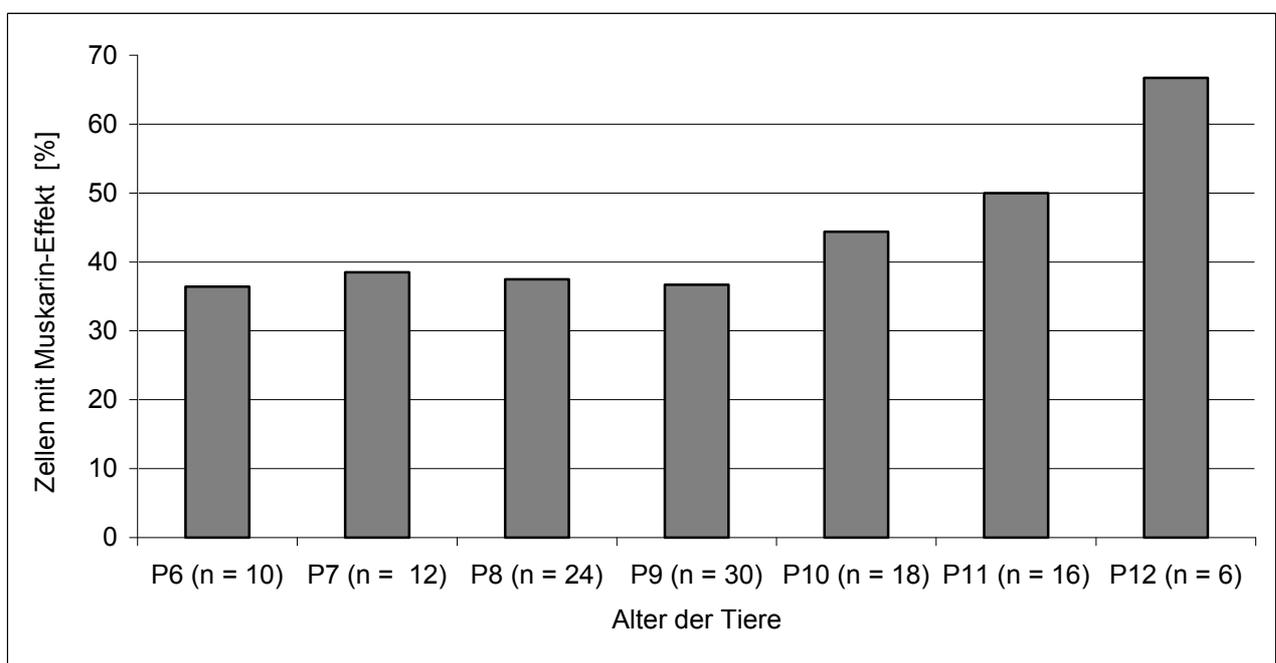


Abb. 7: Prozentualer Anteil von Zellen, die nach der Applikation von Muskarin mit einer Erhöhung der GABAergen IPSC-Frequenz reagierten. Dargestellt sind nur Altersstufen in denen mehr als 5 Zellen untersucht wurden.

Die spontanen IPSCs (sIPSCs) der untersuchten Zellen wurden für mehrere Minuten aufgezeichnet. Anschließend diente eine Sequenz von 300 s zur Bestimmung der

Frequenz der sIPSCs. Diese Frequenz wurde als Kontrollfrequenz definiert. Die sIPSCs traten mit einer durchschnittlichen Frequenz von $0,48 \pm 0,06$ Hz (MW \pm SE) auf (n = 54). Die Applikation von $10\mu\text{M}$ Muskarin führte zu einer Steigerung der Frequenz der IPSCs auf $3,01 \pm 0,7$ Hz (n = 20) und nach Applikation von $20\mu\text{M}$ Muskarin auf $2,36 \pm 0,57$ (n = 28).

Die Muskarin-Applikation erhöhte die Frequenz der IPSCs im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 5,6 (n = 48). Die Frequenzen der sIPSCs variierten in den einzelnen Zellen von 0,02 - 2,7 Hz und nach Muskarin-Applikation in einem Bereich von 0,12 - 15 Hz. Die Höhe der Frequenz war weder in der Kontrolle, noch während der Applikation von Muskarin, mit dem Alter der Tiere korreliert.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Applikation von Muskarin weder die Amplitude, noch die Deaktivierungs-/Desensitisierungskinetik der GABAergen IPSCs im IC beeinflussen. Auch die Membraneigenschaften der Zellen wurden durch die Applikation von Muskarin nicht verändert (Yigit et al., 2003). Aus diesem Grund wurden diese Parameter in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

3.2 Der GABAerge Ursprung der gemessenen IPSCs

Bei diesem Experiment wurde unter Verwendung des GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicucullin überprüft, ob die sIPSCs und die von Muskarin hervorgerufenen IPSCs GABAergen Ursprungs sind. Dafür wurden die durch Muskarin ($10\mu\text{M}$) evozierten IPSCs mittels Bicucullin (Bicuculline methiodide) blockiert. Es wurden zunächst für 11 bis 15 min die sIPSCs in der Standard-Superfusionslösung (EXS1 inklusive 1mM Kynurenat und $0,5\mu\text{M}$ Strychnin) aufgezeichnet. Anschließend wurde eine Steigerung der Frequenz der IPSCs hervorgerufen, indem für 30 s $10\mu\text{M}$ Muskarin über die Badlösung appliziert wurde und danach für 10 min wieder ausgewaschen. Es erfolgte die Applikation von Bicucullin ($10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$) für 14-16 min, wobei nach 10 min erneut Muskarin ($10\mu\text{M}$) für 30 s appliziert wurde (Abb. 8).

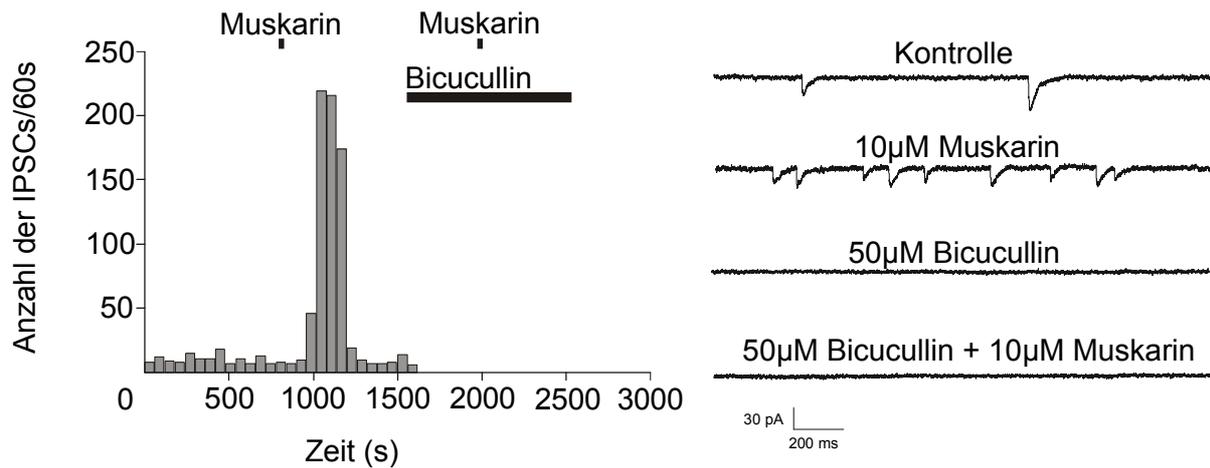


Abb. 8: Darstellung eines Experiments mit Bicucullin (50µM) und Muskarin (10µM). Links: In der Grafik sieht man die Anzahl der IPSCs gegen die Zeit aufgetragen. Ein Balken entspricht dabei der Anzahl der IPSCs in 60 s. Die sIPSCs treten in der Zeit von ca. 1-980 s mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,19 Hz auf. Nach der Applikation von Muskarin (dargestellt durch den kurzen Querbalken) kommt es von ca. 980-1250s zu einer Frequenzsteigerung der IPSCs auf durchschnittlich 3,63 Hz. Nach Applikation von Bicucullin (dargestellt durch den langen Querbalken) werden alle sIPSCs blockiert. Auch die Co-Applikation von Muskarin bei ca. 2000s führt zu keinem Anstieg der IPSCs. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden vier IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	Bicucullin	Musk. + Bic.
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,19	3,63	0	0
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,93	1,92	0	0
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,40	0,88	0	0
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,61	2,33	0	0
Mittlere Frequenz [Hz]	0,53 ± 0,16	2,19 ± 0,57	0	0

Tab. 4: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW ± SE) der Applikation von Muskarin und Bicucullin.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz Bicucullin / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + Bic. / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	19,11	0	0
Zelle 2	2,06	0	0
Zelle 3	2,18	0	0
Zelle 4	3,82	0	0
MW ± SE	6,79 ± 4,13	0	0
Signifikanzlevel p	0,255	--	--

Tab. 4: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Die sIPSCs traten mit einer Frequenz von $0,53 \pm 0,16$ Hz auf. Nach Applikation von Muskarin kam es zu einer Frequenzsteigerung um den Faktor 4,1 auf $2,19 \pm 0,57$ Hz. Durch die Applikation von $10\mu\text{M}$ ($n = 2$) bzw. $50\mu\text{M}$ ($n = 2$) Bicucullin konnte sowohl das Auftreten der sIPSCs, als auch das Auftreten der von Muskarin evozierten IPSCs vollständig blockiert werden (Tab. 3).

Das Verhältnis der Frequenz unter Muskarin zur Frequenz der Kontrolle lag im Mittel bei $6,79 \pm 4,13$. Dieses Ergebnis ist aufgrund der Größenunterschiede innerhalb der einzelnen Zellen nicht signifikant ($p = 0,255$). Das Verhältnis der Frequenz von Bicucullin, sowie Bicucullin + Muskarin zum Verhältnis der Frequenz der Kontrolle ist signifikant.

3.3 Die Modulation der IPSCs erfolgt über muskarinische und nicht über nikotinische Rezeptoren

Um abzuklären, ob die Erhöhung der IPSC-Frequenz nach Applikation von Muskarin ausschließlich über mAChRen vermittelt wurde, erfolgte eine Applikation von Mecamylamin (N,2,3,3-Tetramethylbicyclo [2.2.1]heptan-2-amine hydrochloride). Mecamylamin ist ein Breitspektrum-Antagonist der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRen). Dabei wurden zunächst in der Standard-Superfusionslösung für mehrere Minuten sIPSCs aufgezeichnet, anschließend für 30 s Muskarin ($10\mu\text{M}$) appliziert und innerhalb der folgenden 10 min wieder ausgewaschen. Es erfolgte eine

Applikation von Mecamylamin ($10\mu\text{M}$) für 18 min, wobei nach 8 min Muskarin ($10\mu\text{M}$) für 30 s appliziert wurde (Abb. 9).

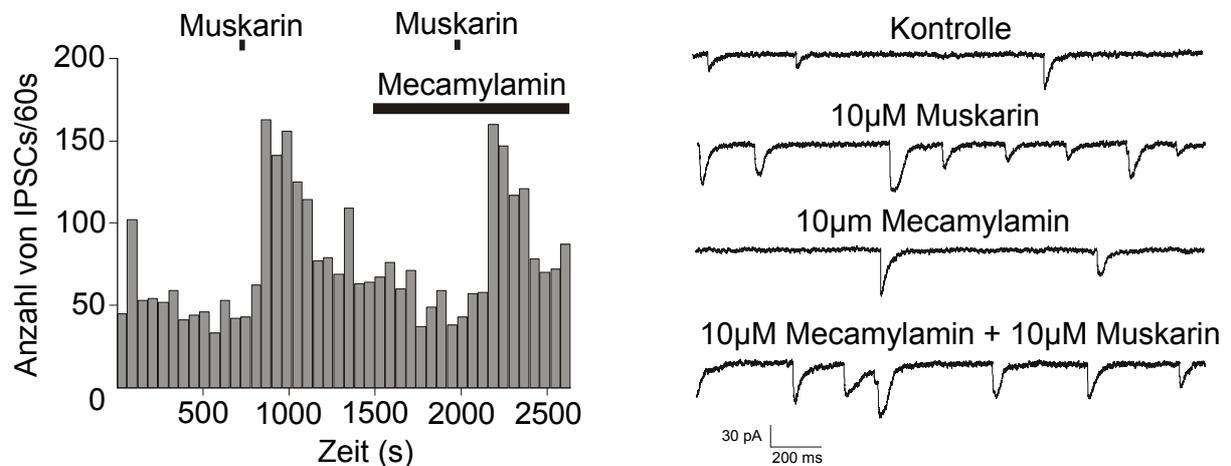


Abb. 9: Darstellung einer Messung mit Mecamylamin ($10\mu\text{M}$) und Muskarin ($10\mu\text{M}$). Links: Zu Beginn des Experiments traten die sIPSCs mit einer durchschnittlichen Frequenz von $0,74\text{ Hz}$ auf. Die Applikation von Muskarin führte ab 840 s zu einer Frequenzsteigerung auf durchschnittlich $2,54\text{ Hz}$. Die Co-Applikation von Mecamylamin und Muskarin führte nicht zu einer Blockierung der muskarinvermittelten Frequenzsteigerung, die mit durchschnittlich $2,56\text{ Hz}$ stabil blieb. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden fünf IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den Tabellen 6 und 7 dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	Mecamylamin	Musk. + Meca.
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,74	2,53	1,13	2,56
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,34	1,33	0,75	1,56
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,99	5,14	2,78	3,89
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,25	0,94	0,43	0,68
Frequenz Zelle 5 [Hz]	0,62	1,7	0,69	1,96
Mittlere Frequenz [Hz]	$0,59 \pm 0,13$	$2,33 \pm 0,75$	$1,16 \pm 0,42$	$2,13 \pm 0,54$

Tab. 6: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und Mecamylamin.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz Meca. / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + Meca. / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	3,41	1,53	3,46
Zelle 2	3,91	2,21	4,59
Zelle 3	5,17	2,81	2,91
Zelle 4	3,83	1,72	2,72
Zelle 5	2,73	1,11	3,07
MW ± SE	3,81 ± 0,4	1,88 ± 0,29	3,35 ± 0,33
Signifikanzlevel p	0,002	0,04	0,002

Tab. 7: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Bei den fünf untersuchten Zellen kam es durch die Applikation von 10µM Muskarin zu einer Steigerung der IPSC-Frequenz um den Faktor 4 auf $2,33 \pm 0,75$ Hz gegenüber der sIPSC-Frequenz von $0,59 \pm 0,13$ Hz (Tab. 6). Errechnet man das Verhältnis der Frequenz unter Muskarin zur Frequenz der Kontrolle, so ergibt sich ein Wert von $3,81 \pm 0,4$, welcher signifikant ist ($p = 0,002$).

Die induzierte Frequenzsteigerung konnte auch durch die gleichzeitige Blockierung der nAChRs mittels Mecamylamin, nicht aufgehoben werden ($2,13 \pm 0,54$ Hz). Auch hier ergibt die Berechnung des Verhältnisses zwischen der Frequenz von Muskarin und Mecamylamin zur Frequenz der Kontrolle einen signifikanten Unterschied ($p = 0,002$). Die Applikation von Mecamylamin alleine führte zu einem leichten, aber dennoch signifikanten Anstieg der Frequenz der IPSCs ($p = 0,04$) (Tab. 4).

3.4 Der M3 mAChR ist der Vermittler des frequenzsteigernden Effekts

Der M3-mAChR-Antagonist 4-DAMP (4-Diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide) wurde in einer Konzentration von 50nM verwendet, da mAChR-Antagonisten mit steigender Konzentration immer unspezifischer werden. Grundlage des Versuchs bildete dabei das Standardprotokoll (Abb.9): Zuerst wurden die sIPSCs für 7-10 min aufgezeichnet. Anschließend erfolgte eine Applikation von Muskarin (10µM) für 30s, ein Auswaschen des Effekts für 10 min und dann eine Applikation

von 4-DAMP (50nM) für 18-28 min, wobei nach den ersten 10-16 min wiederum für 30s Muskarin appliziert wurde.

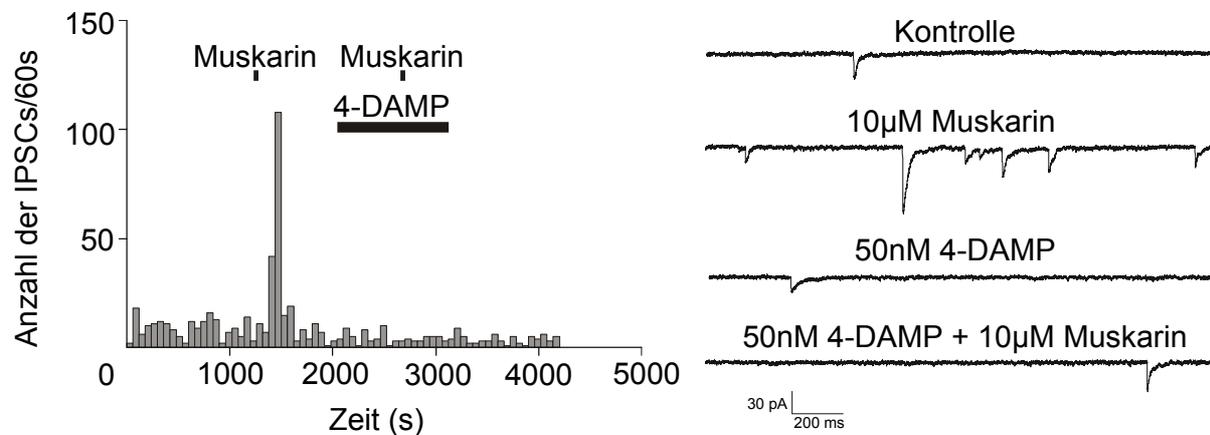


Abb. 9: Darstellung einer Messung mit 4-DAMP (50nM) und Muskarin (10µM). Links: In den ersten 1400s des Experiments traten die sIPSCs mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,13 Hz auf. Die Applikation von 30s Muskarin ($t = 1400s$) führte zu einem Anstieg der IPSC-Frequenz auf durchschnittlich 1,25 Hz. Nach dem Auswaschen dieses Effekts blieb eine Frequenz von 0,05 Hz unter der Applikation von 4-DAMP erhalten, die sich auch durch die Co-Applikation von Muskarin ($t = 2640s$) nicht änderte. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden sechs IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	4-DAMP	Musk. + 4-DAMP
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,13	1,25	0,05	0,06
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,73	1,76	0,61	0,51
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,07	0,21	0,04	0,09
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,99	2,26	0,99	0,88
Frequenz Zelle 5 [Hz]	0,13	0,69	0,16	0,13
Frequenz Zelle 6 [Hz]	0,06	0,26	0,08	0,15
Mittlere Frequenz [Hz]	$0,35 \pm 0,16$	$1,07 \pm 0,34$	$0,32 \pm 0,16$	$0,30 \pm 0,13$

Tab. 8: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und 4-DAMP.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz 4-DAMP / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + 4-DAMP / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	9,62	0,38	0,46
Zelle 2	2,41	0,84	0,7
Zelle 3	3	0,57	1,29
Zelle 4	2,28	1	0,89
Zelle 5	5,31	1,23	1
Zelle 6	4,3	1,33	2,5
MW ± SE	4,49 ± 1,13	0,89 ± 0,15	1,14 ± 0,29
Signifikanzlevel p	0,0274	0,5059	0,6551

Tab. 4: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Der frequenzsteigernde Effekt von Muskarin konnte komplett durch die vorherige Applikation von 50nM 4-DAMP blockiert werden. Die mittlere Frequenz der sIPSCs von $0,35 \pm 0,16$ Hz konnte durch die Applikation von Muskarin auf $1,07 \pm 0,34$ Hz erhöht werden. Die Applikation von 50nM 4-DAMP alleine hatte keinen Effekt auf die IPSC-Frequenz ($0,32 \pm 0,16$ Hz), konnte aber den Effekt von gleichzeitig appliziertem Muskarin in allen sechs untersuchten Zellen vollständig blockieren, so dass eine Erhöhung der Frequenz ausblieb ($0,30 \pm 0,13$ Hz) (Tab. 8).

Auch die Ergebnisse aus der Berechnung des Verhältnisses der Frequenz der verschiedenen Substanzen verdeutlichen dies (Tab. 9). So ist das Verhältnis der Frequenz von Muskarin zur Frequenz der Kontrolle signifikant unterschiedlich ($p = 0,0274$), aber das Verhältnis der Frequenz von 4-DAMP zur Frequenz der Kontrolle, sowie das Verhältnis der Frequenz von Muskarin unter 4-DAMP zur Frequenz der Kontrolle, nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,5059$ bzw. $p = 0,6551$).

3.5 Die Beeinflussung des intrazellulären Signalwegs, der einer Aktivierung des M3-mAChRs nachgeschaltet ist

3.5.1 Der NO-cGMP-Signalweg

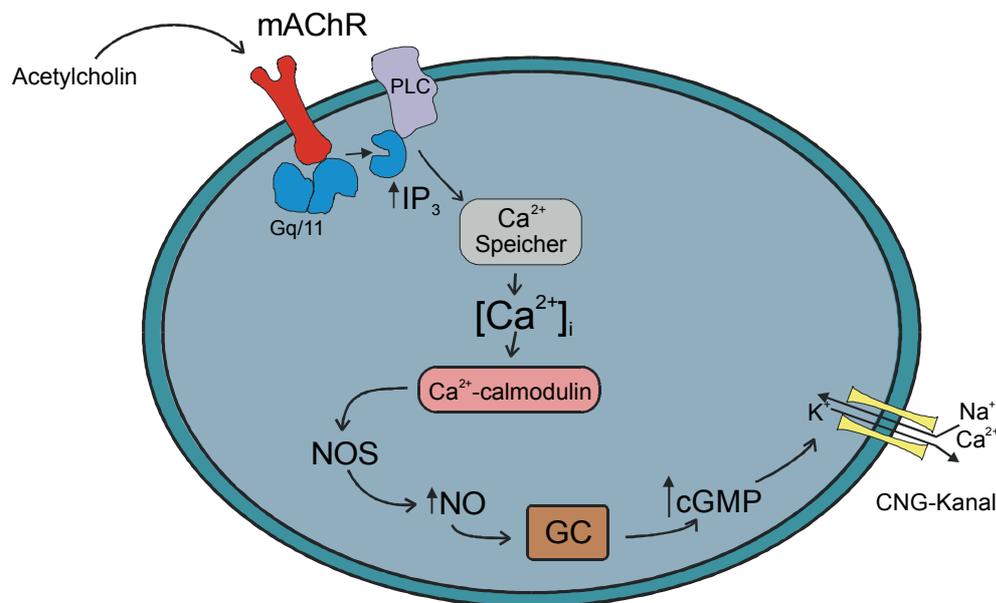


Abbildung 10: Darstellung eines Signalwegs, der der Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (mAChR) nachgeschaltet sein kann. Dabei führt die Aktivierung des Rezeptors über das G-Protein $G_{q/11}$ zu einer Phospholipase C (PLC)-vermittelten Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP_3), was wiederum den intrazellulären Kalzium-Speicher beeinflusst. Abhängig von der Konzentration des intrazellulären Kalziums wird die Aktivität von Kalzium-Calmodulin und damit die Aktivität der NO-Synthase (NOS) moduliert. Dabei kommt es zu Veränderungen der Konzentration von intrazellulärem Stickoxid (NO), das als sekundärer Botenstoff die Aktivität einer Guanylatzyklase (GC) bestimmt. Eine Aktivierung der GC führt zu einer Erhöhung der Konzentration von zyklichem Guanosinmonophosphat (cGMP) und dies kann u.a. zur Modulation der Aktivität eines CNG-Kanals führen (CNG = cyclic nucleotide gated = von zyklischen Nukleotiden gesteuert) (Mod. nach Schobesberger et al., 2000)

Im adulten Tier koppeln die G-Proteine den M3-mAChR normalerweise an einen Signalweg, der über die Phospholipase C (PLC) und Inositoltriphosphat (IP_3) den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel erhöht (Abb. 10). Dies führt zur Aktivierung einer NO-Synthase (NOS) und der löslichen Guanylatzyklase (*solublen* GC = sGC), was den

intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht. Die Konzentration von cGMP moduliert nun die Aktivität von CNG-Kanäle (*Cyclic-Nucleotid-Gated* = von zyklischen Nukleotiden gesteuert).

In den folgenden Untersuchungen wurden unterschiedliche Agonisten und Antagonisten verwendet, um auf diesen Signalweg Einfluss zu nehmen.

3.5.1.1 Blockierung der Phospholipase C (PLC)

Die Blockierung der Phospholipase C sollte, ausgehend vom dargestellten Signalweg, die muskarin-vermittelte Frequenzsteigerung blockieren. Dies wurde mittels des PLC-Antagonisten U73122 (1-[6-[[[(17)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione) in einer Konzentration von 10µM untersucht (Abb. 11). Zuerst wurde die Kontrollfrequenz der IPSCs für 7 bis 10 min in der Superfusionslösung aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Stimulation über die Applikation von 20µM Muskarin für 30 s und das Auswaschen für 10 min. Für 20-36 min wurde U73122 appliziert und nach den ersten 10-22 min kam es zu einer zusätzlichen Applikation von Muskarin für 30s.

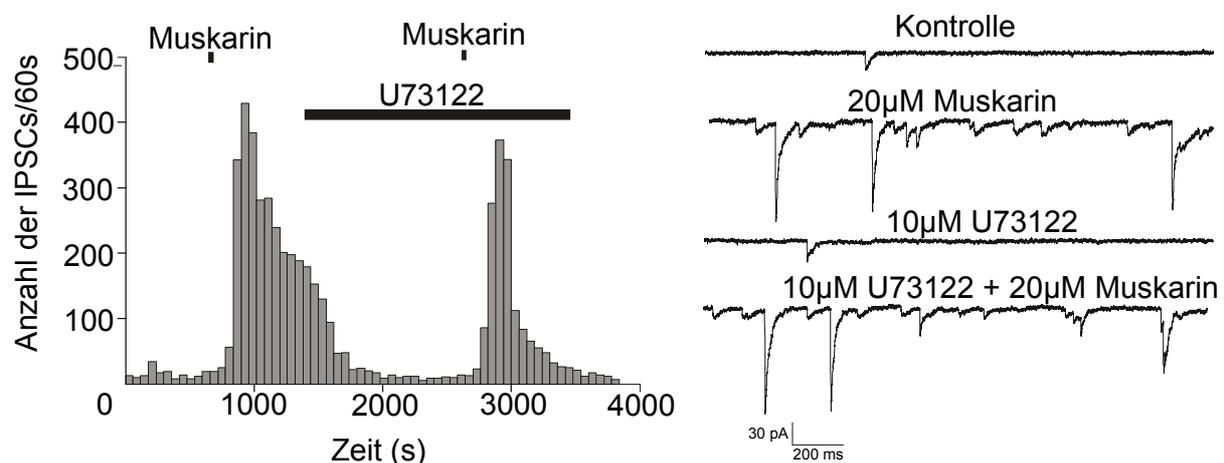


Abb. 11: Darstellung einer Messung mit 10µM U73122 und 20µM Muskarin. Links: In den ersten 800s traten die sIPSCs mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,2 Hz auf. Die Applikation von Muskarin (t = 800s) für 30 s führte zu einem starken Anstieg der IPSC-Frequenz auf 6,8 Hz. Nach Auswaschen dieses Effekts kam es durch die alleinige Applikation von U73122 (t = 1320-3360s) nicht zu einer Erhöhung der IPSC-Frequenz, sondern sie war mit 0,3Hz mit der Grundfrequenz der sIPSCs vergleichbar. Die von Muskarin hervorgerufene Frequenzsteigerung auf 6,0 Hz (t = 2750s) konnte durch die Co-Applikation von U73122 nicht blockiert werden. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden drei IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den Tabellen 10 und 11 dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	U73122	Musk. + U73122
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,20	6,78	0,3	5,98
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,18	0,78	0,31	1,76
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,79	0,93	0,89	1,58
Mittlere Frequenz [Hz]	0,39 ± 0,20	2,83 ± 1,98	0,5 ± 0,34	3,11 ± 1,44

Tab. 10: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW ± SE) der Applikation von Muskarin und U73122.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz U73122 / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + U73122 / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	33,9	1,5	29,99
Zelle 2	4,33	1,72	9,78
Zelle 3	1,18	1,13	2
MW ± SE	13,14 ± 10,42	1,45 ± 0,17	13,92 ± 8,34
Signifikanzlevel p	0,3643	0,1205	0,2614

Tab. 11: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Muskarin-vermittelte, frequenzsteigernde Effekt (um den Faktor 4,7 im Vergleich zur Kontrollfrequenz) durch die vorherige Applikation von U73122 nicht blockiert werden konnte (Tab. 10). In der Kontrolle betrug die Frequenz $0,39 \pm 0,20$ Hz und unter Muskarin $2,83 \pm 1,98$ Hz. Der hohe Standardfehler beruht hierbei auf den sehr starken Unterschieden in der Frequenzsteigerung der Zellen. Die Frequenz der IPSCs nach Applikation von $10\mu\text{M}$ U73122 betrug $0,50 \pm 0,34$ Hz und war somit vergleichbar mit der Kontrollfrequenz. Die gleichzeitige Applikation von U73122 und Muskarin führte zu einer IPSC-Frequenz von $3,11 \pm 1,44$ Hz, was mit dem Effekt von Muskarin vergleichbar war. Auch hier beruht der hohe Standardfehler wiederum auf einer aussergewöhnlich hohen Frequenzsteigerung in einer der untersuchten Zellen nach Applikation von

Muskarin. Dieses Dilemma wurde auch durch die Untersuchung des Verhältnisses der Frequenz der einzelnen Substanzen zur Frequenz der Kontrolle deutlich. Das Verhältnis der Frequenz nach Applikation von Muskarin zur Frequenz der Kontrolle war, unabhängig von U73122, mit dem Wert 13 natürlich deutlich unterschiedlich zu 1. Aufgrund der starken Größenunterschiede konnte aber in beiden Fällen kein signifikantes Ergebnis erreicht werden ($p = 0,3643$ bzw. $p = 0,2614$) (Tab. 11).

3.5.1.2 Blockierung von Ca^{2+} -Calmodulin

In dieser Untersuchung wurde der Ca^{2+} -Calmodulin-Antagonist W7 (N-(6-Aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) verwendet. Der Versuch war nach dem Standard-Protokoll aufgebaut (Abb. 12): Zuerst wurden die sIPSCs für 7-10 Minuten aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Badapplikation von $20\mu\text{M}$ Muskarin für 30 s. Dem zehnmütigen Auswaschen folgte eine Applikation von $30\mu\text{M}$ W7 für 20-22 Minuten. Nach den ersten 10-12 min wurde für 30 s $20\mu\text{M}$ Muskarin appliziert.

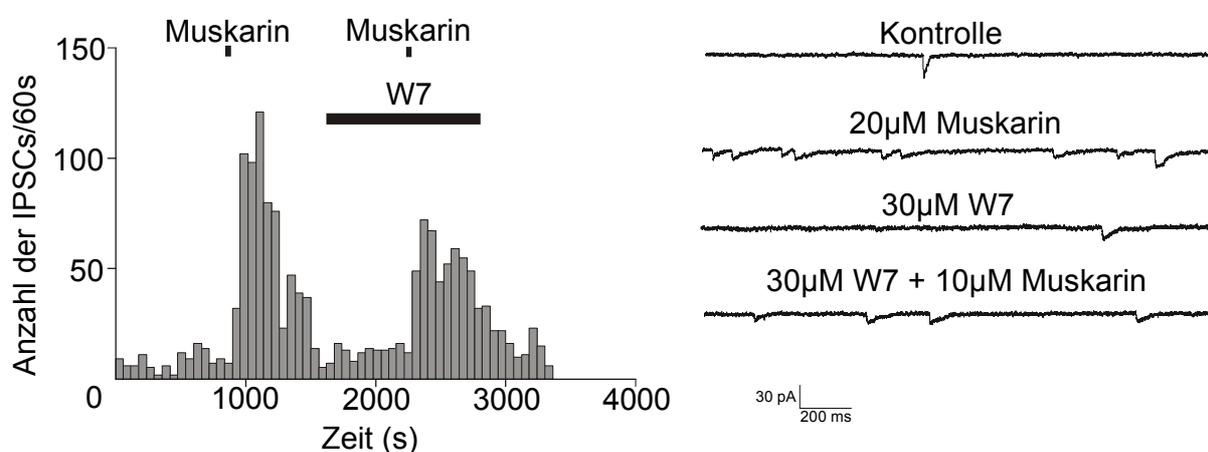


Abb. 12: Darstellung einer Messung mit $30\mu\text{M}$ W7 und $20\mu\text{M}$ Muskarin. Links: Innerhalb der ersten 960s traten die sIPSCs mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,1 Hz auf. Durch die Applikation von Muskarin für 30s kam es zu einem Anstieg der IPSC-Frequenz auf gemittelte 1,83 Hz. Wurde W7 zusammen mit Muskarin appliziert, fiel die durch Muskarin induzierten Frequenzsteigerung geringer aus. Die IPSCs traten mit einer Frequenz von 1,16 Hz auf. Dieser Wert ist zwar wesentlich höher als die Basisfrequenz der IPSCs, aber trotzdem um etwa 36% kleiner als die Frequenzsteigerung durch Muskarin. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen.

Es wurden fünf IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	W7	Musk. + W7
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,10	1,83	0,25	1,16
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,68	3,93	1,18	3,54
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,02	0,12	0,03	0,16
Frequenz Zelle 4 [Hz]	1,34	15	1,76	2,12
Frequenz Zelle 5 [Hz]	0,41	0,9	0,38	0,57
Mittlere Frequenz [Hz]	0,54 ± 0,31	5,22 ± 3,35	0,81 ± 0,40	1,75 ± 0,72

Tab. 12: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW ± SE) der Applikation von Muskarin und W7.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz W7 / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + W7 / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	18,3	2,5	11,6
Zelle 2	5,78	1,74	5,21
Zelle 3	6	1,5	8
Zelle 4	11,19	1,31	1,58
Zelle 5	2,20	0,93	1,39
MW ± SE	8,69 ± 2,80	1,60 ± 0,26	5,56 ± 1,95
Signifikanzlevel p	0,051	0,0852	0,0793

Tab. 13: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Die mittlere Frequenz der IPSCs der Kontrolle betrug $0,54 \pm 0,31$ Hz. Nach der Applikation von Muskarin kam es zu einer Steigerung der IPSC-Frequenz auf $5,22 \pm 3,35$ Hz. Der große Standardfehler beruht darauf, dass sich die Frequenzen in den einzelnen Zellen stark unterscheiden. Sie variierten nach der Applikation von Muskarin zwischen 0,12 und 15 Hz. Die alleinige Applikation von W7 führte zu einer leichten Frequenzerhöhung im Vergleich zur Kontrolle und erreichte einen Wert von $0,81 \pm 0,40$ Hz. Wurde nun zusätzlich Muskarin appliziert kam es zu einer Steigerung der Frequenz auf $1,75 \pm 0,72$ Hz (Tab. 12). Dieser Wert liegt deutlich unter der von Muskarin allein erreichten Frequenzerhöhung. Die vorherige Applikation von W7 führte demnach zu einer teilweisen Blockierung der von Muskarin hervorgerufenen Frequenzsteigerung der GABAergen IPSCs. Der Vergleich des Verhältnisses der

Frequenz der einzelnen Substanzen zur Frequenz der Kontrolle führte zu keinem signifikanten Unterschied (Tab. 13).

3.5.1.3 Blockierung der NO-Synthase

Zur Blockierung der NO-Synthase (NOS) wurde L-NAME (*N_w*-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) in einer Konzentration von 1mM verwendet. Die sIPSCs wurden für 6-8 min aufgezeichnet und anschliessend erfolgte die Stimulation mit 10 μ M Muskarin für 30 s, sowie das Auswaschen des Effekts für 10 min. Die Zellen wurden für 78 min in 1mM L-NAME inkubiert und nach den ersten 64 min wurde für 30 s 10 μ M Muskarin badappliziert (Abb. 13).

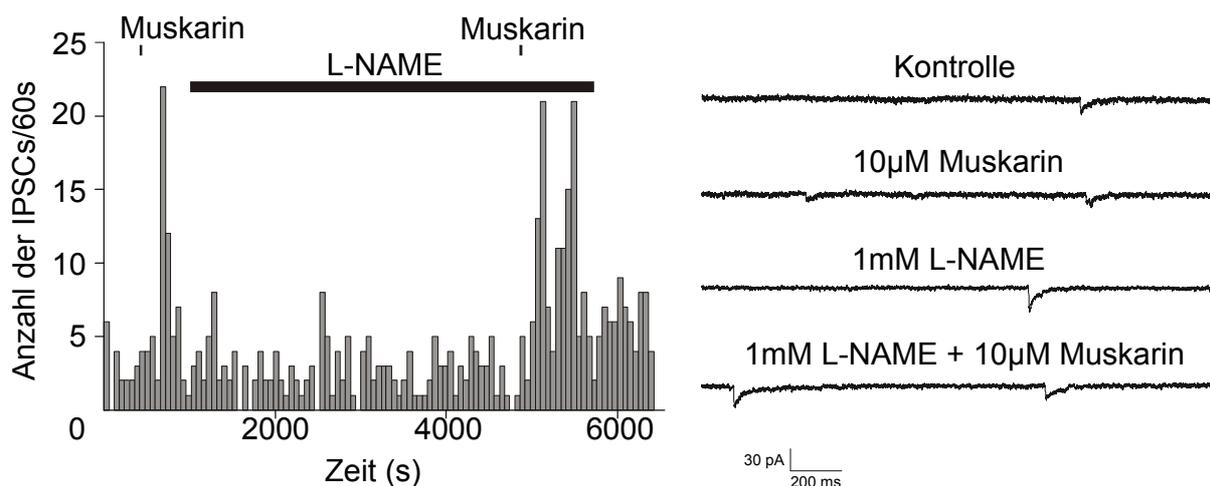


Abb. 13: Darstellung einer Messung mit L-NAME (1mM) und Muskarin (10 μ M). Links: Innerhalb der ersten 660s traten die sIPSCs mit einer mittleren Frequenz von 0,06 Hz auf. Die Applikation von Muskarin zum Zeitpunkt 660s führte zu einer mittleren IPSC-Frequenz von 0,28 Hz. Nach Auswaschen dieses Effekts und der Applikation von L-NAME traten die IPSCs mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,05 Hz auf. Dies ist vergleichbar mit der Frequenz der spontanen IPSCs. Wird Muskarin mit L-NAME co-appliziert, wie das zum Zeitpunkt 5400 s der Fall ist, so kommt es zu einer mittleren Frequenz von 0,3 Hz. L-NAME hat also keinen Einfluß auf die von Muskarin hervorgerufene Frequenzsteigerung der IPSCs. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden zwei IC-Neurone untersucht. Die Werte sind in den folgenden beiden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	L-NAME	Musk. + L-NAME
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,06	0,28	0,05	0,30
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,21	0,44	0,18	0,35
Mittlere Frequenz [Hz]	0,14 ± 0,08	0,36 ± 0,08	0,12 ± 0,07	0,33 ± 0,03

Tab. 14: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW ± SE) der Applikation von Muskarin und L-NAME.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz L-NAME / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + L-NAME / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	4,76	0,83	5
Zelle 2	2,10	0,86	1,67
MW ± SE	3,43 ± 1,88	0,85 ± 0,02	3,34 ± 1,67
Signifikanzlevel p	0,3188	0,0614	0,3943

Tab. 15: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen.

In der Kontrolle traten die sIPSCs mit einer Frequenz von $0,14 \pm 0,08$ Hz auf. Nach der Applikation von Muskarin erfolgte eine Erhöhung der Frequenz auf $0,36 \pm 0,08$ Hz. Die alleinige Applikation von L-NAME führte zu einer Frequenz von $0,12 \pm 0,07$ Hz, was keinen großen Unterschied zur Frequenz der sIPSCs darstellt. Die gleichzeitige Applikation von L-NAME und Muskarin ergab eine Frequenz von $0,33 \pm 0,03$ Hz. Dies war mit der Frequenz von Muskarin alleine vergleichbar. Die vorherige Applikation von 1mM L-NAME führte also nicht zu einer Blockierung der muskarin-vermittelten Steigerung der IPSC-Frequenz (Tab. 14). Dies bestätigt auch der Vergleich des Verhältnisses der Frequenz der einzelnen Substanzen mit der Frequenz der Kontrolle (Tab. 15). Bei nur 2 untersuchten Zellen konnte keine Aussage über statistisch relevante Ergebnisse gemacht werden, so dass in diesem Fall auf eine Diskussion des Signifikanzlevels verzichtet wurde und auch die dargestellten Mittelwerte nur als Angaben unter Vorbehalt angesehen werden sollten.

3.5.1.4 Blockierung der Guanylatzyklase

Zur Blockierung der Guanylatzyklase (GC) wurde ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Wäre der vorgeschlagene Signalweg an der Weitergabe des Signals beteiligt, so hätte eine Blockierung der GC zu einer Blockierung der von Muskarin hervorgerufenen Frequenzsteigerung führen müssen. Zuerst wurden die sIPSCs für 12-18 Minuten aufgezeichnet. Dann folgte die Applikation von 10 μ M Muskarin für 30s und das Auswaschen des Effekts für 10 min. Die Applikation von ODQ erfolgte für 44 bzw. 22 min und Muskarin wurde für 30 s nach den ersten 34 bzw. 14 min appliziert (Abb. 14).

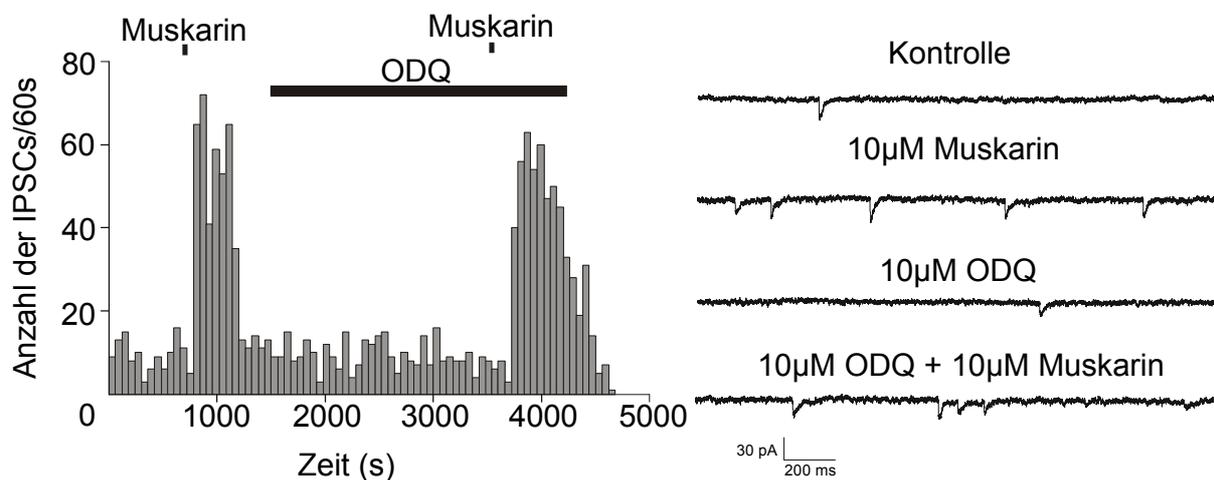


Abb. 14: Darstellung einer Messung mit 10 μ M ODQ und 20 μ M Muskarin. Links: Die sIPSCs traten innerhalb der ersten 720s mit einer mittleren Frequenz von 0,12 Hz auf. Die Applikation von Muskarin ($t = 720-750$ s) führte zu einer durchschnittlichen Frequenz von 1,12 Hz. Dies entspricht einer Erhöhung um den Faktor 9,3. Die alleinige Applikation von ODQ ($t = 1440-4500$) führte zu einer mittleren IPSC-Frequenz von 0,18 Hz und die Co-Applikation von Muskarin und ODQ zum Zeitpunkt 3780 s zu einer mittleren Frequenz von 1,0 Hz. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden zwei IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den Tabellen 16 und 17 dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	ODQ	Musk. + ODQ
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,11	1,13	0,18	0,99
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,79	0,90	0,58	2,33
Mittlere Frequenz [Hz]	0,45 ± 0,34	1,02 ± 0,12	0,38 ± 0,2	1,66 ± 0,67

Tab. 16: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW ± SE) der Applikation von Muskarin und ODQ.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz ODQ / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + ODQ / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	10,27	1,64	9
Zelle 2	1,14	0,73	2,95
MW ± SE	5,71 ± 4,57	1,19 ± 0,46	5,98 ± 3,03
Signifikanzlevel p	0,4904	0,7542	0,3478

Tab. 17: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen.

Die sIPSCs hatten eine mittlere Frequenz von $0,45 \pm 0,34$ Hz. Diese Grundfrequenz wurde im Mittel durch die Applikation von $10\mu\text{M}$ Muskarin für 30s auf $1,02 \pm 0,12$ Hz gesteigert (Tab. 16). Nach dem Auswaschen des Effekts konnte bei der alleinigen Applikation von ODQ ($10\mu\text{M}$) eine durchschnittliche Frequenz von $0,38 \pm 0,2$ Hz festgestellt werden. Diese Frequenz war ähnlich der Frequenz der sIPSCs der Kontrolle. Bei der Co-Applikation von Muskarin und ODQ konnte der GC-Blocker den von Muskarin induzierten frequenzsteigernden Effekt nicht blockieren, was in einer durchschnittlichen Frequenz von $1,66 \pm 0,67$ Hz zu erkennen ist. Diese Aussage wird auch durch den Vergleich des Verhältnisses der Frequenz der einzelnen Substanzen mit der Frequenz der Kontrolle verdeutlicht (Tab. 17). Auch in diesem Fall konnten nur 2 Zellen untersucht werden, so dass auch hier keine Aussagen über statistisch relevante Ergebnisse gemacht werden konnten und auf das Diskutieren des Signifikanzlevels verzichtet wurde. Auch die dargestellten Mittelwerte sollten nur als Angaben unter Vorbehalt gesehen werden.

3.5.1.5 Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels

Nach dem in Abb. 10 beschriebenen Signalweg müsste eine Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels zu einer Erhöhung der Frequenz der IPSCs führen und somit einen ähnlichen Effekt wie Muskarin hervorrufen. Der NO-Donor L-Arginin ((S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid) wurde in einer Konzentration von 100 μ M gegeben um dies zu überprüfen. Zuerst erfolgte die Aufnahme des sIPSCs für 9-12 min, um deren Grundfrequenz zu ermitteln. Anschließend wurde für 30 s Muskarin appliziert und für 10 min ausgewaschen. L-Arginin (100 μ M) wurde für 10 min appliziert (Abb. 15).

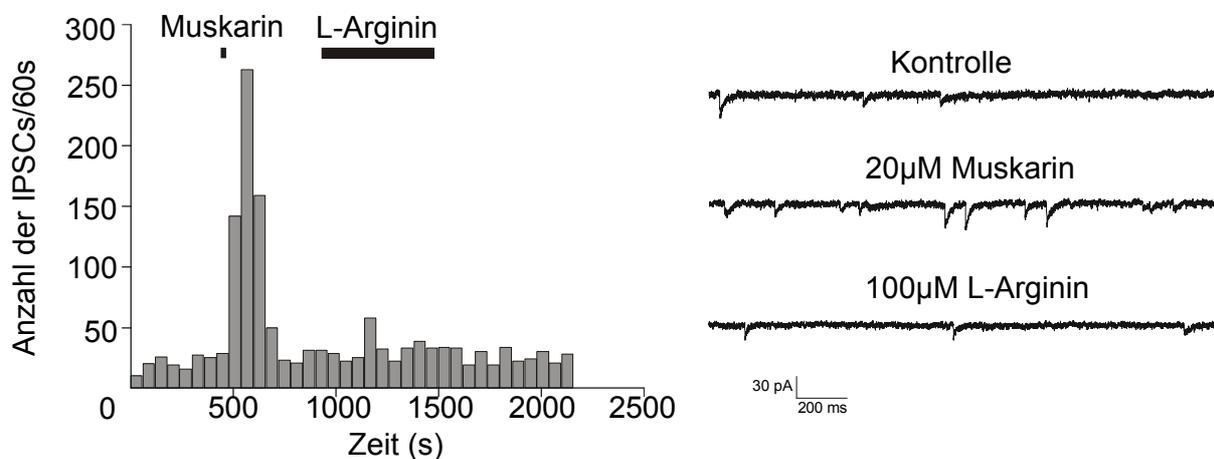


Abbildung 15: Darstellung einer Messung mit 20 μ M Muskarin und 100 μ M L-Arginin. Links: Innerhalb der ersten 540s traten die sIPSCs mit einer mittleren Frequenz von 0,75 Hz auf. Die Applikation von Muskarin zum Zeitpunkt 540s führte zu einer Erhöhung der IPSC-Frequenz auf 3,52 Hz. Nach Auswaschen des Effekts und der Applikation von L-Arginin ($t = 1320-1440$) kam es zu keinem mit Muskarin vergleichbaren Effekt. Die mittlere Frequenz der IPSCs betrug 0,6 Hz und war damit mit der Grundfrequenz der sIPSCs vergleichbar. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden drei IC-Neurone untersucht. Alle Werte sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	L-Arginin
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,74	3,52	0,60
Frequenz Zelle 2 [Hz]	2,67	9,17	3,36
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,23	0,88	0,24
Mittlere Frequenz [Hz]	1,21 ± 0,74	4,52 ± 2,45	1,4 ± 0,99

Tab. 18: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW ± SE) der Applikation von Muskarin und L-Arginin.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz L-Arginin / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	4,76	0,81
Zelle 2	3,44	1,26
Zelle 3	3,83	1,04
MW ± SE	4,01 ± 0,39	1,04 ± 0,13
Signifikanzlevel p	0,0165	0,8043

Tab. 19: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Die spontanen IPSCs traten mit einer Frequenz von $1,21 \pm 0,74$ Hz auf. Nach Applikation von Muskarin ($20\mu\text{M}$) erhöhte sich diese Frequenz auf $4,52 \pm 2,45$ Hz. Der große Standardfehler beruht hierbei darauf, dass die Frequenzen der einzelnen untersuchten Zellen nach Muskarin-Applikation in einem Bereich von $0,88 - 9,17$ Hz variierten. Die Applikation von L-Arginin führte nicht zu einer vergleichbaren Erhöhung der Frequenz, da im Mittel die IPSCs unter L-Arginin mit einer Frequenz von $1,4 \pm 0,99$ Hz auftraten (Tab. 18).

Verglich man das Verhältnis der Frequenz von Muskarin zur Frequenz in der Kontrolle, so konnte man einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0165$) feststellen (Tab. 19). Diese Signifikanz war beim Verhältnis der Frequenz von L-Arginin zur Frequenz der Kontrolle nicht gegeben ($p = 0,8043$).

3.5.1.6 Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels

Falls die Wirkung von Muskarin auf dem eingangs beschriebenen Signalweg beruhen würde, müsste eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels, vergleichbar mit der Erhöhung des NO-Spiegels, auch zu einer Erhöhung der IPSC-Frequenz führen und damit wie Muskarin wirken. Das membranpermeable cGMP-Analogon 8-br-cGMP (8-Bromoguanosine-3',5'-cyclomonophosphate sodium salt) wurde in Konzentrationen von 100 μ M und 1 μ M zugegeben. Am Anfang wurde 5-14 min lang die sIPSC-Frequenz aufgezeichnet. Da verschiedene Untersuchungen vermuten liessen, dass die vorherige Applikation von Muskarin den cGMP-Effekt unterbinden könnte, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Es wurde zuerst 10 μ M Muskarin für 30 s appliziert und anschließend für 10 Minuten 8-br-cGMP. Alternativ wurde zuerst 8-br-cGMP und danach Muskarin appliziert (Abb. 16). Es zeigte sich kein Unterschied.

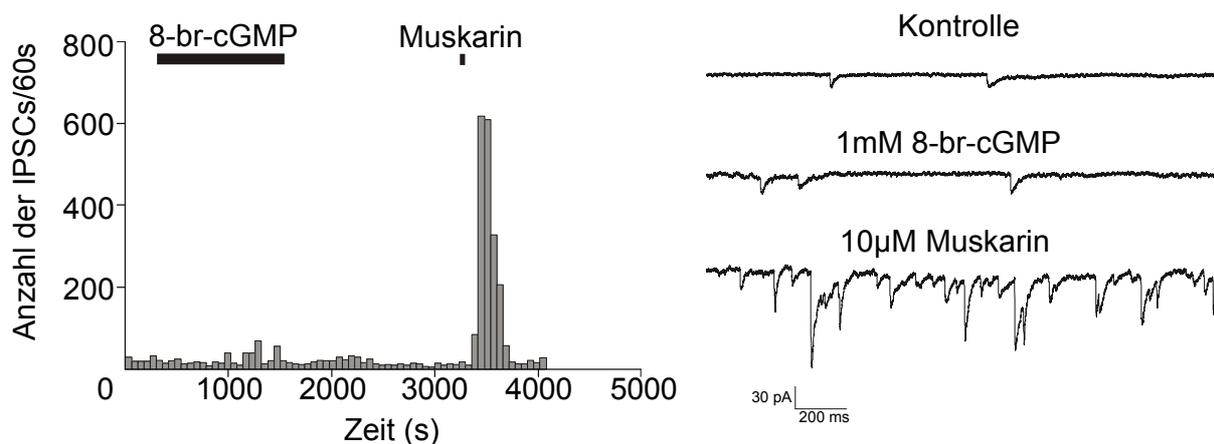


Abb. 16: Darstellung einer Messung mit 10 μ M Muskarin und 1mM 8-br-cGMP. Links: Die Grundfrequenz der sIPSCs betrug innerhalb der ersten 300s 0,31 Hz. Anschließend wurde 8-br-cGMP für 21min appliziert. Diese relativ hohe Konzentration von 8-br-cGMP, angewandt für eine beträchtliche Zeitspanne führte nicht zu einem mit der Applikation von Muskarin zu vergleichenden Effekt: Die mittlere Frequenz betrug daher auch nur 0,68 Hz. Die Applikation von Muskarin (t = 3420) führte zu einer Frequenzsteigerung um den Faktor 33 und damit zu einer mittleren Frequenz von 10,22 Hz. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Drei IC-Neurone wurden mit einer Konzentration von 100 μ M 8-br-cGMP untersucht. Alle Werte sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	8-br-cGMP
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,32	2,86	0,63
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,063	0,17	0,03
Frequenz Zelle 3 [Hz]	1,40	9,66	3,04
Mittlere Frequenz [Hz]	0,59 \pm 0,41	4,23 \pm 2,82	1,23 \pm 0,92

Tab. 20: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und 8-br-cGMP.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz 8-br-cGMP / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	8,38	1,97
Zelle 2	2,70	0,48
Zelle 3	6,9	2,17
MW \pm SE	5,99 \pm 1,70	1,54 \pm 0,53
Signifikanzlevel p	0,0991	0,4177

Tab. 21: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW \pm SE) der Zellen.

Mit einer Konzentration von 1mM 8-br-cGMP wurden vier IC-Neurone untersucht. Diese Werte sind in den folgenden Tabellen 22 und 23 dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	8-br-cGMP
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,79	1,38	0,4
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,09	0,18	0,07
Frequenz Zelle 3 [Hz]	1,13	3,69	0,79
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,31	10,22	0,66
Mittlere Frequenz [Hz]	0,58 \pm 0,23	3,87 \pm 2,24	0,48 \pm 0,16

Tab. 22: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und 8-br-cGMP.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz 8-br-cGMP / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	1,75	0,51
Zelle 2	2	0,78
Zelle 3	3,27	0,70
Zelle 4	32,97	2,13
MW ± SE	10,00 ± 7,66	1,03 ± 0,37
Signifikanzlevel p	0,3251	0,9407

Tab. 23: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

An der mittleren Frequenz lässt sich deutlich erkennen, dass sich durch eine Applikation von 8-br-cGMP nicht der gleiche frequenzsteigernde Effekt induzieren ließ, wie mit der Applikation von Muskarin. Die mittleren Frequenzen der sIPSCs lagen bei den Kontrollmessungen bei $0,59 \pm 0,41$ Hz bzw. $0,58 \pm 0,23$ Hz und sind somit vergleichbar. Auch die Applikation von Muskarin führte zu einer ähnlichen Frequenzsteigerung von $4,23 \pm 2,82$ Hz bzw. $3,87 \pm 2,24$ Hz. Die zehninütige Applikation von $100\mu\text{M}$ 8-br-cGMP führte im Mittel zu einer leichten Steigerung der IPSC-Frequenz gegenüber der Kontrolle auf $1,23 \pm 0,92$ Hz. Da die zyklischen Nukleotide innerhalb der Zelle sehr schnell von den entsprechenden Enzymen inaktiviert werden, wird in den meisten Untersuchungen eine Konzentration von 1mM 8-br-cGMP verwendet. In der vorliegenden Untersuchung führte die Applikation von 1mM 8-br-cGMP nicht zu der, nach der Applikation von $100\mu\text{M}$ 8-br-cGMP, vermuteten Frequenzsteigerung. Die Frequenz von $0,48 \pm 0,16$ Hz entspricht in etwa der Grundfrequenz der IPSCs unter Kontrollbedingungen.

Berechnet man den Signifikanzlevel bezüglich des Verhältnisses der Frequenz der einzelnen Substanzen zur Frequenz der Kontrolle erhält man keine Werte $\leq 0,05$. Allerdings traten bei der Applikation von Muskarin erneut in ihrer Größe sehr unterschiedliche Werte auf.

3.5.2 Der Signalweg über die PKC

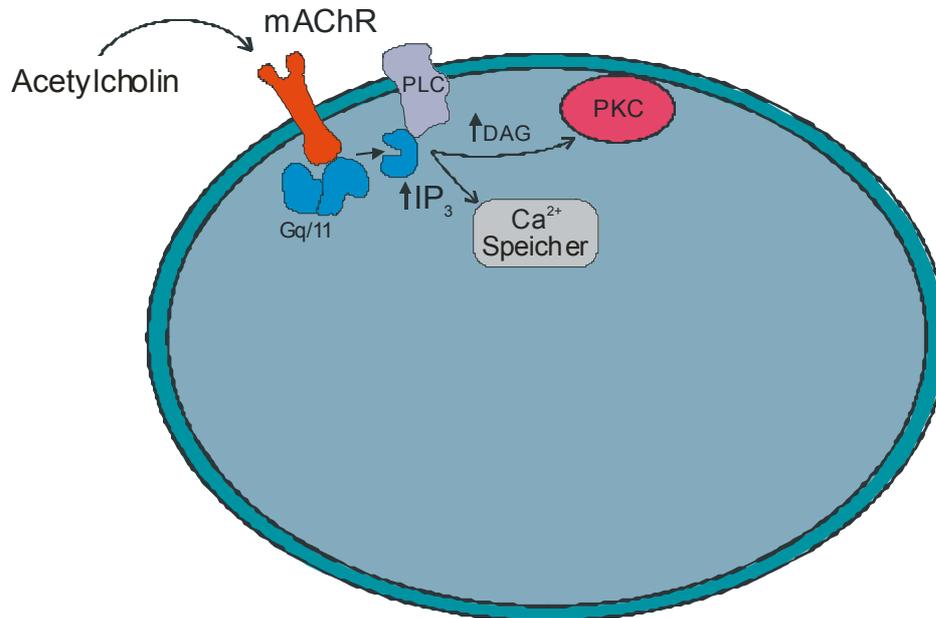


Abbildung 17: Alternative Signalkaskade für die Wirkung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors. Die Aktivierung des mAChR führt zu einer erhöhten Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und damit zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). (Mod. nach Schobesberger et al., 2000)

Die Proteinkinase C (PKC) ist, beeinflusst von Diacylglycerol (DAG), ein weiterer wichtiger sekundärer Botenstoff in der intrazellulären Signalübermittlung, die der Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors nachgeschaltet sein könnte. Ihre Involvierung in den hier untersuchten Signalmechanismus wurde wie folgt getestet. Zur Blockierung der PKC wurde der Antagonist H7 in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. Wäre die PKC als sekundärer Botenstoff an der Übermittlung des Signals beteiligt, sollte die Applikation eines Antagonisten zu einer Blockierung des durch Muskarin hervorgerufenen Effekts führen. Zunächst wurden im Vorlauf für 12-14 min sIPSCs gemessen. Anschließend erfolgte die Applikation von Muskarin (20 μ M) für 30s und das Auswaschen des Muskarins für 10 min. Für 42-44min erfolgte die Applikation von H7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine) in einer Konzentration von 10 μ M und nach den ersten 30-32 min dieser Applikation wurden wieder 30s Muskarin (20 μ M) appliziert (Abb. 18).

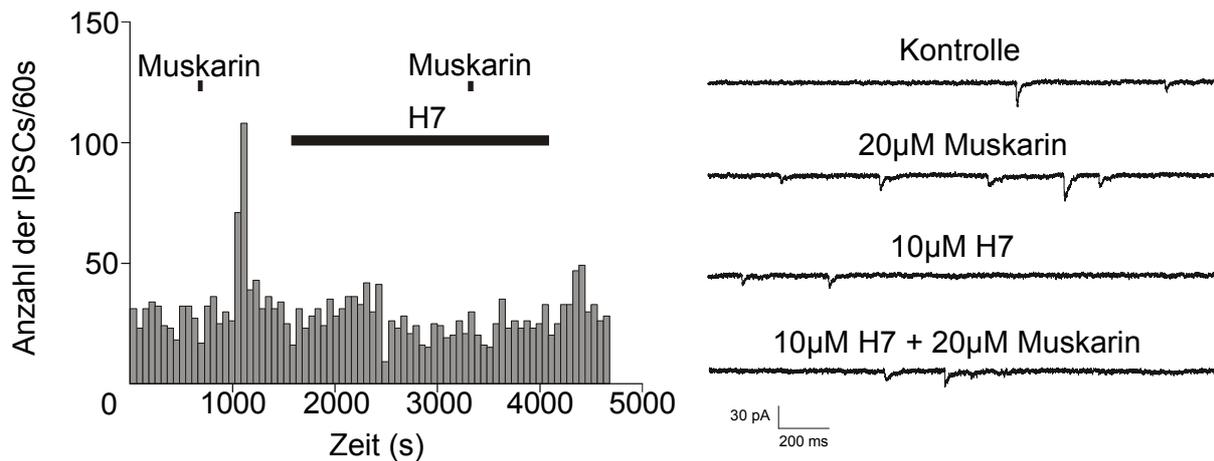


Abb. 18: Darstellung einer Messung mit 20µM Muskarin und 10µM H7. Links: Die mittlere Frequenz der sIPSCs betrug innerhalb der ersten 720s 0,43 Hz. Nach der Applikation von Muskarin ($t = 720s$) kam es zu einer Erhöhung der Frequenz auf 1,49 Hz. Die mittlere IPSC-Frequenz während der anschließenden Applikation von H7 betrug 0,33 Hz, was keine große Veränderung zur Grundfrequenz der sIPSCs darstellte. Die Co-Applikation von Muskarin und H7 zum Zeitpunkt 3660s führt zu einer vollständigen Unterdrückung des Muskarin-Effekts in dieser Zelle, was sich auch an der mittleren Frequenz der IPSCs von 0,41 Hz erkennen ließ. Somit scheint PKC eine entscheidende Rolle bei der Weitergabe des Signals nach Aktivierung des mAChRs zu spielen. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden vier IC-Neurone untersucht. Die gemessenen Werte sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	H7	Musk. + H7
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,43	1,49	0,33	0,41
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,35	0,60	0,10	0,20
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,05	0,73	0,03	0,02
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,17	1,39	0,22	1,1
Mittlere Frequenz [Hz]	$0,25 \pm 0,09$	$1,05 \pm 0,23$	$0,17 \pm 0,07$	$0,43 \pm 0,24$

Tab. 24: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und H7.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz H7 / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + H7 / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	3,47	0,77	0,95
Zelle 2	1,71	0,29	0,57
Zelle 3	14,6	0,6	0,4
Zelle 4	8,18	1,29	6,47
MW ± SE	6,99 ± 2,88	0,74 ± 0,21	2,09 ± 0,24
Signifikanzlevel p	0,1291	0,2985	0,5074

Tab. 25: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

In der Kontrolle traten die sIPSCs mit einer Frequenz von $0,25 \pm 0,09$ Hz auf. Durch die Applikation von Muskarin ($20\mu\text{M}$) konnte diese Frequenz auf $1,05 \pm 0,23$ Hz erhöht werden. Die Frequenz der IPSCs bei alleiniger Applikation von H7 ($10\mu\text{M}$) war mit $0,17 \pm 0,07$ Hz vergleichbar mit der Kontrollfrequenz. Die Co-Applikation von H7 und Muskarin blockierte zum Teil die von Muskarin hervorgerufene Frequenzsteigerung (Tab. 24). Berechnet man den Signifikanzlevel bezüglich des Verhältnisses der Frequenz der einzelnen Substanzen zur Frequenz der Kontrolle erhält man keine Werte $\leq 0,05$.

Es muss erwähnt werden, dass H7, welches in seiner pharmakologischen Wirkung relativ diffus ist, in viele Signalkaskaden eingreifen kann, und z.B. die Genexpression, die der MAP-Kinase nachgeschaltet ist, blockiert (Kumahara et al., 1999). Weiterhin hemmt H7 die Phosphorylierung der RNA-Polymerase (Yankulov et al., 1995). Es ist ausserdem festgestellt worden, dass H7 den A(1) Adenosinrezeptor moduliert (Hirsh und Silinsky, 2002) und die Arachidonsäure-Freisetzung unterdrücken kann (Wang et al., 2001) Am kritischsten für die vorliegende Untersuchung ist jedoch, dass H7 bevorzugt auch andere Kinasen blockiert, wie z.B. die Serin/Threonin-Kinase (Aihara et al., 2000) und die Proteinkinase A (Goosens et al., 2000).

Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment ein zweiter, selektiverer PKC-Blocker, nämlich Chelerythrine (1,2-Dimethoxy-Nmethyl(1,3) benzodioxolo(5,6-c)phenanthridinium chloride) in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ appliziert. Es wurde zuerst wieder die Grundfrequenz der sIPSCs für 12-14 Minuten aufgezeichnet, die

Steigerung der IPSCs durch Applikation von 30 s Muskarin ($20\mu\text{M}$) ausgelöst, dieser Effekt ausgewaschen und dann wurde Chelerythrine für 18-26 min appliziert. Nach den ersten 10 min dieser Applikation wurde erneut Muskarin ($20\mu\text{M}$) für 30 s appliziert (Abb. 19).

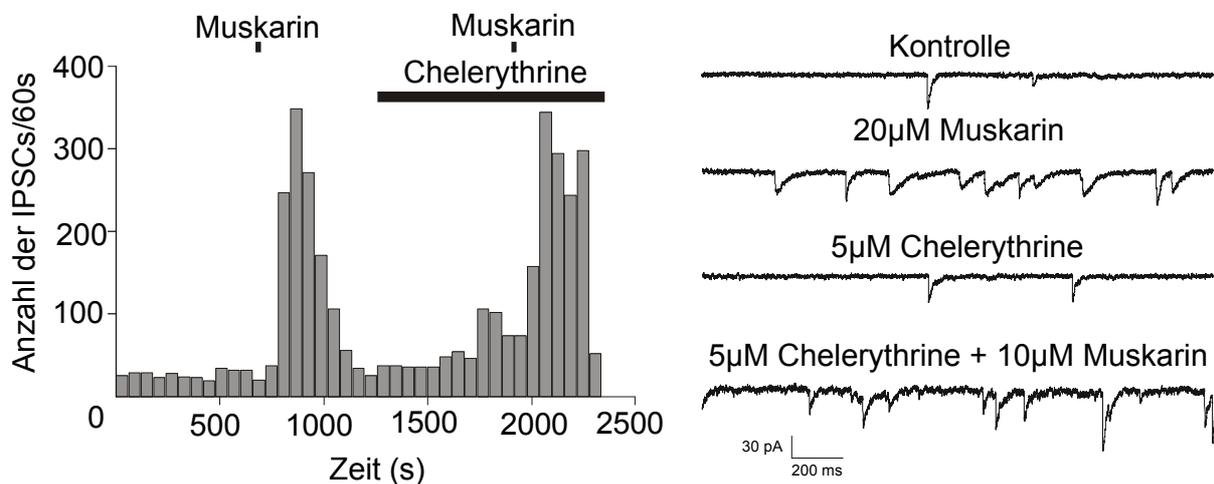


Abbildung 19: Darstellung einer Messung mit $20\mu\text{M}$ Muskarin und $5\mu\text{M}$ Chelerythrine. Links: In der dargestellten Zelle betrug die mittlere Frequenz der sIPSCs innerhalb der ersten 720s $0,44\text{ Hz}$. Nach Applikation von Muskarin ($t = 720\text{s}$) kam es zu einer Frequenzerhöhung auf $4,97\text{ Hz}$. Diese Frequenzerhöhung ließ sich durch die gleichzeitige Applikation von Muskarin und Chelerythrine ($t = 2040$) nicht blockieren, was in einer Frequenz von $5,32\text{ Hz}$ resultiert. Die alleinige Applikation von Chelerythrine besitzt keinen frequenzsteigernden Effekt und führt zu einer IPSC-Frequenz von $0,6\text{ Hz}$. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden vier IC-Neurone untersucht. Die Werte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	Chelerythrine	Musk. + Chel.
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,44	4,97	0,60	5,32
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,4	5,53	0,85	4,91
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,16	0,23	0,11	0,65
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,25	0,46	0,14	1,77
Mittlere Frequenz [Hz]	$0,31 \pm 0,07$	$2,80 \pm 1,42$	$0,43 \pm 0,18$	$3,16 \pm 1,16$

Tab. 26: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und Chelerythrine.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz Chelerythrine / Frequenz Kontrolle	Frequenz Musk. + Chel. / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	11,30	1,36	12,09
Zelle 2	13,83	2,13	12,28
Zelle 3	1,44	0,69	4,06
Zelle 4	1,84	0,56	7,08
MW ± SE	7,10 ± 3,20	1,19 ± 0,36	8,87 ± 2,00
Signifikanzlevel p	0,1523	0,6432	0,0294

Tab. 27: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Es war nicht möglich die Frequenzerhöhung der sIPSCs, die durch die Anwendung von Muskarin ausgelöst wurde, durch die Zugabe von Chelerythrine zu unterdrücken. In der Kontrolle lag die Frequenz der sIPSCs bei $0,31 \pm 0,07$ Hz. Nach der Applikation von Muskarin erhöhte sich die Frequenz auf $2,80 \pm 1,42$ Hz. Die alleinige Applikation von Chelerythrine führte zu einer der Kontrolle vergleichbaren Frequenz von $0,43 \pm 0,18$ Hz und bei der Co-Applikation von Chelerythrine und Muskarin lag die Frequenz bei $3,16 \pm 1,16$ Hz (Tab. 26).

Dass Chelerythrine die von Muskarin hervorgerufene Frequenzerhöhung nicht blockieren konnte (Tab. 27) macht deutlich deutlich, dass die im vorhergehenden Versuch beschriebene Wirkung von H7 nicht darauf beruht, dass der PKC-Signalweg blockiert wurde. Das Ergebnis dieses Versuchs lässt vermuten, dass H7 mit einem anderen Signalweg, bzw. einer anderen Proteinkinase interagiert.

3.5.3 Der AC-cAMP-PKA-Signalweg

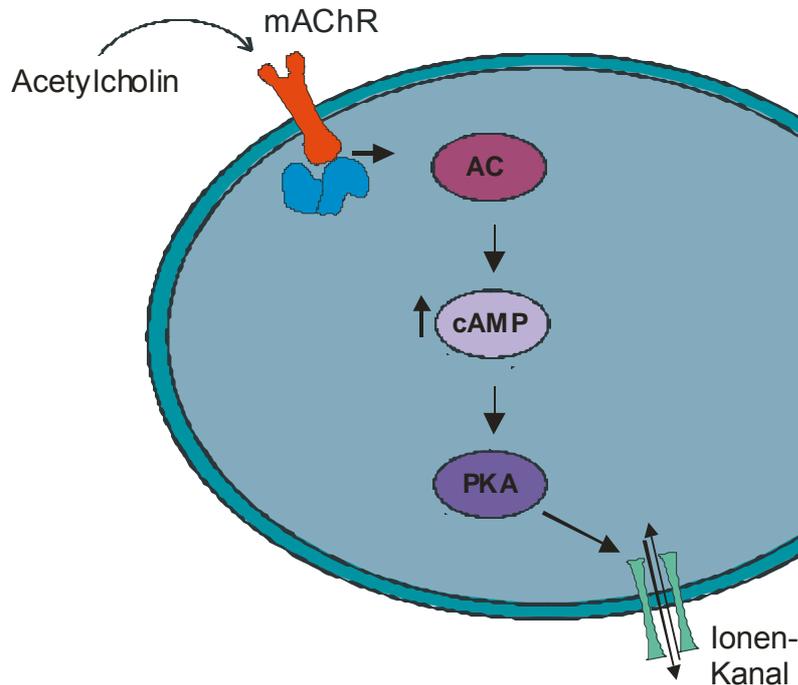


Abbildung 20: Ein weiterer möglicher Signalweg, der der Aktivierung eines muskarinischen Acetylcholinrezeptors (mAChRs) nachgeschaltet sein könnte und der eine Adenylatzyklase (AC), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und die Proteinkinase A (PKA) als sekundäre Botenstoffe nutzt. Dieser Signalweg wird für gewöhnlich nicht durch das G-Protein $G_{q/11}$ vermittelt und höchst selten mit der Aktivierung des M3-mAChR verknüpft. (Mod. nach Nathanson, 2000)

In diesem Signalweg kann es durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels über die Aktivierung der PKA zu einer Phosphorylierung von Ionenkanälen kommen.

3.5.3.1 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels

Zur Beteiligung dieses Signalwegs an der Muskarin-induzierten Signalkaskade wurde eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, über die Applikation des membranpermeablen cAMP-Analogons 8-br-cAMP (8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate), untersucht. Dabei wurde 8-br-cAMP in Konzentrationen von 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M und 400 μ M zugegeben. Eine Konzentration von 300 μ M 8-br-cAMP führte zu Ergebnissen, die der Muskarin-Wirkung am ähnlichsten waren. Deshalb wurde diese Konzentration bei den weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Das Versuchsprotokoll folgte dem Standardverfahren: Zuerst wurden die sIPSCs für 10-18 Minuten aufgezeichnet, anschließend wurde für 30 s Muskarin (20 μ M) appliziert und der Effekt 10 min lang ausgewaschen. Anschließend erfolgte eine Applikation von 8-br-cAMP (300 μ M) für 2 min (Abb. 21).

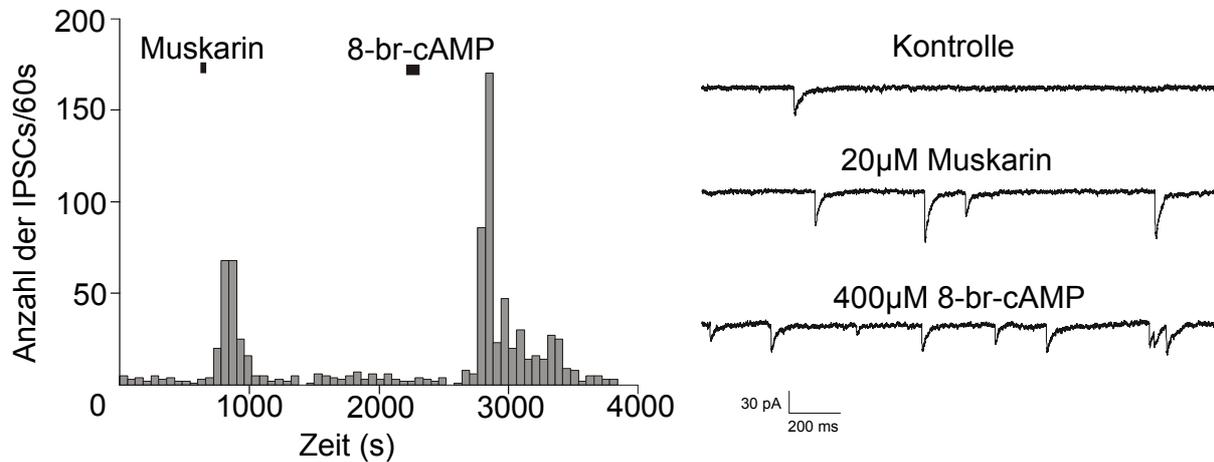


Abb. 21: Darstellung einer Messung mit 20 μ M Muskarin und 400 μ M 8-br-cAMP. Links: Innerhalb der ersten 720s traten die spontanen IPSCs mit einer mittleren Frequenz von 0,04 Hz auf. Die Applikation von Muskarin ($t = 780$ s) führte zu einem Anstieg der Frequenz auf 1,12 Hz. Zum Zeitpunkt 2760s wurde 8-br-cAMP appliziert. Dies führte zu einem mittleren Frequenzanstieg auf 2,12 Hz. Damit ist der von 8-br-cAMP hervorgerufene Effekt fast doppelt so groß wie der von Muskarin. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurden fünf IC-Neurone untersucht. Die Werte sind in den folgenden Tabellen 28 und 29 dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	8-br-cAMP
Frequenz Zelle 1 [Hz]	0,8	2,49	2,50
Frequenz Zelle 2 [Hz]	0,12	0,47	0,33
Frequenz Zelle 3 [Hz]	0,15	0,43	0,43
Frequenz Zelle 4 [Hz]	0,24	0,74	0,58
Frequenz Zelle 5 [Hz]	0,26	4,41	1,13
Mittlere Frequenz [Hz]	0,31 \pm 0,12	1,71 \pm 0,76	0,99 \pm 0,40

Tab. 28: Die einzelnen Messwerte und Mittelwerte (MW \pm SE) der Applikation von Muskarin und 8-br-cAMP.

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz 8-br-cAMP / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	3,11	3,13
Zelle 2	3,92	2,75
Zelle 3	2,87	2,87
Zelle 4	3,08	2,42
Zelle 5	16,96	4,35
MW ± SE	5,99 ± 2,75	3,10 ± 0,33
Signifikanzlevel p	0,1438	0,0032

Tab. 29: Das Verhältnis der Frequenz der verschiedenen Substanzen und Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle innerhalb der einzelnen Zellen und als Mittelwert (MW ± SE) der Zellen.

Die mittlere Frequenz der sIPSCs während des Vorlaufs betrug $0,31 \pm 0,12$ Hz. Unter der Wirkung von Muskarin ($20\mu\text{M}$) kam es zu einer Frequenzerhöhung auf $1,71 \pm 0,76$ Hz. Diese Werte sind vergleichbar mit der Frequenz von $0,99 \pm 0,40$ Hz, die man durch die Applikation von 8-br-cAMP erhält. Der relativ große Standardfehler nach der Applikation von Muskarin kam durch die großen Frequenzunterschiede zwischen den einzelnen Zellen von 0,43 Hz bis 4,41 Hz zustande, die so in der Kontrollfrequenz nicht existierten. Diese Werte variierten nur zwischen 0,15 und 0,8 Hz (Tab 28).

Das Verhältnis der Frequenz unter 8-br-cAMP und der Frequenz der Kontrolle erreicht einen Signifikanzwert von $p = 0,0032$ und ist somit signifikant (Tab 29).

3.5.3.1 Die Blockierung der Adenylatcyclase

Zur Blockierung der Adenylatzyklase, die den intrazellulären cAMP-Spiegel beeinflusst, wurde SQ22,536 (9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine) in einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ verwendet. Zuerst wurden für 12 min die sIPSCs aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Applikation von Muskarin ($20\mu\text{M}$) für 30s und das Auswaschen des Effekts für 10 min. SQ 22,536 ($100\mu\text{M}$) wurde für 42 min appliziert und nach den ersten 30 min erfolgte die Applikation von Muskarin ($20\mu\text{M}$) für 30s (Abb. 22).

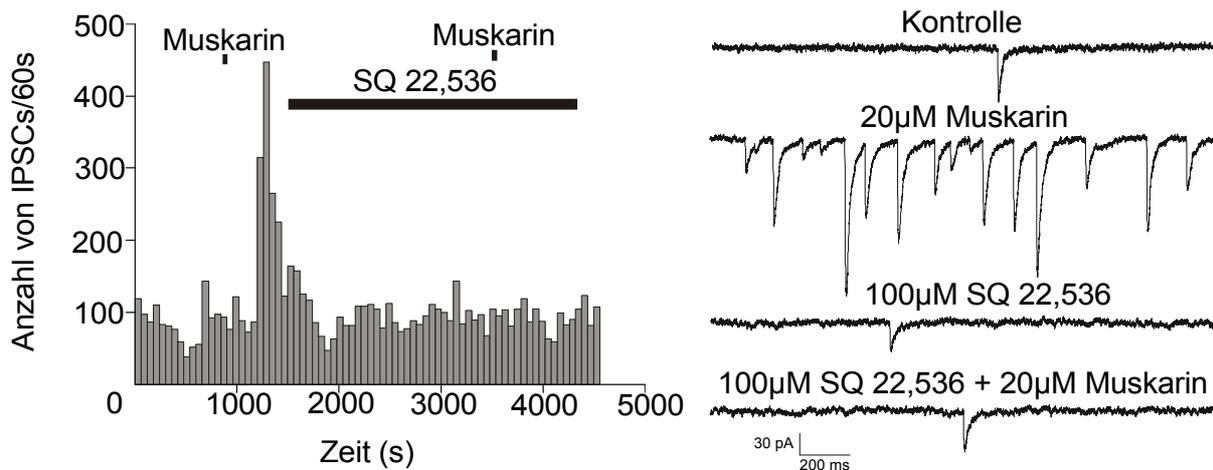


Abbildung 22: Darstellung einer Messung mit 20µM Muskarin und 100µM SQ 22,536. Links: Die mittlere Frequenz der sIPSCs betrug innerhalb der ersten 1200s 1,01 Hz. Nach Applikation von Muskarin ($t = 1260$) kam es zu einem starken Frequenzanstieg auf 5,93 Hz. Durch die Co-Applikation von SQ 22,536 und Muskarin ($t=3900$) konnte dieser, von Muskarin hervorgerufene, Effekt vollständig blockiert werden. Dies resultiert in einer mittleren Frequenz von 1,6 Hz. Rechts: Darstellung einzelner IPSCs während der Kontrolle und der Applikation der einzelnen Substanzen

Es wurde eine Nervenzelle untersucht. Die Werte sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

	Kontrolle	Muskarin	SQ 22,536	Muskarin + SQ 22,536
Frequenz Zelle 1 [Hz]	1,01	5,93	1,71	1,6

Tab. 30: Die einzelnen Messwerte der Applikation von Muskarin und SQ 22,536

	Frequenz Muskarin / Frequenz Kontrolle	Frequenz SQ 22,536 / Frequenz Kontrolle	Frequenz Mus. + SQ 22,536 / Frequenz Kontrolle
Zelle 1	3,11	1,69	1,58

Tab. 31: Das Verhältnis der Frequenz der Substanzkombinationen im Verhältnis zur Frequenz der Kontrolle.

Die sIPSCs traten mit einer durchschnittlichen Frequenz von 1,01 Hz auf. Durch die Applikation von Muskarin kam es zu einer Frequenzsteigerung auf 5,93 Hz. Die alleinige Applikation von SQ 22,536 führte zu einer Frequenz von 1,71 Hz, die der Kontrollfrequenz der sIPSCs entspricht. Die Co-Applikation von Muskarin und SQ

22,536 führte zu einer Blockierung der durch Muskarin bewirkten Frequenzsteigerung und resultierte in einer Frequenz von 1,6 Hz (Tab. 30).

Somit führt die Blockierung der AC zu einer Verhinderung der von Muskarin induzierten Frequenzsteigerung der GABAergen IPSCs (Tab. 31). Dies legt nahe, dass die Adenylatzyklase ein Teil der intrazellulären Signalkaskade ist.

3.6 Zusammenfassung:

Unter Wirkung von Muskarin kam es bei 41,2% der untersuchten Neurone des Colliculus inferior zu einer Erhöhung der Frequenz der spontanen IPSCs. Die sIPSCs wurden durch Bicucullin blockiert, somit handelt es sich um GABAerge IPSCs. Die Wirkung von Muskarin nahm zu, wenn die Tiere älter als 9 Tage waren. Es wurde gezeigt, dass nAChRen keine Rolle spielen bei der Erhöhung der sIPSC-Frequenz, während eine selektive Blockade der M3-mAChRen durch 4-DAMP die Muskarinwirkung blockierte. In der Regel sind die M3-Rezeptoren über folgende Signalkaskade aktiv: Phospholipase C, Kalzium-Calmodulin, NO-Synthase, Guanylatzyklase, die NO-Konzentration und cGMP. Alle Glieder dieser Kaskade wurden untersucht, sie hatten aber keinen Einfluss auf die Muskarinwirkung. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer vergleichbaren Frequenzsteigerung der sIPSCs wie sie unter der Wirkung von Muskarin gemessen wurde. Weiterhin ließ sich die Erhöhung der sIPSC-Frequenz durch Muskarin vollständig aufheben, wenn die intrazelluläre Adenylatzyklase blockiert wurde. Dies legt nahe, dass die Muskarinwirkung über eine Regulation von cAMP erfolgt.

4. Diskussion

4.1 Die Modulation der GABAergen Transmission über muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die modulatorischen Einflüsse von mAChRen auf die GABAerge synaptische Übertragung im IC zu untersuchen. Dabei konnten insgesamt 136 Zellen erfolgreich abgeleitet werden, von denen 41,2% unter der Wirkung von Muskarin eine durchschnittliche Frequenzerhöhung der GABAergen IPSCs um den Faktor 5,6 zeigten. Der prozentuale Anteil der Zellen, die auf Muskarin-Applikation mit einer solchen Frequenzerhöhung reagieren nahm ab dem Alter P10 zu.

Um zu klären, wieso 41,2% der untersuchten Zellen auf Muskarin reagierten und warum dieser Prozentsatz ab P10 steigt, müsste man Näheres über die Verteilung der mAChRen im IC wissen. Bis heute ist der Ursprung der cholinergen Innervation des IC unbekannt (Habicht und Vater, 1996), man weiss aber, das z.B. Eingänge aus dem dorsalen Nukleus des lateralen Lemniscus schon vor dem Beginn des Hörens im IC ausgebildet sind (Gabriele et al., 2000). Auch muss man die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass die mAChRen nur auf bestimmten Zelltypen im IC zu finden sind. Im ventralen cochlearen Nukleus hat man die Aktivität cholinergischer Eingänge auf sternförmige Zellen untersucht und stellte fest, dass mAChRen nur auf dem sog. T-Typ der sternförmigen Zellen eine spannungs-unabhängige Kalium-Leitfähigkeit erhöhen (Fujino und Oertel, 2001). Eine altersabhängige Veränderung der Verteilung, der Dichte und der molekularen Zusammensetzung der mAChRen könnte eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Muskarinwirkung sein. Des weiteren könnte eine zelltypabhängige Veränderung der Verteilung, Dichte und Zusammensetzung der mAChRen eine Erklärung für die große Variationsbreite der Frequenzen in den untersuchten Zellen sein.

4.2 Der GABAerge Ursprung der gemessenen IPSCs

Die Messung spontaner inhibitorischer Ströme (sIPSCs) erfolgte unter Zugabe von Kynurenat (1mM) und Strychnin (0,5µM), um glutamaterge und glycinerge Ströme zu unterdrücken. Das Blockieren dieser sIPSCs durch Bicucullin ließ vermuten, dass es sich dabei um GABAerge synaptische Ströme handelt. Bicucullin ist ein hoch spezifischer GABA_A-Rezeptor-Antagonist (Krogsgaard-Larsen, 1988).

Der Einfluss von mAChRen auf GABAerge Ströme wurde bereits in verschiedenen Systemen nachgewiesen. Guo und Chiappinelli (2001) untersuchten den Einfluss von mAChRen auf die spontane GABA-Freisetzung im Nucleus spiriform im Mittelhirns des Hühnchens und stellten fest, dass die Inhibition von evozierten polysynaptischen GABAergen Strömen durch einen M1-Rezeptor vermittelt wird, während die Steigerung von spontanen GABAergen PSCs wahrscheinlich über einen M3-Rezeptor verläuft. Vasquez und Kollegen (2003) konnten zeigen, dass zur Schlafsteuerung die Acetylcholin-Freisetzung von muskarinischen Acetylcholin-Autorezeptoren moduliert und von GABA-Rezeptoren inhibiert wird. Die Applikation von Bicucullin führte in dieser Untersuchung zu einer fast dreifach gesteigerten Freisetzung von Acetylcholin. D'Antuono und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass niederfrequente Oszillationen im Subiculum auf mAChRen beruhen, die über GABAerge Transmission in das Netzwerk eingebunden sind. Auch die Entstehung von LTP (*long-term potentiation*) im Hippocampus der Ratte ist abhängig vom Zusammenspiel von mAChRen und GABA-Rezeptoren. Endogenes ACh potenziert die Entstehung von LTP durch Inhibition von GABAergen Interneuronen, die Pyramidenzellen innervieren. Dieser Effekt kann durch die Applikation des mAChR-Antagonisten Scopolamin unterdrückt werden (Ye et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Bicucullin die spontanen postsynaptischen Ströme vollständig blockiert. In Anwesenheit von Bicucullin konnten durch Muskarin keine IPSCs evoziert werden. Diese Ergebnisse sprechen also für eine modulatorische Beeinflussung der GABAergen Transmission durch mAChRn.

4.3 Die Beteiligung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Die Beteiligung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren wurde durch den nicht-kompetitiven nAChR-Ionenkanalblocker Mecamylamin (10 μ M) (Vizi und Lendvai, 1999) untersucht. Mecamylamin wurde in verschiedenen Studien erfolgreich als Antagonist für nAChRen, die keine α 7-Rezeptoren beinhalten, eingesetzt (Porter et al., 1999; Fujino und Oertel, 2001; Kiyosawa et al., 2001). Ab einer Konzentration von 10 μ M wird auch der α 7-Rezeptor blockiert (Sharples und Wonnacot, 2001). Wan und Kollegen untersuchten 2003 den Einfluss von nAChRen auf die Aktivität von mAChRen und stellten fest, dass die Aktivität der mAChRs durch zuvor desensitisierte nAChRen potenziert wurde. Dieser Effekt konnte aber durch die Applikation von Mecamylamin verhindert werden.

Wurde in der vorliegenden Untersuchung Mecamylamin mit Muskarin co-appliziert, so konnte es die evozierten IPSCs nicht blockieren. Dies bedeutet, dass die nAChR bei der hier untersuchten Signalweiterleitung keine Rolle spielen.

4.4 Der M3 mAChR bzw. M5 mAChR ist der Vermittler des frequenzsteigernden Effekts

Der Frage, welcher mAChR an der Modulation der GABAergen Transmission im IC der juvenilen Ratte beteiligt ist, gingen 2003 Yigit und Kollegen nach. Sie applizierten unterschiedliche Antagonisten, die bestimmte Rezeptoren bevorzugt blockieren und stellten fest, dass die Applikation des M2-Antagonisten Methoctramin und des M4-Antagonisten Himbazin keinen Einfluss auf die Frequenzerhöhung der GABAergen IPSCs durch Muskarin hat. Der M1-Antagonist Pirenzepin führte zu einer signifikanten Blockierung des Muskarin-Effekts, während Telenzepin, ein weiterer M1-Antagonist dies nicht tat. Die Wirkung von Pirenzepin könnte auch auf einer Kreuzreaktion mit dem M3-Rezeptor beruhen. Der M3-Antagonist 4-DAMP führte in einer Konzentration von 1 μ M zu einer deutlich stärkeren Reduktion der evozierten IPSCs als Pirenzepin.

In der vorliegenden Untersuchung wurde 4-DAMP in der geringen Konzentration von 50nM eingesetzt um Kreuzreaktionen mit anderen mAChRen so gering wie möglich zu halten. Diese Konzentration war ausreichend um die durch Muskarin hervorgerufene Frequenzsteigerung der IPSCs vollständig zu unterdrücken. Somit ist

es wahrscheinlich, dass M3 mAChRen die Frequenzerhöhung der sIPSCs verursachen.

Allerdings gilt folgende Einschränkung: Es ist relativ schwierig, die 5 verschiedenen mAChR-Subtypen pharmakologisch zu unterscheiden, da sie sehr große Homologien aufweisen. Strukturell ist der M5-Rezeptor der zweitgrößte mAChR nach dem M3-Rezeptor und beide haben eine sehr große dritte intrazelluläre Schleife. Unterschiede in dieser dritten Schleife bestehen zwischen den 5 verschiedenen mAChRen und zwischen mAChRen verschiedener Spezies (Eglen und Nahorski, 2000). Die großen Schwierigkeiten bei der Abgrenzung des M5-Rezeptors vom M3-Rezeptor, führen immer wieder zu Unklarheiten bezüglich ihrer physiologischen Rolle. Die exakte Verteilung des M5-Rezeptors in Geweben ist wegen der inadäquaten Selektivität von Radioliganden und der geringen Sensitivität von poliklonalen Antikörpern nicht genau bekannt (Caulfield, 1993; Reeve et al., 1997).

Bonner und Kollegen (1988) haben den M5-Rezeptor in CHO-Zellen exprimiert und konnten so als Erste zeigen, dass er mit dem Signalweg verknüpft ist, der über IP₃ und DAG die PKC aktiviert. Dieses Ergebnis wurden von verschiedenen Forschergruppen bestätigt (Jones et al., 1991; Wang und El Fakahany, 1993; Richards und van Giersbergen, 1995; Watson et al., 1999). Wang und Kollegen (1993, 1994 und 1996) konnten zeigen, dass der M5-Rezeptor in CHO-Zellen an den NO-Signalweg koppelt und Wotta und Kollegen (1998) zeigten, dass in CHO-Zellen der M5-Rezeptor mit der Aktivierung einer MAP-Kinase verknüpft sein kann. Allerdings ist nicht bewiesen, dass einer dieser Signalwege spezifisch für den M5-Rezeptor ist. Ungewöhnlich hingegen war die Identifizierung und Charakterisierung des M5-Rezeptors in einer humanen Melanom-Zelllinie (Kohn et al., 1996). Es zeigte sich, dass der Rezeptor zu einer IP₃-unabhängigen Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, einer starken Phospholipase A2-Aktivierung, und damit einhergehend, zu einer Verringerung des intrazellulären cAMP-Spiegels, führt.

Der M5-Rezeptor kann wie der M1- oder M3-Rezeptor, über ein stimulatorisches G-Protein die AC aktivieren. Allerdings konnten Jones und Kollegen (1991) zeigen, dass der M3-Rezeptor mehr als 10-mal so wirksam in der AC-Aktivierung ist wie der M5-Rezeptor. Bei der Aktivierung eines G-Proteins des Typs q/11 scheint allerdings

der M5-Rezeptor eine höhere Affinität, als der M3-Rezeptor zu haben (Eglen und Nahorski, 2000).

Bezüglich der Selektivität verschiedenster Pharmaka für unterschiedliche mAChRen stellten Eglen und Nahorsky (2000) fest, dass das pharmakologische Profil des M5-Rezeptors mit dem des M3-Rezeptors weitgehend übereinstimmt. Die Affinität (pKi) von 4-DAMP, die man mit Radioliganden-Studien untersucht hat, beträgt für den M3-Rezeptor 9,1 und für den M5-Rezeptor 9,3. Eine definitive Aussage, welcher Rezeptortyp beteiligt ist, lässt sich also über die Verwendung von 4-DAMP nicht treffen.

Tayebati und Kollegen (2004) untersuchten mittels Western-Blot Analysen die altersabhängige Verteilung der verschiedenen mAChRen im Striatum von Fisher 344 Ratten und stellten fest, dass sowohl die Konzentration des M3-Rezeptors, als auch die des M5-Rezeptors, über einen Zeitraum von 6-22 Monaten relativ konstant bleibt. Leider haben die Autoren nicht den Zeitraum P0-P16 untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Westernblot-Analysen der mAChR-Verteilung im IC von P0 - P16 alten Ratten zu machen. Schwierigkeiten mit der Aufreinigung der membrangebundenen Moleküle, der Spezifität der polyklonalen Antikörper und der Identifizierung der richtigen Molekülgröße führten allerdings zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen. Aus diesem Grund muss die Frage offen bleiben, ob der M5-Rezeptor ein Kandidat für die hier gemessenen Effekte ist. Es ist gut möglich, dass es eine altersabhängige Expression der unterschiedlichen mAChRen gibt und dass der M5-Rezeptor hauptsächlich während der Netzwerkbildung eine wichtige Rolle spielt, jedoch bei der Signalübermittlung nicht mehr. Dafür spricht, dass er bei Untersuchungen an adulten Tieren nie als primär aktiver Rezeptor identifiziert wurde.

4.5. Die Identifizierung des intrazellulären Signalwegs, der einer Aktivierung des M3 mAChR nachgeschaltet ist.

4.5.1 Der NO-cGMP-Signalweg

4.5.1.1 Die Blockade der Phospholipase C

Für die Blockade der Phospholipase C (PLC) wurden 10µM U73122 verwendet. Dieses Aminosteroid wurde 10-12 Minuten vorweg appliziert, die Muskarin-abhängige Frequenzsteigerung der IPSCs wurde dadurch aber nicht blockiert. Bosch und Kollegen fanden 1998 heraus, dass die IC_{50} von U73122 bei 3,9 µM liegt. In Patch-Clamp Experimenten konnte mit einer Konzentration von 10µM U73122 die PLC erfolgreich blockiert werden und so eine signifikante Inhibition des *delayed rectifier* K^+ -Stroms aufgehoben werden (Sun et al., 2003). Weiterhin wurde eine Verminderung der Leitfähigkeit von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (M-Kanälen) abgeschwächt (Ford et al., 2004). In Ganzzell-Ableitungen von striatalen Neuronen in Hirnschnitten neonataler Ratten konnte ein Musarin-induzierter Einstrom durch Applikation von U73122 abgeschwächt werden (Lin et al., 2004) und zwar unabhängig von der PKC oder der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass U73122 in manchen Zellen die PKC und das intrazelluläre Kalzium beeinflusst. So konnten Bosch und Kollegen 1998 zeigen, dass 10µM U73122 die Phospholipase D Aktivierung und auch die PKC-Aktivität in CHO-Zellen hemmt. In Zellen der Pankreas führt U73122 zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums aus intrazellulären Speichern indem es die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität hemmt (Willems et al., 1994; De Moel et al., 1995). In Hepatozyten allerdings hebt die Applikation von U73122 die Rezeptor-vermittelte Erhöhung des intrazellulären Kalziums auf (De Moel et al., 1995). Es ist bis heute unbekannt, warum U73122 in manchen Zellen das intrazelluläre Kalzium beeinflusst und in manchen Zellen nicht (zum Vergleich: Mogami et al., 1997). In der vorliegenden Untersuchung konnte kein Effekt von U73122 auf das intrazelluläre Kalzium festgestellt werden, da die alleinige Applikation des Aminosteroids weder zu einem sichtbaren Einstrom, noch zu einer deutlichen Veränderung der IPSC-Frequenz im Vergleich zur Kontrolle führte.

4.5.1.2 Die Blockade des Ca²⁺-Calmodulin

W7 ist ein Ca²⁺-Calmodulin-Antagonist. Ca²⁺-Calmodulin aktiviert in Abhängigkeit vom intrazellulären Ca²⁺-Spiegel die NO-Synthase. Wird dieser Schritt durch W7 unterbunden, so sollte es nicht zu einem Muskarin-vermittelten Anstieg der IPSCs kommen, falls dieser Signalweg zuträfe. In der vorliegenden Untersuchung führte die alleinige Applikation von W7 (30µM) nicht zu einer Veränderung der IPSC-Frequenz. Wurde jedoch W7 zusammen mit Muskarin eingesetzt, konnte die Muskarin-vermittelte Frequenzsteigerung der IPSCs teilweise blockiert werden. Courjaret und Lapiéd fanden 2001 heraus, dass auch die Adenylatzyklase durch den Ca²⁺-Calmodulin-Komplex reguliert wird. Somit ist die hier gemessene Beeinflussung der evozierten IPSCs mit dem NO-cGMP-Signalweg und auch mit dem AC-cAMP-Signalweg vereinbar. Auch Ikeuchi und Kollegen (1996) nutzten in kultivierten Hippocampus-Neuronen W7 um einen Zusammenhang zwischen Ca²⁺-Calmodulin und cAMP nachzuweisen. In ihren Untersuchungen konnten von ATP hervorgerufene Kalium-Ströme von W7 blockiert werden, während der selektive Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase, H89 keinen Effekt zeigte. Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration und damit zusammenhängend die Aktivität von Ca²⁺-Calmodulin spielen bei vielen unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen eine große Rolle. Die Überschneidung der cAMP-Signalkaskade mit anderen intrazellulären Signalwegen ist für verschiedene Formen der Plastizität im Nervensystem, wie z.B. der Generierung von LTP (*long-term potentiation*) und der Gedächtnisbildung sehr wichtig (Wang und Storm, 2002).

Robert Molday (1996) fand, dass Calmodulin direkt regulatorisch auf CNG-Kanäle einwirkt und deren Sensitivität für zyklische Nukleotide erhöht. Zwar untersuchte er CNG-Kanäle in olfaktorischen Neuronen und Photorezeptorzellen, schloss aber nicht aus, dass auch CNG-Kanäle in anderen Zelltypen durch Calmodulin gesteuert werden.

4.5.1.3 Die Blockierung der NO-Synthase

NO wird mit einer auf NADPH-basierenden Reaktion aus L-Arginin mittels einer NO-Synthase gebildet. Zur Unterdrückung der NO-Synthase wurde L-NAME (1mM)

verwendet. Die Vorapplikation von L-NAME für 30 min konnte die Muskarin-vermittelte Steigerung der GABAergen IPSCs nicht verhindern. Kuzmiski und MacVicar (2001) untersuchten den Einfluss von CNG-Kanälen in CA1 Pyramidenzellen im Hippocampus der Ratte. Sie konnten eine Aktivierung der sGC feststellen, die aber nicht durch L-NAME blockierbar war, was auf einen NOS-unabhängigen Signalweg schließen lässt.

Da L-NAME die IPSC-Frequenzerhöhung durch Muskarin nicht unterdrücken konnte, muss man davon ausgehen, dass der NO-cGMP-Signalweg nicht an der intrazellulären Weiterleitung beteiligt ist. Ein NOS-unabhängiger Signalweg, der über die GC verläuft, ist nicht bekannt.

4.5.1.4 Die Blockierung der Guanylatzyklase (GC)

NO bindet mit einer starken Affinität an die Häm-Gruppe der sGC (solublen Guanylatzyklase). Die so aktivierte sGC wandelt nun Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um und führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration (Denninger und Marletta, 1999). ODQ ist ein wirksamer und sehr selektiver Blocker der Guanylatzyklase und damit gut geeignet, um diesen Signalweg zu untersuchen. Es wird davon ausgegangen, dass die Blockierung der sGC durch ODQ nicht umkehrbar ist, da ODQ die für die NO-Affinität wichtige Häm-Gruppe irreversibel oxidiert (Schrammel et al., 1996). Im vorliegenden Experiment konnte ODQ (10 μ M) die von Muskarin evozierte Frequenzsteigerung der IPSCs nicht blockieren.

Wu und Dun (1996) setzten zur erfolgreichen Blockierung der sGC in präganglionären Neuronen der Ratte ODQ in der Konzentration von 1 μ M ein. Da bei den vorliegenden Experimenten ODQ in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt wurde, ist unwahrscheinlich, dass die fehlende Blockierung an einer zu geringen Dosierung lag. Saransaari und Oja untersuchten 2002 den Einfluss von cGMP auf die Taurin-Freisetzung im Hippocampus von jungen und adulten Mäusen und blockierten die sGC, um eine Anreicherung von NO in den Zellen zu erzielen. Eine höhere NO-Konzentration führte zu einer erhöhten Taurin-Freisetzung. ODQ führte durch die Blockierung der sGC zu einer gesteigerten Taurin-Freisetzung, allerdings nur im Hippocampus der drei Monate alten Mäuse und nicht im Hippocampus der

7 Tage alten Tiere. In dieser Untersuchung scheint also die Aktivität der sGC abhängig vom Alter zu sein.

4.5.1.5 Die Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels

Eine Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels müsste, unter der Annahme, dass die Signalkaskade über NO verläuft, zu einer Erhöhung der Frequenz der IPSCs führen und somit wie Muskarin wirken. Zur Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels wurde der NO-Donor L-Arginin in einer Konzentration von 100µM appliziert. Die Aminosäure L-Arginin ist der natürliche Ausgangsstoff aus dessen Spaltung mittels der NO-Synthase NO freigesetzt wird (Hibbs et al., 1988; Marletta, 1988). Obwohl L-Arginin für 10 Minuten appliziert wurde, führte dies nicht zu einer signifikanten Frequenzsteigerung der IPSCs.

Bains und Ferguson (1997) untersuchten die Beteiligung von NO bei der Modulation von GABAergen IPSCs im Hypothalamus der Ratte. Sie konnten diese IPSCs mittels Bicucullin blockieren und deren Frequenz durch die Applikation von L-Arginin steigern. Auch bei Untersuchung von Li und Kollegen (2002) führte die Applikation von L-Arginin zu einer Steigerung der Frequenz GABAerger IPSCs in Neuronen des paraventriculären Nucleus. Allerdings stellten Shen und Mitarbeiter 1997 fest, dass L-arginin die GABAerge synaptische Transmission unabhängig von der NO-Wirkung potenzieren kann. Sie untersuchten dopaminerge Neurone von Ratten an akut isolierten Schnitten und stellten fest, dass die Unterdrückung der NOS den frequenzsteigernden Effekt von L-Arginin auf GABAerge IPSCs nicht hemmte. Dieses Ergebnis interpretierten sie dahingehend, dass L-Arginin wohl einen GABA-Transporter regelt.

Allerdings konnte eine ähnliche Reaktion von L-Arginin bei den hier vorliegenden Untersuchungen nicht festgestellt werden, denn unabhängig vom Signalweg hätte die Applikation von L-Arginin beide Male zu einer Erhöhung der GABAergen Transmission führen müssen. Diese Beispiele verdeutlichen nur ein weiteres Mal, dass auch ein auf den ersten Blick eindeutig positives Ergebnis, nämlich die Steigerung der Frequenz GABAerger IPSCs durch L-Arginin, nicht unbedingt die Beteiligung eines bestimmten Signalweges, nämlich den über eine NO-Synthase und cGMP, bedeuten muss.

4.5.1.6 Die Beteiligung von cGMP

Die Beteiligung von cGMP an der muskarinischen Signalweiterleitung wurde mit Hilfe des membranpermeablen Analogons 8-br-cGMP untersucht. Dabei führte weder die zehnminütige Applikation von 100µM 8-br-cGMP, noch von 1mM 8-br-cGMP zu einer der Muskarinwirkung vergleichbaren Frequenzsteigerung der IPSCs.

Wei und Kollegen untersuchten 2002 mit Hilfe von Patch-Clamp-Experimenten den Effekt von 8-br-cGMP auf glutamaterge Synapsen im visuellen Kortex von 2-4 Wochen alten Ratten und konnten schon mit einer dreiminütigen Applikation von 100µM 8-br-cGMP deutliche Effekte erzielen. Sie stellten fest, dass cGMP über die Proteinkinase G an der Präsynapse die synaptische Übertragung erniedrigt, an der Postsynapse jedoch erhöht. Dass cGMP in dieser Untersuchung schon in einer so geringen Konzentration einen so differenzierten Effekt bewirkt, steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Wie später noch ausführlicher diskutiert wird, ist anzunehmen, dass ein Wechsel innerhalb der intrazellulären Signalwege dazu führt, dass von einer rein netzwerk-aufbauenden Aktivität zu einer signalübermittelnden Aktivität umgeschaltet wird. Dies findet kurz nach dem Beginn des Hörens statt, wenn das Netzwerk schon ausgebildet ist, bei Ratten etwa ab P12. Die in der oben genannten Untersuchung verwendeten Ratten waren zwischen 14 und 28 Tage alt. Es wurden Synapsen im visuellen Kortex der Ratte untersucht und Ratten beginnen etwa mit 14 Tagen zu Sehen, so dass (falls vorhanden) auch dort der Wechsel der Signalwege schon stattgefunden haben müsste.

Auch Munhoz und Kollegen (2005) untersuchten den Effekt von cGMP auf die glutamaterge Signalweiterleitung. Sie stellten fest, dass der NO-cGMP-Signalweg modulatorisch auf die Na-K-ATPase einwirkt.

4.5.2 Der Signalweg über die PKC

Zur Blockierung der Proteinkinase C (PKC) wurde H7 (10µM), bzw. Chelerythrine (5µM) verwendet.

Die Präapplikation von H7 blockierte die von Muskarin hervorgerufene Erhöhung der IPSC-Frequenz vollständig. Die Konzentration des Inhibitors wurde nach dem von

Alroy und Kollegen 1999 veröffentlichtem Artikel festgelegt. Diese Autoren konnten nach Badapplikation von H7 bei intrazellulären Ableitungen von Pyramidenzellen in Hippocampusschnitten der Ratte die Wirkung von Carbachol (ein Acetylcholin-Analogon) erfolgreich unterdrücken. Allerdings wurde in anderen Experimenten festgestellt, dass H7 auch ein starker Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (Goosens et al., 2000), der Serin-Threonin-Kinase (Aihara et al., 2000) und der Serin-Phosphorylierung (Choudhury, 2004) ist. Darüber hinaus scheint H7 an der motorischen Endplatte der Maus den A(1) Adenosinrezeptor zu modulieren und dadurch die Acetylcholin-Freisetzung, die über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels erfolgt, zu verhindern (Hirsh und Silinsky, 2002). Des Weiteren legen Untersuchungen von Wang und Kollegen (2001) nahe, dass H7 die Freisetzung von Arachidonsäure blockiert. Der Arachidonsäure-Metabolismus kann über unterschiedliche Wege auch mit der IP₃-Signalkette und dadurch mit der Aktivierung des mAChRs verknüpft sein.

Chelerythrine ist ein selektiver PKC Inhibitor mit einer IC₅₀ von 0,66 µM (Herbert et al., 1990). Es wurde bei den Versuchen von Ye und Kollegen (1999) der Pipettenlösung zugegeben und erfolgreich bei der Untersuchung von GABAergen Strömen in Neuronen neonataler Ratten angewendet. Bei einer Konzentration von 10µM stellten LeCorvoisier und Kollegen (2001) eine Interaktion mit dem Inositolphosphat-Metabolismus fest. Noch höher konzentrierte Dosen von 100-170µM führen auch zu inhibitorischen Effekten bei anderen Kinasen, wie der PKA, der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase und der Tyrosin-Proteinkinase (Herbert et al., 1990). Leider beeinflusst Chelerythrine in relativ geringen Dosen zusätzlich zur PKC auch andere Signalmoleküle. Bei einer Konzentration von 4µM (Walterova et al., 1981) ist es ein Inhibitor der Alanin-Aminotransferase und bei einer Konzentration von 30-50µM ein Inhibitor der Na⁺-K⁺-ATPase (Cohen et al., 1978). Des Weiteren fand Lombardini (1995) heraus, dass Chelerythrine die Phosphorylierung verschiedenster Proteine in der mitochondrialen Fraktion der Retina stimuliert und Shi und Wang (1999) konnten eine Wirkung von Chelerythrine in einer Konzentration von 0,1-10µM auf ACh-induzierte Ströme in PC12 Zellen feststellen. Alle diese Chelerythrine-Wirkungen laufen nicht über die PKC und das gleiche gilt für die Inhibition von ACh-aktivierten K⁺-Kanälen bei einer Konzentration von 10µM (Cho et al., 2001). Zwar wurde in der vorliegenden Untersuchung Chelerythrine nur in einer Konzentration von 5µM eingesetzt. Dies macht manche der

Effekte, die eine höhere Konzentration benötigen, weniger wahrscheinlich. Allerdings scheinen die Ergebnisse, die mit H7 und Chelerythrine erreicht wurden, keine feste Aussage über die Involvierung bestimmter Elemente des untersuchten Signalwegs zuzulassen.

4.5.3 Der AC-cAMP-PKA-Signalweg

4.5.3.1 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels

Für die Untersuchung der Rolle von cAMP wurde das membranpermeable Analogon 8-br-cAMP verwendet. Auch hier sollte die Applikation des zyklischen Nukleotids zu einer Steigerung der GABAergen IPSCs führen, ähnlich der Erhöhung die durch Muskarin ausgelöst wurde. Im Versuch wurden 300µM 8-br-cAMP 2 Minuten lang appliziert. Diese Applikation führte zu einer, mit dem Muskarin-Effekt vergleichbaren, Steigerung der IPSC-Frequenz. Die Steigerung der IPSC-Frequenz war abhängig von der Dosis des 8-br-cAMP, und lässt vermuten, dass der Signalweg nach Aktivierung des mAChRs eine Beteiligung von cAMP einschließt.

Dieses Ergebnis ist an sich nicht ungewöhnlich, denn eine Verknüpfung von mAChRen mit dem AC-cAMP-PKA-Signalweg ist allgemein bekannt (Wess, 1996). Allerdings wird die Signalkette in der Regel durch M2/M4-Rezeptoren ausgelöst. Diese aktivieren G-Proteine des $G_{i/o}$ -Typs und anschließend kommt es zu einer Inhibition der AC (Offermanns et al., 1994; Peralta et al., 1988; Parker et al., 1991). Inzwischen sind jedoch zahlreiche Untersuchungen veröffentlicht worden, die eine mannigfaltige Verknüpfung von mAChRen und dem AC-cAMP-PKA-Signalweg aufzeigen (Nathanson, 2000). So können G-Proteine des G_i - und G_q -Typs an G-Proteine des G_s -Typs koppeln und so zu einer Aktivierung der AC führen (Migeon und Nathanson, 1994). mAChRen, die an G_q binden, können den intrazellulären Kalziumspiegel erhöhen und dadurch eine Calmodulin-abhängige AC aktivieren (Choi et al., 1992). Des Weiteren hat man im Bulbus olfaktorius festgestellt, dass auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins fähig ist, die AC zu aktivieren (Olianas et al., 1998). Die unterschiedlichen Isoformen der AC können ausserdem durch unterschiedliche Kinasen, z.B. die PKA, die PKC und die Calmodulin-abhängige Proteinkinase, phosphoryliert werden (Hurley, 1999).

4.5.3.2 Die Blockierung der Adenylatzyklase

Zur Absicherung, dass die Rezeptoraktivierung zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt, wurde der AC-Blocker SQ 22,536 eingesetzt. Nur wenn ein AC-Blocker die Frequenzerhöhung der IPSCs durch Muskarin verhindert, ist sicher, dass der mAChR wirklich die IPSC-Frequenzsteigerung durch cAMP verursacht und es wird ausgeschlossen, dass eine unspezifische Aktivierung von cAMP den IPSC-Frequenzanstieg hervorruft.

In der vorliegenden Untersuchung konnte durch SQ 22,536 in einer Konzentration von 100µM die Muskarin-induzierte Frequenzsteigerung vollständig blockiert werden. Bei Kalzium-aktivierten Kaliumströmen in Hippocampuschnitten der Ratte (Pedarzani et al., 1988), bei Signalwegen von Neuron-Glia-Interaktionen (Britz et al., 2004), bei der Stimulation der Insulin-Freisetzung (Chevassus et al., 2002) und bei der Beteiligung des cAMP-Signalwegs an LTP in hippocampalen Synapsen (Otmakhova et al., 2000) erwies sich, wie in den vorliegenden Versuchen, eine Konzentration von 100µM SQ 22,536 als wirksam. Lenglet und Kollegen (2002) untersuchten Konzentrationen von 100-500µM SQ 22,536 und fanden eine dosisabhängige Wirkung auf den AC-abhängigen Kalzium-Einstrom durch Kalzium-Kanäle des T-Typs. In einer Veröffentlichung von Shindou und Mitarbeitern (2002) diente eine Konzentration von 300µM SQ 22,536 zur Untersuchung der synaptischen GABAergen Transmission in Schnitten des Globus pallidus der Ratte. Vargas und Lucero (1999) verwendeten sogar 500µM SQ 22,536 um den einwärts-gerichteten Strom in kultivierten olfaktorischen Neuronen der Ratte zu modulieren. Keine der genannten Untersuchungen ergab Hinweise darauf, dass SQ 22,536 einen anderen Effekt als die Blockierung der AC haben könnte. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Blockierung der durch Muskarin verursachten Frequenzsteigerung auf Blockierung der AC durch SQ 22,536 basiert.

4.6 Die Verknüpfung des M3 bzw. M5 mit der Adenylatcyclase

Als Bindeglied zwischen dem M3 (M5) mAChR und der AC kommen zwei Signalwege in Betracht:

4.6.1 Der M3 (M5) ist über ein ungewöhnliches G-Protein mit der AC verknüpft

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit mehreren G-Proteinen Verbindungen eingehen können (Wenzel-Seifert und Seifert, 2000; Hill und Baker, 2003). Intensiv untersucht wurde dies von Daaka und Kollegen (1997), die feststellten, dass durch die Aktivierung des β 2-adrenergen Rezeptors über das $G_{s\alpha}$ -Protein eine AC stimuliert wird, welche über cAMP die PKA aktiviert. Die PKA ihrerseits phosphoryliert nun den β 2-adrenergen Rezeptor dergestalt, dass eine anhaltende Aktivierung des Rezeptors über ein G-Protein des Typs G_i zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs führt. Auch Lefkowitz und Kollegen (2002) identifizierten eine solche Rückkopplungsschleife über die PKA, die die Spezifität der G-Protein-Kopplung reguliert. Die G-Protein-Kopplung ist in diesem Fall also abhängig von der nachfolgenden Signalkaskade.

Kilts und Kollegen identifizierten 2002 mehrere G-Proteine als Kopplungspartner des β 2-adrenergen Rezeptors. In der gleichen Arbeitsgruppe wurde 2002 eine altersabhängige Expression des $G_{\alpha_{i2}}$ -Proteins und damit einhergehend eine erhöhte Kopplung des β 2-adrenergen Rezeptors an dieses Protein festgestellt. Die altersabhängige Expression eines bestimmten G-Protein-Subtyps bestimmt hier also den aktiven Signalweg.

Stephen Wong untersuchte 2002 die Selektivität der G-Protein-Kopplung und stellte folgende Hypothese auf: Wie selektiv die G-Protein Kopplung an den Rezeptor ist, hängt von zwei unterschiedlichen funktionellen Regionen in der intrazellulären Region des Rezeptors ab. Dies ist zum einen die „Aktivierungsdomäne“ die eine Vielzahl von G-Protein-Subtypen aktivieren kann und zum anderen die „Selektionsdomäne“, die die Kopplung dem gewünschten Signalweg anpasst. Kleinste Veränderungen in diesen beiden Domänen können die Genauigkeit der G-Protein-Selektivität verändern. Dies untersuchte er u.a. mit Chimären aus

M1 mAChRen und β -adrenergen Rezeptoren, die je nach Veränderung an G_q , G_s , G_i , G_o oder G_z koppelten (Wong und Ross, 1994).

Der humane Thyrotropin-Rezeptor kann an alle G-Protein Subtypen koppeln (Laugwitz et al., 1996) und auch unterschiedliche Spleiss-Varianten des Prostaglandin EP3-Rezeptors aktivieren unterschiedliche G-Proteine (Hasegawa et al., 1996). Diese Variationsmöglichkeit der selektiven G-Proteinkopplung ist auch von anderen Forschergruppen untersucht worden. Vom stimulatorischen G-Protein $\alpha(G_s\alpha)$ weiss man, dass es in zwei unterschiedlichen Größen existiert, nämlich 52 kDa und 45 kDa und von vier mRNAs aus dem gleichen Gen gebildet wird (Bray et al., 1986; Robishaw et al., 1986; Kozasa et al., 1988). Generell wird davon ausgegangen, dass die kurze und die lange Variante identische Funktionen ausüben (Graziano et al., 1987), aber es gibt auch neuere Untersuchungen, die das Gegenteil nahe legen (Kvapil et al., 1995; Seifert et al., 1998; Bourova et al., 1999 und 2000; Novotny et al., 1999). Der Anteil der langen zur kurzen Variante und die Verteilung der beiden Varianten verändern sich während der Differenzierung von Zellen, während der altersabhängigen und ontogenetischen Entwicklung und bei adaptiven Prozessen (zur Übersicht: Novotny und Svoboda, 1998). Ihnatovych und Kollegen (2001) stellten zudem fest, dass im Kortex, Thalamus und Hippocampus der Ratte der Anteil der beiden Varianten in der Membran der Zellen und im Zytosol stark variiert und sich in einem Zeitraum vom postnatalen Tag 1 bis 90 sehr stark verändert.

Es ist also gut möglich, dass die Kopplung des M3-Rezeptors an ein bestimmtes G-Protein aufgaben- und/oder altersspezifisch unterschiedlich ist oder der aktivierte Signalweg die Kopplung verändert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass, abhängig von bestimmten Faktoren, kurze oder lange Spleissvarianten des G-Proteins dessen Zielmoleküle definieren.

4.6.2 Der M3 (M5)-Rezeptor ist über einen ungewöhnlichen Signalweg mit der AC verknüpft

Die Vielfalt der Verknüpfungen der mAChRn mit intrazellulären Signalwegen und deren Veränderungen im Laufe der Zeit lassen sich gut am Beispiel von drei Veröffentlichungen von Neil Nathanson verdeutlichen (1987, 1996 und 2000). In der 1987 erschienenen Veröffentlichung geht er in der Hauptsache von drei verschiedenen biochemischen Reaktionen aus, die durch mAChRn vermittelt werden: die Hemmung der AC, eine erhöhte Umsetzung bestimmter Membranphospholipide (PI, PIP₂, IP₃) und die Stimulation der cGMP-Synthese. In der Veröffentlichung von 1996 werden diese biochemischen Reaktionen bestimmten Rezeptoren zugeordnet: Die M1-, M3- und M5-Rezeptoren aktivieren die PLC über die Kopplung an ein G-Protein, welches nicht mit Pertussistoxin blockiert werden kann, aber hemmen nicht die AC. Die M2- und M4-Rezeptor aktivieren über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein die AC, jedoch nicht die PLC. Er schränkt aber sofort ein, dass diese Kopplung nicht absolut sei und von verschiedenen Isoformen der PLC oder der G-Proteine variiert werden kann. Die Veröffentlichung von 2000 weist schon im Titel deutlich darauf hin, dass die Kopplung von mAChRn an bestimmte Signalwege ungleich komplizierter ist: „*A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signaling pathways to take your breath away*“ (Eine Vielzahl muskarinischer Mechanismen: Genug Signalwege um ihnen den Atem zu rauben). Er verdeutlicht am Beispiel der Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels welche Möglichkeiten der Aktivierung eines mAChRs nachgeschaltet sein können (Abb. 23).

Diese Abbildung verdeutlicht, dass von jedem mAChR-Subtyp über verschiedenste Signalwege der intrazelluläre cAMP-Spiegel verringert oder erhöht werden kann und dass die Spezifizierung des Rezeptors vom Grad der Rezeptorexpression, dem Zelltyp und der Kombination der Effektormoleküle abhängig ist.

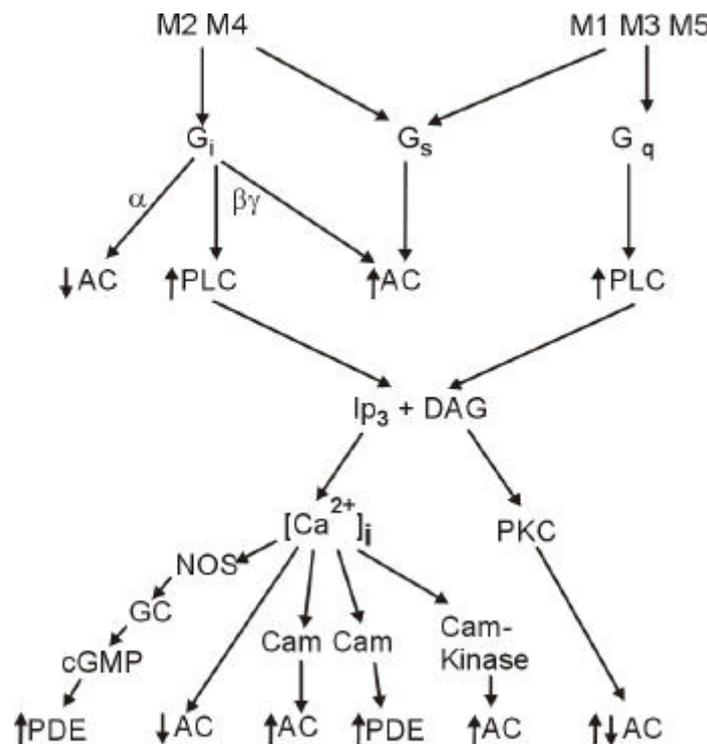


Abbildung 23: Vereinfachte Darstellung der vielfachen Möglichkeiten über die Aktivierung von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren den intrazellulären cAMP-Spiegel zu regulieren. Die Aktivierung eines bestimmten mAChR-Subtyps kann, abhängig vom Grad der Rezeptorexpression, dem Zelltyp und der Kombination der Effektormoleküle den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen oder verringern. (M1-M5 = unterschiedliche mAChR-Subtypen, $G_i/G_o/G_q$ = verschiedene G-Proteine mit ihren Untereinheiten, AC = Adenylatzyklase, PLC = Phospholipase C, IP₃ = Inositoltriphosphat, DAG = Diacylglycerol, PKC = Proteinkinase C, NOS = NO-Synthase, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, PDE = Phosphodiesterase, Cam = Calmodulin) (mod. nach Nathanson, 2000).

4.7 Die Bedeutung des Signalwegs für die Entwicklung des Netzwerks

Die postnatale Entwicklung des neuronalen Netzwerks im ZNS von Säugetieren ist stark abhängig von der Aktivierung der Zellen und dabei spielt die Etablierung funktioneller GABAerger Synapsen eine entscheidende Rolle. Innerhalb der ersten postnatalen Wochen führt die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zur Depolarisierung der IC-Neurone und zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺Konzentration. Die durch Muskarin bewirkte Erhöhung der GABA-Freisetzung, führt zu einer stärkeren Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren, potenziert den GABA-

aktivierten Einstrom von Ca^{2+} und führt letztendlich zu einer höheren intrazellulären Ca^{2+} Konzentration im postsynaptischen Neuron des IC (Frech et al., 1999).

Dies könnte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Stabilisierung von inhibitorischen Synapsen im sich entwickelnden IC spielen. Die Muskarinwirkung erfolgt beim juvenilen Tier über einen anderen Signalweg als beim adulten Tier und dies könnte zwei Vorteile haben: Erstens erfolgt eine Aufgabentrennung zwischen der Netzwerkbildung und der Synapsenstabilisierung im juvenilen Tier und der Signalweiterleitung im erwachsenen Tier. Zweitens ist der stark diffundierende sekundäre Botenstoff NO nicht involviert. Dies ermöglicht eine klare Trennung der aktivierten Synapse von den umgebenden Synapsen.

4.8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Analyse von intrazellulären Signalwegen den Einsatz einer Vielzahl von pharmakologischen Substanzen, Agonisten wie Antagonisten, erfordert. Die Signalwege sind so stark miteinander verkettet, dass der Einsatz eines einzigen Agonisten bzw. Antagonisten keine eindeutigen Ergebnisse liefern kann.

In der vorliegenden Untersuchung führte die Nutzung verschiedenster Modulatoren zu folgendem Ergebnis:

1. Eine Modulation der GABAergen Transmission über muskarinische Acetylcholinrezeptoren im Colliculus inferior der juvenilen Ratte wurde bei 41,2% der untersuchten Zellen gefunden. Dabei erhöhte die Applikation von Muskarin die Frequenz der GABAergen IPSCs durchschnittlich um den Faktor 5,6. Diese evozierten IPSCs ließen sich durch den GABA_A -Rezeptor-Antagonisten Bicucullin blockieren.
2. Die durch Muskarin hervorgerufene Frequenzsteigerung der GABAergen IPSCs wird durch den M3 bzw. M5 mAChR vermittelt, da sie durch den M3- (M5-) Antagonisten 4-DAMP blockiert werden konnte.
3. NO und cGMP spielen bei der Signalkaskade, die durch die Aktivierung des mAChRs ausgelöst wird, keine Rolle. Die selektive Hemmung der Phospholipase C, des Ca^{2+} -Calmodulins, der NO-Synthase und der Guanylatzyklase konnte die Frequenzerhöhung der IPSCs durch Muskarin

nicht unterdrücken. Weiterhin führte die Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels und der intrazellulären cGMP-Konzentration nicht zu einer der Muskarinwirkung vergleichbaren Erhöhung der IPSC-Frequenz.

4. Die vorliegenden Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass die mAChRn an die AC-cAMP-PKA-Signalkaskade ankoppeln. Dafür spricht, dass die Muskarin-vermittelte Frequenzsteigerung durch einen Antagonisten der AC unterdrückt werden konnte und dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer mit Muskarin vergleichbaren Frequenzerhöhung der GABAergen IPSCs führte.

Es ist bekannt, dass der M3 (M5) mAChR über verschiedenste Signalwege den intrazelluläre cAMP-Spiegel verringern oder erhöhen kann, und dass die Spezifizierung des Rezeptors vom Grad der Rezeptorexpression, dem Zelltyp und der Kombination der Effektormoleküle abhängig ist.

Die Abweichung der juvenilen Kaskade vom im erwachsenen Tier üblichen Signalweg über Ca^{2+} und NO hat dabei den Vorteil, dass eine Aufgabentrennung zwischen Netzwerkbildung und Synapsenstabilisierung erfolgt. Beim juvenilen Tier steht die Netzwerkbildung im Vordergrund, beim erwachsenen Tier wird die Signalweiterleitung moduliert. Der sekundäre Botenstoff NO, der weit diffundiert, spielt beim juvenilen Signalweg keine Rolle und dies ermöglicht eine klare Trennung der aktivierten von den umgebenden Synapsen. Dadurch wird eine starke Selektion innerhalb der vorhandenen Synapsen ermöglicht und eine aktivitätsbasierte Netzwerkbildung vereinfacht.

5. Literatur

- Abraham WC, Tate WP (1997): Metaplasticity: a new vista across the field of synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 52(4): 303-323
- Adams JC, Mugnaini E (1984): Dorsal nucleus of the lateral lemniscus: a nucleus of GABAergic projection neurons. *Brain Res Bull* 13: 585-590
- Ahmad I, Leinders-Zufall T, Kocsis JD, Shepherd GM, Zufall F, Barnstable CJ (1994): Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* 12:155-165
- Aihara Y, Kurabayashi M, Tanaka T, Takeda SI, Tomaru K, Sekiguchi KI, Ohyama Y, Nagai R (2000): Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J Moll Cell Cardiol* 32(8): 1401-1414
- Allmann K, Page KM, Curtis CA, Hulme EC (2000): Scanning mutagenesis identifies amino acid side chain in transmembrane domain 5 of the M1 muscarinic receptor that participate in binding the acetyl methyl group of acetylcholine. *Mol Pharmacol* 58(1): 175-84
- Allroy G, Su H, Yeery Y (1999): Protein kinase C mediates muscarinic block of intrinsic bursting in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 518(1): 71-9
- Altman J, Bayer SA (1981): Time of origin of neurons of the rat inferior colliculus and the relations between cytogenesis and tonotopic order in the auditory pathway. *Exp Brain Res* 42:411-423
- Andrew DLE, Paterson JA (1989): Postnatal development of vascularity in the inferior colliculus of the young rat. *Am J Anat* 186: 389-396
- Asanuma C, Ohkawa R, Stanfield BB, Cowan WM (1986): Pre- and postnatal development of the medial lemniscus (ML), the brachium conjunctivum (BC) and the brachium of the inferior colliculus (BIC) in rats. *Soc Neurosci Abstr* 12: 953
- Asanuma C, Ohkawa R, Stanfield BB, Cowan WM (1988): Observation in the development of certain ascending inputs to the thalamus in rats. I. Postnatal development. *Dev Brain Res* 41:159-170
- Bach-y-Rita P (2003): Theoretical basis for brain plasticity after a TBI. *Brain Inj* 17(8): 643-51

- Bains JS, Ferguson AV (1997): Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. *J Physiol* 499(3): 733-46
- Batra R, Fitzpatrick DC (2002): Monaural and binaural processing in the ventral nucleus of the lateral lemniscus: a major source of inhibition in the inferior colliculus. *Hear Res* 168(1-2): 90-97
- Bayraktar T, Staiger JF, Acsady L, Cozzari C, Freund TZ, Zilles K (1997): Co-localization of vasopressive intestinal polypeptide, γ -aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Res* 757:209-217
- Ben-Ari Y (2001): Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24(6): 353-360
- Berridge MJ, Irvine RF (1984): Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-21
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994): Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853
- Bonanno G, Ruelle A, Andrioli GC, Raiteri M (1991): Cholinergic nerve terminals of human cerebral cortex possess a GABA transporter whose activation induces release of acetylcholine. *Brain Res* 539:191-195
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC und Bann MR (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-532
- Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ (1988): Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1:403-410
- Bosch RR, Patel AMP, Van Emst-de Vries SJ, Smeets RLL, De Pont JJHMM, Willems PHGM (1998): U73122 and U73343 inhibit receptor-mediated phospholipase D activation downstream of phospholipase C in CHO cells. *Eur J Pharmacol* 346: 345-35
- Bourova L, Novotny J, Svoboda P (1999): The decrease in the short variant of Gs α protein is associated with an increase in [3H]CGP12177 binding, [3H]ouabain binding and Na, K-ATPase activity in brown adipose tissue plasma membranes of cold acclimated hamsters. *J Mol Endocrinol* 22: 55-64

- Bourova L, Pesanova Z, Novotny J, Bengtsson T, Svoboda P (2000): Differentiation of cultured brown adipocytes is associated with a selective increase in the short variant of Gs α protein. Evidence for higher functional activity of Gs α . *Mol Cell Endocrinol* 167: 23-31
- Bradley J, Reuter D, Frings S (2001): Facilitation of calmodulin-mediated odor adaption by cAMP-gated channel subunits. *Science* 294: 2176-2178
- Brann MR, Buckley NJ, Bonner TI (1988): The striatum and cerebral cortex express different muscarinic receptor mRNAs. *FEBS Lett* 230:90-94
- Bray P, Carter A, Simons C, Guo V, Puckett C, Kamholz J, Spiegel A, Nirenberg M (1996): Human cDNA clones for four species of G α s signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8893-8897
- Bristow MR, Port JD, Hershberger RE, Gilbert EM, Feldman AM (1989): The β -adrenergic receptor-adenylate cyclase complex as a target for therapeutic intervention in heart failure. *Eur. Heart J.* 10: 45-54
- Britz FC, Hirth IC, Deitmer JW (2004): Second messenger cascade of glial responses evoked by interneuron activity and by a myomodulin peptide in the leech central nervous system. *Eur J Neurosci* 19(4): 983-992
- Bucci DJ, Holland PC, Gallagher M (1998): Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli. *J Neurosci* 18:8038-8046
- Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR (1988): Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 8:4646-4652
- Carsi-Gabrenas JM, Van der Zee EA, Luiten PG, Potter LT (1997): Non-selectivity of the monoclonal antibody M35 for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res Bull* 44:25-31
- Caspary DM, Milbrandt JC, Helfert RH (1995): Central auditory aging: GABA changes in the inferior colliculus. *Exp Gerontology* 30(3-4): 349-360
- Caspary DM, Palombi PS, Hughes LF (2002): GABAergic inputs shape responses to amplitude modulated stimuli in the inferior colliculus. *Hear Res* 168: 163-173
- Caulfield MP (1993): Muscarinic receptors - characterisation, coupling and function. *Pharmac Ther* 58:319-379
- Caulfield MP, Birdsall NJM (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmac Rev* 50:279-290

- Champs M, Carozzi A, Schnabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P (1992): Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature* 360: 684-686
- Chevassus H, Roig A, Belloc C, Lajoix AD, Broca C, Manteghetti M, Petit P (2002): P2Y receptor activation enhances insulin release from pancreatic beta-cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366(5): 464-469
- Cho H, Youm JB, Earm Ye, Ho WK (2001): Inhibition of acetylcholine-activated K^+ current by Chelerythrine and bisindolmaleimide in atrial myocytes from mice. *Eur J Pharmacol* 424:173-178
- Choi EJ, Wong ST, Hinds TR, Storm DR (1992): Calcium and muscarinic agonist stimulation of type I adenylylcyclase in whole cells. *J Biol Chem* 267:12440-12442
- Choudhury GG (2004): A linear signal transduction pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C_{ϵ} , and MAPK in mesangial cells regulates interferon- γ -induced $STAT1_{\alpha}$ transcriptional activation. *J Biol Chem* 279(26):27399-27409
- Christopoulos A, Kenakin T (2002): G-Protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54:323-374
- Clapham DE (1990): Arachidonic acid and its metabolites in the regulation of G protein-gated K^+ channels in atrial myocytes. *Biochem. Pharmacol.* 39: 813-815
- Clapham DE, Kim D (1989): G protein activation mechanisms of the cardiac K^+ channel, iK_{ACH} . *Soc Gen Physiol Ser* 44: 55-68
- Clapham DE und Neer EJ (1993): New Roles for G-Protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signaling. *Nature* 365:403-406
- Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:167-203
- Cochaux P, Nav Sande J, Dumont JE (1985): Islet-activating protein discriminates between different inhibitors of thyroidal cyclic AMP system. *FEBS Lett* 179:303-306

- Cohen HG, Seifen EE, Straub KD, Tiefenback C, Stermitz FR (1978): Structural specificity of the NaK-ATPase inhibition by sanguinarine, an isoquinoline benzophenanthridien alkaloid. *Biochem Pharmacol* 27: 2555-2558
- Cohen-Cory S (2002): The developing synapse: Construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298: 770-776
- Coleman J (1990): Development of auditory system structures. In: Coleman JR (eds) *Development of sensory systems in mammals*. New York: John Wiley and Sons, pp. 205-247
- Courjaret R, Lapied B (2001): Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* 60(1): 80-91
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997): Switching of the coupling of the beta 2-adrenergic receptor to different G-Proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88-91
- D'Antuono M; Kawasaki H; Palmieri C; Avoli M (2001): Network and intrinsic contributions to carbachol-induced oscillations in the rat subiculum. *J Neurophysiol* 86(3):1164-78
- D'Ascenzo M, Martinotti G, Azzena GB, Grassi C (2002): cGMP/Proteinkinase G-dependent inhibition of N-type Ca²⁺-channels induced by nitric oxide in human neuroblastoma IMR32 cells. *J Neurosci* 22(17): 7485-7492
- Dardennes R, Jarreau PH, Meininger V (1984): A quantitative Golgi analysis of the postnatal maturation of dendrites in the central nucleus of the inferior colliculus of the rat. *Dev Brain Res* 16:159-169
- Dascal N, Ilana L, Gillo B, Lester HA, Lass Y (1985): Acetylcholine and phorbol esters inhibit potassium currents evoked by adenosine and cAMP in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6001-6005
- Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC (1997): Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol* 272: 6823-6826
- De Moel MP, Van de Put FHMM, Vermegen TMJA, De Pont JJHJM, Willems PHGM (1995): Effect of the aminosteroid, U73122, on Ca²⁺ uptake and release properties of rat liver microsomes. *Eur J Biochem* 234: 626-631

- Donoghue JP, Carroll KL (1987): Cholinergic modulation of sensory responses in rat primary somatic sensory cortex. *Brain Res* 408:367-371
- Eckenstein F, Thoenen (1983): Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neurosci Lett* 36:211-215
- Egan TM, North RA (1986): Acetylcholine hyperpolarizes central neurons by acting on a M2 muscarinic receptor. *Nature* 319:405-407
- Eglen RM, Nahorski SR (2000): The muscarinic M5 receptor: a silent or emerging subtype? *Br J Pharmacol* 130: 13-21
- El-Fakahany E, Richelson E (1983): Effect of some calcium antagonists on muscarinic-receptor mediated cyclic GMP formation. *J Neurochem* 40:705-710
- Evans T, Martin MW, Hughes AR, Harden TK (1984): Guanine nucleotide-sensitive, high affinity binding of carbachol to muscarinic cholinergic receptors of 1321N1 astrocytoma cells is insensitive to pertussis toxin. *Mol Pharmacol* 27:32-37
- Faingold CL (2002): Role of GABA abnormalities in the inferior colliculus pathophysiology – audiogenic seizures. *Hear Res* 168: 223-237
- Fargon F, McNaughton PA, Sepulveda FV (1990): Possible involvement of GTP-binding proteins in the deactivation of an inwardly rectifying K⁺ current in enterocytes isolated from guinea-pig small intestine. *Pflügers Arch.* 417: 240-242
- Faye-Lund H, Osen KK (1985): Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol* 171, 1-20
- Felder CC (1995): Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9:619-625
- Fine A, Hoyle C, Maclean CJ, Levatte TL, Baker HF, Ridley RM (1997): Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys. *Neuroscience* 81:331-343
- Fisher RS, Buchwald NA, Hull CD, Levine MS (1988): GABAergic basal forebrain neurons project to the neocortex: The localization of glutamic acid decarboxylase and choline-acetyltransferase in feline corticopetal neurons. *J Comp Neurol* 272:489-502

- Ford CP, Stemkowski PL, Smith PA (2004): Possible role of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate in luteinizing hormone releasing hormone-mediated M-current inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 20(11): 2990-2998
- Frech M J, Deitmer JW, Backus KH (1999): Intracellular chloride and calcium transients evoked by gamma-aminobutyric acid and glycine in neurons of the rat inferior colliculus. *J Neurobiol* 40(3): 386-396
- Freund TF, Meskenaite V (1992): Gamma-aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:738-742
- Friauf E, Kandler K (1990): Auditory projections to the inferior colliculus of the rat are present by birth. *Neurosci Lett* 120:58-61
- Froemke RC, Li C, Dan Y (2003): A form of presynaptic coincidence detection. *Neuron* 39: 579-581
- Fujino K, Oertel D (2001): Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 21: 7372-7383
- Fukoto JM (1995): Chemistry of nitric oxide: Biologically relevant aspects. *Adv Pharmacol* 34: 1-15
- Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000): Development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat: projections from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *J Comp Neurol* 476(3): 368-382
- Gioanni Y, Rougeot C, Clarke PB, Lepouse C, Thierry AM, Vidal C (1999): Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur J Neurosci* 11(1):18-30
- Goosens KA, Holt W, Maren S (2000): A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. *Behav Brain Res* 114(1-2): 145-152
- Graziano MP, Casei PJ, Gilman AG (1987): Expression of cDNA for G-proteins in *Escherichia coli*. Two forms of Gs alpha stimulate adenylate cyclase. *J Biol Chem* 262:11375-11381
- Gu Q (2002): Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111(4): 815-835

- Guo J, Chiappinelli VA (2001): Distinct muscarinic receptors enhance spontaneous GABA release and inhibit electrically evoked GABAergic transmission in the chick lateral spiriform nucleus. *Neuroscience* 104(4): 1057-1066
- Habicht H, Vater M (1996): A microiontophoretic study of acetylcholine effects in the inferior colliculus of horseshoe bats: implications for a modulatory role. *Brain Res* 724(2): 169-179
- Haga T, Haga K, Kameyama K, Nakata H (1993): Phosphorylation of muscarinic receptors: regulation by G-Proteins. *Life Sci* 52:421-428
- Hamm HE (1991) Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. *Cell. Moll. Neurobiol.* 11:563-578
- Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC (1980): Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283:90-9
- Han X, Kobzik L, Severson D, Shimoni Y (1998): Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 509:741-754
- Hasegawa H, Negishi M, Ichikawa A (1996): Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive activity. *J Biol Chem* 271: 1857-1860
- Hasselmo ME, Anderson BP, Bower JM (1992) Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J Neurophysiol* 67:1230-1246
- Helfert RH, Bonneau JM, Wenthold RJ, Altschuler RA (1989): GABA und Glycine immunoreactivity in the guinea pig superior olivary complex. *Brain Res* 501, 269-286
- Hepler JR, Gilman AG (1992): G proteins. *Trends Biochem Sci* 17:383-387
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP (1990): Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 993-999
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988): Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94
- Hill SJ, Baker JG (2003): The ups and downs of Gs- to Gi-protein switching. *Br J Pharmacol* 138:1188-1189

- Hirsh JK, Silinsky EM (2002): Inhibition of spontaneous acetylcholine secretion by 2-chloroadenosine as revealed by a protein kinase inhibitor at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 135(8):1897-1902
- Hockberger PE, Swandulla D (1987): Direct ion channel gating: a new function for intracellular messengers. *Cell Mol Neurobiol* 7: 229-236
- Hokin MR, Hokin LE (1954): Effects of acetylcholine on phospholipids in the pancreas. *J Biol Chem* 209:549-58
- Houslay MD, Milligan G (1997): Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22: 217-224
- Hu J, El-Fakahany E (1993): Role of intercellular and intracellular communication by nitric oxide in coupling of muscarinic receptors to activation of guanylate cyclase in neuronal cells. *J Neurochem* 61:578-585
- Huffmann RF, Henson OW (1990): The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res Rev* 15, 295-323
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley (1990): Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:633-673
- Hurley JH (1999): Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 274:7599-7602
- Ihnatovych I, Hejnova L, Kostrova A, Mares P, Svoboda P, Novotny J (2001): Maturation of rat brain is accompanied by differential expression of the long and short splice variants of Gs α protein: identification of cytosolic forms of Gs α . *J Neurochem* 79:88-97.
- Ikeuchy Y, Nishizaki T, Okada Y (1996): Repetitive applications of ATP potentiate potassium current by Ca²⁺-calmodulin kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 203(2): 115-118
- Illing RB (2004): Maturation and plasticity of the central auditory system. *Acta Otolaryngol Suppl* 552: 6-10
- Imoto Y, Yatani A, Reeves JP, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM (1988): α -subunit of gs directly activates cardiac calcium channels in lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 255 (Heart Circ. Physiol. 24): H722-H728
- Iyengar R (1993): Molecular und functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J.* 7: 768-775

- Jakobs KH, Aktories K, Schultz G (1979): GTP-dependent inhibition of cardiac adenylate cyclase by muscarinic cholinergic agonists. *Naunyn-Schmiederberg's Arch Pharmacol* 310:113-119
- Jasper HH, Tessier J (1971): Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science* 172:601-602
- Jelsema CL, Axelrod J (1987): Stimulation of Phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the β g subunit of transducin and its inhibition by the α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3623-3627
- Jiminez-Capdeville ME, Dykes RW (1996): Changes in cortical acetylcholine release in the rat during day and night: Differences between motor and sensory areas: *Neurosciences* 71:567-579
- Jiminez-Capdeville ME, Dykes RW, Myasnikov AA (1997): Differential control of cortical activity by the basal forebrain in rats: a role for both cholinergic and inhibitory influences. *J Comp Neurol* 381:53-67
- Johnson MH (1999): Cortical plasticity in normal and abnormal cognitive development: Evidence and working hypotheses. *Development Psychopathology* 11: 419-437
- Jones SVP, Heilan CJ, Brann MR (1991): Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 40:242-247
- Kandler K, Friauf E (1993) Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 328:161-184
- Kaupp EB, Seifert R (2002): Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82:769-824
- Kawagushi Y (1997): Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol* 78:1746-1747
- Kawai F, Sterling P (1999): AMPA receptor activates a G-protein that suppresses a cGMP-gated current. *J Neurosci* 19:2954-2959
- Kehoe J (1990a): Cyclic AMP-induced slow inward current in depolarized neurons of *Aplysia californica*. *J Neurosci* 10:3194-3207
- Kehoe J (1990b): Cyclic AMP-induced slow inward current: its synaptic manifestation in *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 10: 3208-3218
- Kellar KJ, Martino AM, Hall DP jr, Schwartz RD, Taylor RL (1985): High-affinity binding of [3 H]acetylcholine to muscarinic cholinergic receptors. *J Neurosci* 5:1577-1582

- Kempermann G, van Praag H, Gage FH (2000): Activity dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. *Prog Brain Res* 127: 35-48
- Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL (1995): Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 38: 4343-4362
- Kilts JD, Akazawa T, Richardson MD, Kwatra MM (2002): Age increases cardiac G α i2 expression, resulting in enhanced coupling to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 277:31257-31262
- Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM (2000): beta 2-adrenergic and several other G-protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G α s and G α i. *Circulation Res* 87: 705-709
- Kimura F, Baughmann RW (1997): Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77:709-716
- Kiyosawa A, Katsurabayashi S, Akaike N, Pang ZP, Akaike N (2001): Nicotine facilitates glycine release in the rat spinal dorsal horn. *J Physiol* 536:101-110
- Klinke R, Silbernaagl S (2001): *Lehrbuch der Physiologie*. 3. vollst. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kohn EC, Alessandro R, Probst J, Jacobs W, Brilley E, Felder CC (1996): Identification and molecular characterisation of a M5 muscarinic receptor in A2058 melanoma cells. Coupling to inhibition of adenylate cyclase and stimulation of phospholipase A2. *J Biol Chem* 271:17476-17484
- Kostenis E, Zeng FY, Wess J (1999): Structure-function of muscarinic receptors and their associated G-Proteins. *Life Sci* 64(6/7), 355-362
- Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y (1988): Isolation and characterization of the human G α s gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2081-2085
- Krasel C, Vilardaga JP, Bünemann M, Lohse MJ (2004): Kinetics of G-protein-coupled receptor signaling and desensitization. *Biochemical Society Transactions* 32 (6): 1029-1031
- Krogsgaard-Larsen P (1988): GABA synaptic mechanisms. *Med Research* 8:27-56
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG (1989): Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244: 1558-1564

- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1986a): Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323: 411-416
- Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K (1986b): Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptors deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 209:367-372
- Kudo M, Kitao Y, Okoyama S, Moriizumi T (1992): Neurogenesis of the auditory brainstem in the rat: a double labeling study using BRDU and retrograde fluorescent tracers (Abstract). *Neurosci Res Suppl* 17:S249
- Kuhar M, Yamamura HI (1976): Localization of cholinergic muscarinic receptors in rat brain by light microscopic radioautography. *Brain Res* 110:229-243
- Kumahara E, Ebihara T, Saffen D (1999): Protein kinase inhibitor H7 blocks the induction of immediate-early genes *zif268* and *c-fos* by a mechanism unrelated to inhibition of protein kinase C but possibly related to inhibition of phosphorylation of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 274(15): 10430-8
- Kuzmiski JB, MacVicar BA (2001): Cyclic nucleotide gated channels contribute to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 21(22): 8707-8714
- Kvapil P, Novotny J, Ransnas LA (1995): Prologend exposure of hamsters to cold changes the levels of G-proteins in brown adipose tissue plasma membranes. *Life Sci* 57: 311-318
- Lander HM, Sehajpal PK, Novogrodsky A (1993): Nitric oxide signalling: a possible role for G proteins. *J Immunol* 151: 7182-7187
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A (1995): Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270: 7017-7020
- Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G (1996): The human thyrotropin receptor. A heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 116-120

- LeCorvoisier P, Lacotte J, Laplace M, Crozatier B (2001): Interaction of Chelerythrine with inositol phosphate metabolism. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 16:31-37
- Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Somin I (1992): Members of the G α subunit gene family activate phospholipase C β isozymes. *J. Biol. Chem.* 267:16044-16047
- Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM (2002): Dancing with different partners: protein kinase A phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G-protein coupling specificity. *Mol Pharmacol* 62: 971-974
- Leinders-Zufall T, Rosenboom H, Barnstable CJ, Shephers GM, Zufall F (1995): A calcium-permeable cGMP-activated cation conductance in hippocampal neurons. *Neuroreport* 6: 1761-1765
- Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H, Contesse V (2002): Activation of 5-HT $_7$ receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology* 143(5): 1748-1760
- Levey AI, Wainer BH, Rye DB, Mufson EJ, Mesulam MM (1984): Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholine-esterase positive neurons. *Neuroscience* 13:341-353
- Li DP, Chen SR, Pan HL (2002): Nitric oxide inhibits spinally projecting paraventricular neurons through potentiation of presynaptic GABA release. *J Neurophysiol.* 88(5):2664-74
- Li L, Yue Q (2002): Auditory gating processes and binaural inhibition in the inferior colliculus. *Hear Res* 168 (1-2): 98-109
- Lin JY, Chung KK, de Castro D, Funk GD, Lipski J (2004): Effects of muscarinic acetylcholine receptor activation on membrane currents and intracellular messengers in medium spiny neurones of the rat striatum. *Eur J Neurosci* 20(5): 1219-1230
- Ling BN, Kemendy AE, Kokko KE, Hinton CF, Marunaka Y, Eaton DC (1990): Regulation of the amiloride-blockable sodium channel from epithelial tissue. *Mol. Cell. Biochem.* 99: 141-150
- Löffelholz K. (1996): Muscarinic receptors and cell signaling. *Prog. Brain Res.* 109: 191-194

- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolensky A, Walter U, De Jonge HR (1997): Distinct and specific function of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22: 307-312
- Lombardini JB (1995): Paradoxical stimulatory effect of the kinase inhibitor chelerythrine on the phosphorylation of a approximately 20 K M(r) protein present in the mitochondrial fraction of rat retina. *Brain Res* 673: 194-198
- Ma CL, Kelly JB, Wu SH (2002): Presynaptic modulation of GABAergic inhibition by GABAB receptors in the rats inferior colliculus. *Neuroscience* 114(1): 207-215
- Marletta MA (1988): Mammalian synthesis of nitrite, nitrate and nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1:249-257
- Marin-Padilla M (1988): Early ontogenesis of the human cerebral cortex. In: Peters A, Jones EG (eds) *Cerebral Cortex. Vol. 7 Development and Maturation of Cerebral Cortex*. New York: Plenum Press, pp. 1-34
- Mash DC, Potter LT (1986): Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarinic receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19:551-564
- Materi LM, Semba K (2001): inhibition of synaptically evoked cortical acetylcholine release by ntracortical glutamate: involvement of GABAergic neurons. *Eur J Neurosci* 14:38-46
- Maxwell B, Coleman JR (1989): Differential timetable of projections into the developing inferior Colliculus in rat. *Soc Neurosci Abstr* 15:747
- Maxwell B, Clerici WJ, Brady J, McDonalds AJ, Coleman JR (1988): Sources of connections to the inferior Colliculus in the immature rat (Abstract). *Anat Rec* 220:62A
- McCormick DA, Price DA (1986): Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J Physiol (Lond)* 375:169-194
- McKinney M, Bolden C, Smith C, Johnson A, Richelson E (1990): Selective blockade of receptor-mediated cyclic GMP formation in N1E-115 neuroblastoma cells by an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol* 178: 139-140
- Merchan MA, Saldana E Plaza I (1994): Dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat: concentric organization and tonotopic projection to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 342, 259-278
- Metherate R, Cox CL, Ashe JH (1992): Cellular bases of neocortical activation: modulation of neuronal oscillations by the nucleus basalis and endogeneous acetylcholine. *J Neurosci* 12:4701-4711

- Migeon JC, Nathanson NM (1994): Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription by m1 and m4 muscarinic acetylcholine receptors. Preferential coupling of m4 receptors to Gi alpha-2. *J Biol Chem* 269 : 9767-9773
- Miranda MI, Bermudez-Rattoni F (1999): Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6478-6482
- Mogami H, Mills CL, Gallacher DV (1997): Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca²⁺, potentiates Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺-release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 324: 645-651
- Molday RS (1996): Calmodulin regulation of cyclic-nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol* 6: 445-452
- Moore DR, Kotak VC, Sanes DH (1998): Commissural and lemniscal synaptic input to the gerbil inferior colliculus. *J Neurophysiol* 80, 2229-2236
- Moore H, Darter M, Bruno JP (1995): Bidirectional modulation of cortical acetylcholine efflux by infusion of benzodiazepine receptor ligands into the basal forebrain. *Neurosci Lett* 189:31-34
- Munhoz CD, Kawamoto EM, de Sa Lima L, Lepsch LB, Glezer I, Marcourakis T, Scavone C (2005): glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. *Cell Biochem Funct* 23(2): 115-123
- Nathanson MH (1996): Regulation of muscarinic acetylcholine receptor expression and function. *Prog. Brain Res.* 109:165-168
- Nathanson NM (1987): Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Ann Rev Neurosci* 10:195-236
- Nathanson NM (2000): A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6245-6247
- Newman MB, Nazian SJ, Sanberg PR, Diamond DM, Shytle RD (2001): Corticosterone-attenuating and anxiolytic properties of mecamylamine in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 25(3):609-620
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001): Neurotransmitters as early signals for central nervous system development- *Cell Tissue Res* 305: 187-202

- Nishizuka Y (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308:693-698
- Novotny J, Svoboda P (1989): The long (G α L) and short (G α S) variants of the stimulatory guanine nucleotide-binding protein. Do they behave in an identical way? *J Mol Endocrinol* 20:163-173
- Novotny J, Bourova L, Malkova O, Svoboda P, Kolar F (1999): G proteins, β -adrenoreceptors and β -adrenergic responsiveness in immature and adult rat ventricular myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J Mol Cell Cardiol* 31: 761-772
- Nowakowski RS, Hayes NL (1999): CNS development: An overview. *Development Psychopathology* 11: 395-417
- Offermanns S, Wieland T, Homann D, Sandmann J, Bombien E, Spicher K, Schultz G, Jakobs KH (1994): Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to G $_i$ -type G-Proteins and G $_{q/11}$. *Mol Pharmacol* 45:890-899
- Okabe S (2002): Birth, growth and elimination of a single synapse. *Anat Sci Int* 77: 203-210
- Olianas M, Ingianni A, Onali P (1998): Role of G protein betagamma subunits in muscarinic receptor-induced stimulation and inhibition of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb.. *J Neurochem* 70: 2620-2627
- Oliver DL, Shneiderman A (1991): The anatomy of the inferior colliculus: A cellular basis for integration of monaural and binaural information. In: Altschuler RA (Eds.), *Neurobiology of Hearing: The central auditory system*. Raven Press, New York, pp. 195-222
- Otmakhova NA, Otmakhov N, Mortenson LH, Lisman JE (2000): Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 20(12): 4446-4451
- Owens DF, Kriegstein AR (2002): Developmental neurotransmitters?. *Neuron* 36: 989-991
- Palombi PS, Caspary DM (1996): GABA inputs control discharge rate primarily within frequency receptive fields of inferior colliculus neurons. *J Neurophysiol* 75, 2211-2219
- Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG (1993): Activation of phospholipase C isozymes by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 268:4573-4576

- Park D, Jhon DY, Kriz R, Knopf J, Rhee SG (1992): Cloning, sequencing, expression, and Gq-independent activation of phospholipase C- β 2: J. Biol. Chem. 267:16048-16055
- Parker EM, Kameyama K, Higashijima T, Ross EM (1991): Reconstitutively active G-protein coupled receptors purified from baculovirus-infected insect cells. J Biol Chem 266: 519-527
- Pedarzani P, Krause M, Haug T, Storm JF, Stühmer W (1998): Modulation of the Ca^{2+} -activated K^+ current s_{AHP} by a phosphatase-kinase balance under basal conditions in rat CA1 pyramidal neurons. J Neurophysiol 79: 3252-3256
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran Capon DJ (1988): Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. Nature 334: 434-437
- Pepeu G, Blandina P (1998): The acetylcholine, GABA, glutamate triangle in the rat forebrain. J Physiol (Paris) 92:351-355
- Pollak GD, Burger RM, Park TJ, Klug A, Bauer EE (2002): Roles of inhibition for transforming binaural properties in the brainstem auditory system. Hear Res 168, 60-78
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E (1999): Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. J Neurosci 19:5228-5235
- Pysh JJ (1969): The development of the extracellular space in neonatal rat inferior Colliculus: an electron microscopy study. Am J Anat 124:411-430
- Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA (1999): Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. Ann N Y Acad Sci 868:591-610
- Rasmusson DD, Dykes RW (1988): Long-term enhancement of evoked potentials in cat somatosensory cortex by co-activation of the basal forebrain and cutaneous receptors. Exp Brain Res 70:276-286
- Rauschecker JP (1995): Developmental plasticity and memory. Behav Brain Res 66(1-2): 7-12
- Reever CM, Ferrari-di-Leo G, Flynn DD (1997): The M5 receptor subtype: fact or fiction? Life Sci 60:1105-1112
- Repetto-Antoine M, Meininger V (1982): Histogenesis of the inferior Colliculus in rat. Anat Embryol 165:19-37

- Richards MH, Van Giersbergen PLM (1995): Human muscarinic receptors expressed in A9L and CHO cells: activation by full and partial agonists. *Br J Pharmacol* 114: 1241-1249
- Riker WF, Wescoe W (1951): The pharmacology of flaxedil with observation on certain analogues. *Ann NY Acad Sci* 54:373-392
- Robishaw JD, Smigel MD, Gilman AG (1986): Molecular bases for two forms of the G-protein that stimulates adenylate cyclase. *J Biol Chem* 261: 9587-9590
- Rotter A, Birdsall NJ, Burgen AS, Field PM, Hulme EC, Raisman G (1979): Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of [³H]propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res* 180(2):141-165
- Saldana E, Merchán MA (1992): Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319, 417-437
- Saransaari P, Oja SS (2002): Taurine release in the developing and adult mouse hippocampus: involvement of cyclic guanosine monophosphate. *Neurochem Res* 27(1-2): 15-20
- Sarter M, Bruno JP (1997): Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Rev* 23:28-46
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B (1996): Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50(1):1-5
- Schubert B, Vandongen AM, Kirsch GE, Brown AM (1989): β -adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science* 245: 516-519
- Seifert R, Wenzel-Seifert K, Lee TW, Gether U, Sanders-Bush E, Kobilka BK (1998): Different effects of G α splice variants on β 2-adrenoreceptor-mediated signalling. The β 2-adrenoreceptor coupled to the long splice variant of G α has properties of a constitutively active receptor. *J Biol Chem* 273: 5109-5116
- Shah SN, Bhargava VK, McKean CM (1978): Maturational changes in early auditory evoked potentials and myelination of the inferior Colliculus in rats. *Neuroscience* 3:561-563
- Sharples C, Wonnacott S (2001): Neuronal nicotinic receptors. *Tocris review* 19
- Shekter LR, Taussig R, Gillard SE, Miller RJ (1997): Regulation of human neuronal calcium channels by G protein $\beta\gamma$ subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol. Pharmacol.* 52:282-291

- Shen KZ, Cox BA, Johnson SW (1997): L-Arginine potentiates GABA-mediated synaptic transmission by a nitric oxide-independent mechanism in rat dopamine neurons. *Neuroscience* 79(3): 649-658
- Shi L, Wang C (1999): Inhibitory Effect of the Kinase Inhibitor Chelerythrine on Acetylcholine-induced current in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 368(1):40-44
- Shindou T, Nonaka H, Richardson PJ, Mori A, Kase H, Ichimura M (2002): Presynaptic adenosine A2A receptors enhance GABAergic synaptic transmission via a cyclic AMP dependent mechanism in the rat globus pallidus. *Br J Pharmacol* 136(2): 296-302
- Shneiderman A, Oliver DL (1989): EM autoradiographic study of the projections from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: a possible source of inhibitory inputs to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 286, 28-47
- Shneiderman A, Oliver DL, Henkel CK (1988): Connections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: an inhibitory parallel pathway in the ascending auditory system? *J Comp Neurol* 276, 188-208
- Shneiderman A, Chase MB, Rockwood JM, Benson CG, Potashner SJ (1993): Evidence for a GABAergic projection from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus to the inferior colliculus. *J Neurochem* 60, 72-82
- Sillito AM, Murphy PC (1987): The cholinergic modulation of cortical function. In: Jones EG, Peters A (eds): *Cerebral Cortex*, volume 6. Plenum, New York, 161-185
- Sivaramakrishnan S, Oliver DL (2001): Distinct K currents result in physiologically distinct cell types in the inferior colliculus of the rat. *J Neurosci* 21(8): 2861-2877
- Snider RM, McKinney M, Forray C, Richelson E (1984): Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3905-3909
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka S, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997): The Gbg sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89: 105-114
- Stiles J (2000): Neural plasticity and cognitive development. *Dev Neuropsychol* 18(2): 237-72

- Strathmann MP, Wilkie TM, Simon MI (1989): Diversity of the G-Protein family: sequences from five additional α subunits in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7407-7409
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983): Release of Ca^{2+} -Ionen from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature* 306:67-69
- Study RE, Breakfield XO, Bartfai T, Greengard P (1978): Voltage-sensitive calcium-channels regulate guanosine-3'5'-cyclic monophosphate levels in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 6295-6299
- Sudlow LC, Huang RC, Green DJ, Gillette R (1993): cAMP-activated Na^{2+} -current of molluscan neurons is resistant to kinase inhibitors and is gated by cAMP in the isolated patch. *J Neurosci* 13: 5188-5193
- Sun C, Du J, Raizada MK, Sumners C (2003): Modulation of delayed rectifier potassium current by angiotensin II in CATH.a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310(3):710-4
- Tang WJ, Gilman AG (1991): Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G-Protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* 254: 1500-1503
- Tang WJ, Gilman AG (1992): Adenylyl cyclases. *Cell* 70: 869-872
- Tang WJ, Gilman AG (1995): Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gsa and forskolin. *Science* 268: 1769-1772
- Tanner LI, Harden TK, Wells JN, Martin MW (1986): Identification of the phosphodiesterase regulated by muscarinic cholinergic receptors of 1321N1 human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol* 29:455-460
- Taussig RA, Iniguez-Lluhi JA, Gilman AG (1993): Inhibition of adenylyl cyclase by $\text{Gi}\alpha$. *Science* 261: 218-221
- Tayebati SK, Di Tullio MR, Amenta F (2004): Age-related changes of muscarinic cholinergic receptor subtypes in the striatum of Fisher 344 rats. *Exp Gerontology* 39: 217-223
- Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) Activation of the β_1 isozyme of phospholipase C by a subunits of the gq class of G proteins. *Nature* 350:516-518
- Thompson SH, Mathes C, Alousi AA (1995): Calcium requirement for cGMP production during muscarinic activation of N1E115 cells. *Am J Physiol* 269: C979-C985

- Tsien JS (2002): Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Curr Opin Neurobiol* 10: 266-273
- Van der Zee EA, Luiten PG (1999): Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58:409-471
- Vargas G, Lucero MT (1999): Dopamine modulates inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I_h) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 81(1): 149-58
- Vazquez J, Baghdoyan HA (2003): Muscarinic and GABA_A receptors modulate acetylcholine release in feline basal forebrain. *Eur J Neurosci* 17(2):249-59
- Vidal C, Changeux JP (1993): Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* 56:23-32
- Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G (1990): Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett* 114:154-159
- Vizi ES, Lendvai B (1999): Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 219-235
- Voytko ML, Olton DS, Richardson RT, Gorman LK, Tobin JR, Price DL (1994): Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J Neurosci* 14:167-186
- Walterova D, Ulrichova J, Preininger V, Simanek V (1981): Inhibition of liver alanine aminotransferase activity by some benzophenanthridine alkaloids. *J Med Chem* 24:1103-1107
- Wamsley JK, Lewis MS, Young WS 3rd, Kuhar MJ (1981): Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brainstem. *J Neurosci* 1:176-191
- Wan Q, Luo ZP, Wang H (2003): Muscarinic receptor activities potentiated by desensitization of nicotinic receptors in rat superior cervical ganglia. *Acta Pharmacol Sin* 24(7): 657-62
- Wang HG, Storm DR (2002): Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 63(3)463-468

- Wang HQ, Kim MP, Tiano HF, Langenbach R, Smart RC (2001): Protein kinase C- α co-ordinately regulates cytosolic phospholipase A(2) activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. *Mol Pharmacol* 59(4): 860-866
- Wang SZ, El Fakahany EE (1993): Application of transfected cell lines in studies of functional receptor subtype selectivity of muscarinic agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 237-243
- Wang SZ, Lee SY, Zhu SZ, El Fakahany EE (1996): Different coupling of M1, M2, M5 muscarinic receptors to activation of neuronal nitric oxide synthase. *Pharmacology* 53: 271-280
- Wang SZ, Sheng ZZ, El Fakahany EE (1994): Efficient coupling of M5 muscarinic acetylcholine receptors to activation of nitric oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther* 268:552-557
- Watanabe AM, McConnaughey MM, Strawbridge RA, Fleming JW, Jones LR, Besch HR (1978): Muscarinic cholinergic receptor modulation of β -adrenoceptor affinity for catecholamines. *J Biol Chem* 253: 4833-4836
- Watson N, Daniels DV, Ford APDW, Eglen RM, Hedge SS (1999): Comparative pharmacology of recombinant human M3 and M5 muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 127: 590-596
- Wei JY, Jin X, Cohen ED, Daw NW, Barnstable CJ (2002): cGMP-induced presynaptic depression and postsynaptic facilitation at glutamatergic synapses in visual cortex. *Brain res* 927: 42-54
- Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990): Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7050-7054
- Weiss JL, Burgoyne RD (2002): Sense and sensibility in the regulation of voltage-gated Ca²⁺-channels. *Trends Neurosci* 25(10): 489-491
- Wenzel-Seifert K, Seifert R (2000): Molecular analysis of beta2-adrenoceptor coupling to Gs-, Gi- and Gq-proteins. *Mol Pharmacol* 58: 954-966
- Wess J (1996): Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10: 69-99
- Wess J, Blin N, Mutschler E, Bluml K (1995): Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G-protein coupling. *Life Sci* 56:915-922

- Willems PHGM, Van de Put FHMM, Engbersen R, Bosch RR, Van Hoof HJM, De Pont JJHMM (1994): Induction of Ca²⁺-oscillations by selective, U73122-mediated, depletion of inositol-triphosphate-sensitive Ca²⁺-stores in rabbit pancreatic acinar cells. *Pflüg Arch* 427: 233-243
- Wise A, Jupe SC, Rees S (2004): The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 43-66
- Wong SK (2003): G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals* 12:1-12
- Wong SK, Ross EM (1994): Chimeric muscarinic cholinergic:beta-adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G proteins. *J Biol Chem* 269:18968-18976
- Wu SY, Dun NJ (1996): Potentiation of IPSCs by nitric oxide in immature rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *J Physiol* 495(2): 497-90
- Yang J, Tsien RW (1993): enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10: 127-136
- Yankulov K, Yamashita K, Roy R, Egly JM, Bentley DL (1995): The transcriptional elongation inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription factor IIH-associated protein kinase. *J Biol Chem* 270(41): 23922-23925
- Yatani A, Codina J, Imotot Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM (1987): A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science* 238: 1288-1292
- Ye JH, Ren J, McArdle JJ (1999): Waglerin-1 inhibits GABA_A currents of neurons in the nucleus accumbens of neonatal rats. *Brain Res* 837: 29-37
- Ye L; Qi JS; Qiao JT (2001): Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is independent of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett* 2001 Mar 16;300(3):145-8
- Yigit M, Keipert C, Backus KH (2003): Muscarinic acetylcholine receptors potentiate the GABAergic transmission in the developing rat inferior colliculus. *Neuropharmacology* 45: 504-513
- Zagotta WN, Siegelbaum SA (1996): Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* 19:235-263

6. Zusammenfassung

An die Signalübertragung im ZNS werden in bestimmten Entwicklungsstadien sehr unterschiedliche Anforderungen gestellt. Im adulten Gehirn dient sie nicht nur der Nachrichtenübermittlung, sondern auch der aktivitätsbasierten Umgestaltung neuronaler Verbindungen bei Lernprozessen und der regenerativen Umgestaltung nach Verletzungen. Im sich entwickelnden Gehirn werden schon frühzeitig Nervenzellen elektrisch erregbar und spontan aktiv. Diese elektrische Aktivität und die dadurch verursachte Transmitterausschüttung spielen bei der selektiven Stabilisierung von Synapsen und damit bei der Ausgestaltung des neuronalen Netzwerks eine große Rolle. Im ZNS von Vertebraten beruht die Wirkung des Neurotransmitters und Neuromodulators Acetylcholin auf den nikotinischen und muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChRen) koppeln, abhängig von den fünf identifizierten Rezeptorsubtypen (M1-M5), an unterschiedliche intrazelluläre Signalketten an. Dabei interagieren für gewöhnlich die M1, M3 und M5 Rezeptoren mit einem G-Protein des Typs $G_{q/11}$, während M2 und M4 ein G-Protein des Typs $G_{i/o}$ aktivieren. Der Colliculus inferior (IC) ist eine wichtige Verschaltungsstation im auditorischen Mittelhirn von Säugetieren. Inhibitorische und exzitatorische Eingänge werden dort während der Entwicklung mit großer Präzision angelegt und konvergieren auf einzelne IC-Neurone. Die physiologische Bedeutung von mAChRen im IC ist weitgehend unerforscht und die Subtypen die im juvenilen IC eine Rolle spielen wurden noch nicht charakterisiert.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit mittels elektrophysiologischer Untersuchungen im IC der juvenilen Ratte (P5-P12) folgende Fragen zu klären:

- i) Gibt es im IC der jungen Ratte eine Modulation der GABAergen Transmission durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren?
- ii) Welcher muskarinische Rezeptorsubtyp spielt dabei eine Rolle?
- iii) Welcher intrazelluläre Signalmechanismus ist der Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors nachgeschaltet?

Unter Wirkung von Muskarin kam es bei 41,2% der untersuchten Neurone des Colliculus inferior zu einer Erhöhung der Frequenz der spontanen IPSCs. Die sIPSCs wurden durch Bicucullin blockiert, somit handelt es sich um GABAerge IPSCs. Die Wirkung von Muskarin nahm zu, wenn die Tiere älter als 9 Tage waren. Es wurde

gezeigt, dass nAChRen keine Rolle spielen bei der Erhöhung der sIPSC-Frequenz, während eine selektive Blockade der M3-(M5-) mAChRen durch 4-DAMP die Muskarinwirkung blockierte. In der Regel sind die M3-Rezeptoren über folgende Signalkaskade aktiv: Phospholipase C, Kalzium-Calmodulin, NO-Synthase, Guanylatzyklase, die NO-Konzentration und cGMP. Alle Glieder dieser Kaskade wurden untersucht, sie hatten aber keinen Einfluss auf die Muskarinwirkung. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer vergleichbaren Frequenzsteigerung der sIPSCs wie sie unter der Wirkung von Muskarin gemessen wurde. Weiterhin ließ sich die Erhöhung der sIPSC-Frequenz durch Muskarin vollständig aufheben, wenn die intrazelluläre Adenylatzyklase blockiert wurde. Es ist bekannt, dass der M3-(M5-) mAChR über verschiedenste Signalwege den intrazellulären cAMP-Spiegel verringern oder erhöhen kann und dass die Spezifizierung des Rezeptors vom Grad der Rezeptorexpression, dem Zelltyp und der Kombination der Effektormoleküle abhängig ist.

Die Abweichung der juvenilen Kaskade vom im erwachsenen Tier üblichen Signalweg hat dabei den Vorteil, dass eine Aufgabentrennung zwischen Netzwerkbildung und Synapsenstabilisierung einerseits und Signalweiterleitung andererseits erfolgt. Beim juvenilen Tier steht die Netzwerkbildung im Vordergrund, beim erwachsenen Tier wird die Signalweiterleitung moduliert. Der sekundäre Botenstoff NO, der weit diffundieren kann, spielt beim juvenilen Signalweg keine Rolle und dies ermöglicht eine klare Trennung der aktivierten von den umgebenden Synapsen. Dadurch wird eine starke Selektion innerhalb der vorhandenen Synapsen ermöglicht und eine aktivitätsbasierte Netzwerkbildung vereinfacht.

Die Etablierung funktioneller GABAerger Synapsen ist ausschlaggebend für die Entwicklung des neuronalen Netzwerks. Innerhalb der ersten postnatalen Wochen führt die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zur Depolarisierung der IC-Neurone und zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Acetylcholin potenziert also letztlich den GABA-aktivierten Einstrom von Ca²⁺ und führt damit zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration im postsynaptischen Neuron des IC. Diese modulatorische Wirkung von Acetylcholin könnten damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Stabilisierung von inhibitorischen Synapsen im sich entwickelnden IC der Ratte spielen.

7. Lebenslauf

Name: Christine Keipert
Geboren am: 09. August 1976 in Groß-Umstadt
Wohnhaft in: Adalberstr. 41, 60486 Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

18.06.1996 Abitur am Max-Planck-Gymnasium in Groß-Umstadt

Hochschulbildung:

Oktober 1996: Beginn des Biologie-Studiums an der Universität Bremen

März 2002: Diplom im Studiengang Biologie der Universität Bremen
(Gesamtnote: Sehr gut)
Die Diplomarbeit wurde im Institut für Hirnforschung in der
Abteilung von Prof. Dr. Dr. G. Roth in Kooperation mit der
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des ZKH
St.-Jürgen-Strasse erstellt.
Titel der Arbeit: Transplantation des Nervus ischiadicus
bei der Ratte und die Beeinflussung der Regeneration
durch Behandlung mit Immunsuppressiva

April 2002 – März 2005: Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität:
Moleküle, Strukturen, Funktionen“ der J. W. Goethe-
Universität in Frankfurt am Main
Die Doktorarbeit wurde am Institut für Physiologie in der
Abteilung Zelluläre Neurophysiologie unter der Betreuung
von Prof. Dr. K.H. Backus erstellt

Teile der Arbeit wurden publiziert und auf Konferenzen präsentiert:

Yigit M, Keipert C, Backus KH (2003): Muscarinic acetylcholine receptors potentiate the GABAergic transmission in the developing rat inferior colliculus.

Neuropharmacology 45; 504-13

Keipert C, Yigit M, Jedlicka P, Backus KH (2002): Muscarinic modulation of the GABAergic transmission in the inferior colliculus of the rat.

29. Göttinger Neurobiologie Konferenz

Backus KH, Korte S, Keipert C, Yigit M, Jedlicka P, Frech M (2003): Presynaptic acetylcholine receptors differentially potentiate the GABAergic transmission in the rat inferior colliculus.

Pflugers Arch – Eur J Physiol [Suppl. 1] 445: O14-6

Keipert C, Yigit M, Jedlicka P, Backus KH (2003): Muscarinic modulation of the GABAergic transmission in the inferior colliculus of the rat.

23rd International Summerschool of Brain Reserch, Amsterdam, Niederlande

Keipert C, Backus KH (2004): Characterization of possible intracellular messengers contributing to the muscarinic modulation of the GABAergic transmission in the developing rat inferior colliculus.

FENS Forum, Lissabon, Portugal

Keipert C, Backus KH (2005): The activation of muscarinic acetylcholine receptors modulates the intracellular cAMP level in the developing rat inferior colliculus.

30. Göttinger Neurobiologie Konferenz