

Lypd6: Ein neuartiger Modulator neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Marco Morsch

geboren in

Andernach

Bonn, Januar 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Swandulla
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 09. April 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_onlineelektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2009

Daniela gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Ionenkanäle in Zellmembranen erregbarer Zellen	3
2.2. Acetylcholinrezeptoren	4
2.2.1. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs)	4
2.2.2. Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren	6
2.2.2.1. Aktivierungsmechanismus von neuronalen nAChRs	8
2.2.2.2. Kalziumpermeabilität von neuronalen nAChRs	9
2.3. Modulation von nAChRs	10
2.3.1. Ly6-uPAR-Proteine als Modulatoren von nAChRs	12
2.4. Verhaltensphysiologische Funktionsanalyse von Lypd6 in transgenen Tieren	13
2.5. Ziele der Arbeit	15
3. Material & Methoden	17
3.1. Versuchstiere	17
3.2. Herstellung trigeminaler Neurone	17
3.2.1. Präparation der trigeminalen Ganglien	17
3.2.2. Enzymatischer Verdau der trigeminalen Ganglien	18
3.2.3. Mechanische Dissoziation der Neurone	18
3.2.4. Aufreinigung der Zellsuspension	18
3.3. Lösungen	19
3.3.1. Extrazellulärlösungen	20
3.3.2. Intrazellulärlösungen	21
3.4. Elektrophysiologie	21
3.4.1. Voltage-Clamp-Technik	21
3.4.2. Patch-Clamp-Technik	22
3.4.3. Patch-Clamp-Konfigurationen	22
3.5. Messplatz mit Applikationssystem	24
3.5.1. Messplatz	24

3.5.2.	Manipulatoren und Patchpipetten	25
3.5.3.	Applikations-Perfusions-System	25
3.5.4.	Patch-Clamp-Verstärker und Vorverstärker	26
3.5.5.	Zellstimulation	27
3.5.6.	Datenerfassung	27
3.6.	Kalzium-Mikrofluorometrie (Imaging)	28
3.6.1.	Fura-2-AM / Fura-2	28
3.6.2.	Vorbereitung der Zellen für die Imagingmessungen	30
3.6.3.	Anregungssystem	30
3.6.4.	Auswertung der Imagingdaten	32
3.7.	Transfektion von isolierten trigeminalen Ganglienzellen mit siRNA	33
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Agonisteninduzierte Ströme durch nAChRs	35
4.2.	Ströme durch nAChRs in Wildtyp- und transgenen Mäusen	36
4.3.	Konzentrationswirkungskurven der Gesamtzellströme durch nAChRs für den Agonisten Nikotin	39
4.4.	Pharmakologie nikotininduzierter Ströme durch nAChRs	40
4.5.	Isolierte Kationenströme durch nAChRs	42
4.6.	Konzentrationswirkungskurven der Kalziumströme durch nAChRs für den Agonisten Nikotin	44
4.7.	Pharmakologie der Kalziumströme durch nAChRs	45
4.8.	Mikrofluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen	46
4.9.	Anteil intrazellulärer Kalziumspeicher am nikotininduzierten Kalziumsignal	49
4.10.	siRNA-vermittelter Knockdown des Lypd6-Transkripts	52
5.	Diskussion	55
5.1.	Charakteristika des Lypd6-Proteins	55
5.2.	Nikotinische cholinerge Transmission im ZNS	56
5.2.1.	Die molekulare Struktur von nAChRs bestimmt deren Kalziumpermeabilität	56
5.3.	Lypd6 moduliert heteromere nAChRs	58
5.4.	Wirkmechanismen des Lypd6-Proteins	58
5.4.1.	Allosterische Modulation von Rezeptorproteinen	59
5.5.	Funktionelle Bedeutung von Lypd6	60
	Literaturverzeichnis	62
A.	Anhang	77
A.1.	Chemikalien	77
A.2.	Geräte	79
A.3.	Publikationen zu dieser Arbeit	80
A.4.	Danksagung	80
A.5.	Erklärung	81

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AD	Analog-Digital
AS	Aminosäure
α-Btx	alpha-Bungarotoxin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumionen
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % des maximalen Effekts eintritt
EPC	Patch-Clamp Verstärker
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera
FBS	fötales Kälberserum
Fura	Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) bzw. Fura-2
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N-ethylsulfonsäure
Hz	Hertz
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % der maximalen Inhibition eintritt
kg	Kilogramm
l	Liter
Lsg	Lösung
M	Molar (mol/l)
MEC	Mecamylamin
Mg ²⁺	Magnesiumionen
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLA	Methyllycaconitin
mmol	Millimolar

Abkürzungsverzeichnis

mm	Millimeter
MMR	Mammalian Ringer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nAChRs	nicotinic acetylcholine receptors $\hat{=}$ Nikotinsche Acetylcholinrezeptoren
Nik	Nikotin
nM	Nanomolar
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute
s	Sekunde(n)
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
tau (τ)	Zeitkonstante
TrigG	trigeminal Ganglien
TriNs	Neurone der trigeminalen Ganglien
TG	transgen
TTX	Tetrodotoxin
u.a.	und andere
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentralnervensystem
zzgl.	zuzüglich

Abbildungsverzeichnis

2.1. Übersicht über die Evolution der Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs)	5
2.2. Vereinfachte Darstellung der allgemeinen Topologie einer Untereinheit nikotinischer Acetylcholinrezeptoren	6
2.3. Schematische Darstellung eines nikotinischen Acetylcholinrezeptors	7
2.4. Modell eines Aktivierungsmechanismus des nAChR	9
2.5. Schematische Darstellung der Regulation eines nAChR durch verschiedene Liganden	11
2.6. Quantifizierung der Expression des Lypd6-Gens in Organen von adulten Mäusen	13
2.7. Lypd6-Überexpression in transgenen Tieren der Mauslinie FVB/N	14
2.8. Nikotininduzierte Analgesie von Wildtyp- und transgenen Tieren im Tail-flick-Test	14
3.1. Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers	22
3.2. Übersicht der Patch-Clamp-Konfigurationen	23
3.3. Patch-Clamp-Setup	24
3.4. Schematische Darstellung der Badkammer und des Schwerkraft-Applikationssystems	26
3.5. Absorptionsmaxima von Fura-2	30
3.6. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Kalzium-Mikrofluorometrie	31
4.1. Vereinfachte schematische Darstellung des Gesamtzellstroms durch nAChRs nach Aktivierung durch einen Agonisten	36
4.2. Gesamtzellströme durch nAChRs eines trigeminalen Neurons (Lypd6-Maus) nach Applikation von Nikotin	37
4.3. Vergleich der Gesamtzellströme durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren	38
4.4. Zeitverlauf der Aktivierung von nikotininduzierten Stromantworten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren	39
4.5. Konzentrationswirkungskurven der Gesamtzellströme durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren für Nikotin	40
4.6. Pharmakologie nikotininduzierter Gesamtzellströme durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren	41

4.7. Balkendiagramm der Mittelwerte normalisierter Peakamplituden der Natrium- und Kaliumstromkomponenten durch nAChRs trigeminaler Neurone nach Applikation von Nikotin	42
4.8. Vergleich der Kalziumstromkomponenten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren nach Applikation von Nikotin	43
4.9. Konzentrationswirkungskurven der Kalziumstromkomponente trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren für Nikotin	44
4.10. Pharmakologie nikotininduzierter Kalziumstromkomponenten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren	45
4.11. Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Neuronen von Wildtypmäusen nach Applikation von Nikotin und KCl	46
4.12. Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentrationen vor, während und nach Applikationen in trigeminalen Neuronen eines Wildtyptiers	47
4.13. Vergleich der Fluoreszenzquotienten der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- und transgenen Mäusen nach Applikation von Nikotin und KCl	48
4.14. Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen (Wildtyptier) nach Zugabe von Cadmiumchlorid (CdCl ₂) und Applikation von Nikotin und KCl	48
4.15. Vergleich der Fluoreszenzquotienten der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- und transgenen Mäusen nach Zugabe von CdCl ₂ und Applikation von Nikotin	49
4.16. Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen nach Ryanodinbehandlung und Applikation von Nikotin	50
4.17. Vergleich der Fluoreszenzquotienten der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- und transgenen Mäusen vor und nach Zugabe von Ryanodin und Applikation von Nikotin	50
4.18. Anteil des freigesetzten Ca ²⁺ aus intrazellulären Kalziumspeichern am Gesamtkalziumanstieg nach Applikation von Nikotin	51
4.19. Mikrofluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtypmäusen nach siRNA-Behandlung und Applikation von Nikotin	52
4.20. Vergleich der Fluoreszenzquotienten der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Neuronen der Wildtyp- und transgenen Tiere nach siRNA-Behandlung gegen Lypd6 und Applikation von Nikotin	53

Tabellenverzeichnis

3.1. Ionenzusammensetzungen der Extrazellulärlösungen zur Ableitung der Ströme (in mM)	20
3.2. Ionenzusammensetzungen der Intrazellulärlösungen zur Ableitung der Ströme (in mM)	21
A.1. Auflistung verwendeter Chemikalien und deren jeweilige Bezugsquelle . .	77

1. Zusammenfassung

Die Familie der uPAR/Ly6-Proteine umfasst Proteine, die unter anderem im Zentralnervensystem exprimiert werden und die eine Rolle bei der Modulation nikotinerger Acetylcholinrezeptoren spielen. Drei Beispiele für diese Proteine sind Lynx1, Slurp1 und Slurp2, die starke strukturelle Ähnlichkeiten zu α -Neurotoxinen von Schlangen aufweisen (Ploug and Ellis 1994; Tsetlin 1999).

Lynx1 ist ein Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-verankertes Zelloberflächenprotein, während es sich bei Slurp1 und Slurp2 um Sekretionsproteine handelt.

Lynx1 verändert die Ionenpermeabilität und das Desensitierungsverhalten von nAChRs, die aus den Untereinheiten $\alpha 4$ und $\beta 2$ aufgebaut sind (Ibanez-Tallon et al. 2002; Miwa et al. 1999). Die Lynx1-Knockout-Maus zeigt eine erhöhte Bindungsaffinität des Rezeptors für Nikotin und eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der Rezeptorkanäle in Anwesenheit des Agonisten (Miwa et al. 2006).

Die Sekretionsproteine Slurp1 und Slurp2 wirken ebenfalls über die Modulation von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChRs) und regulieren die Funktion menschlicher Keratinocyten (Arredondo et al. 2005, 2006). Mutationen des menschlichen Slurp1-Gens führen zur „Mal de Meleda“, einer autosomal rezessiven Hautkrankheit (Chimienti et al. 2003).

Das Protein Lypd6 ist ein weiteres kürzlich entdecktes Mitglied der uPAR/Ly6-Proteinfamilie (Darvas 2007). Verhaltensuntersuchungen von transgenen Mäusen, bei denen Lypd6 überexprimiert wurde, zeigten eine signifikante Steigerung der neuigkeitsinduzierten Lokomotion bei Tests im Offenfeld und im Y-Labyrinth. Auch konnte eine veränderte Schreckreaktion (Präpulsinhibition) festgestellt werden. In verhaltenspharmakologischen Untersuchungen wurde eine gesteigerte Sensitivität dieser Mäuse für die analgetische Wirkung von Nikotin gezeigt (Darvas 2007).

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Lypd6, ebenso wie z.B. Lynx1, als Modulator nikotinischer Acetylcholinrezeptoren wirkt. Dazu wurden elektrophysiologische Ganzzell-Patch-Clamp-, mikrofluorometrische und pharmakologische Untersuchungen

an trigeminalen Neuronen (TriNs) von Wildtyp- und transgenen Mäusen durchgeführt. Trigeminale Neurone wurden ausgewählt, da diese in transgenen Mäusen eine besonders hohe Überexpression von Lypd6 aufweisen.

Unsere Befunde zeigen, dass Lypd6 den Fluss von Kalziumionen durch nAChRs verändert. In transgenen Mäusen ist der Kalziumeinstrom durch nAChRs in die Zelle im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant verstärkt. Dies wurde sowohl in Patch-Clamp-Messungen des Membranstroms als auch in mikrofluorometrischen Messungen intrazellulärer Kalziumkonzentrationsänderungen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 nachgewiesen. Eine Beteiligung spannungsaktivierter Kalziumkanäle und intrazellulärer Kalziumspeicher an der Wirkung von Lypd6 konnte weitgehend ausgeschlossen werden. In „Loss-Of-Function“-Studien mit spezifischer siRNA wurde die Expression des Lypd6-Gens in transgenen Tieren unterdrückt. Dies führte zu einem Verlust des verstärkten Kalziumeinstroms durch nAChRs in trigeminalen Neuronen. Interessanterweise hatten diese Knockdown-Experimente auch in Neuronen von Wildtypmäusen eine deutliche Reduktion des Kalziumeinstroms durch nAChRs zur Folge. Dies weist darauf hin, dass Lypd6 auch unter physiologischen Bedingungen an der Regulation der nikotinischen Acetylcholinrezeptorfunktion beteiligt ist. Mithilfe von selektiven Inhibitoren unterschiedlicher nAChR-Subtypen konnten zudem $\alpha\beta$ -heteromere Rezeptoren als Wirkort des Lypd6-Proteins identifiziert werden.

Da Kalzium einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe ist, könnte die für Lypd6 beschriebene Wirkung auf nAChRs sowohl zu relevanten physiologischen als auch pathophysiologischen Veränderungen führen. So könnte Lypd6 über Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration sowohl prä- als auch postsynaptische Prozesse beeinflussen, die für die synaptische Transmission im ZNS und deren Plastizität bedeutsam sind (Broide and Leslie 1999; Ji et al. 2001; Mansvelder and McGehee 2000). Aber auch pathophysiologische Mechanismen, die der Neurotoxizität und dem Zelltot zugrunde liegen, könnten durch die Wirkung von Lypd6 betroffen sein (Belluardo et al. 2000; Utsumisawa et al. 2002). Bei der Abnahme kognitiver Funktionen im Alter (Gallagher and Rapp 1997), aber auch bei Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Schizophrenie (Dani and Bertrand 2007; Geula 1998; Robbins et al. 1997) werden solche Prozesse als Ursachen diskutiert.

Die hier beschriebene neuartige Wirkung von Lypd6 auf nAChRs eröffnet möglicherweise neue Ansätze zur Entwicklung therapeutischer Konzepte, mit denen man Alterungsprozessen vorbeugen kann oder die zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen geeignet sind.

2. Einleitung

2.1. Ionenkanäle in Zellmembranen erregbarer Zellen

Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des intra- und extrazellulären Ionenmilieus entsteht ein Potentialgradient (Membranpotential) über der Zellmembran erregbarer Zellen, der im unerregten Zustand der Zelle als Ruhemembranpotential bezeichnet wird. Bei einer Bewegung bestimmter Ionen durch die Zellmembran kommt es zu einer Änderung des Membranpotentials, die Zelle wird de- oder hyperpolarisiert. Neben aktiven Transportprozessen von Molekülen und Ionen durch die Zellmembran haben sich im Laufe der Evolution spezielle Membranproteine (Kanäle) entwickelt, die die Permeation von Ionen durch die Membran entsprechend deren Konzentrationsgradienten regulieren. Diese Membranproteine formen wassergefüllte Poren, die im geöffneten Zustand für bestimmte Ionen permeabel sind. Allgemein lassen sich drei wichtige Eigenschaften von Ionenkanälen zusammenfassen: (a) Sie leiten Ionen, (b) sie wirken als Filter für bestimmte Ionen und (c) sie öffnen und schließen als Reaktion auf spezifische elektrische, mechanische oder chemische Signale (Hille 2001; Kandel et al. 2000).

So öffnen und schließen z.B. spannungsgesteuerte Kanäle aufgrund von Änderungen des Membranpotentials.

Ligandengesteuerte Ionenkanäle stellen eine Gruppe von Ionenkanälen dar, deren Öffnen und Schließen hingegen durch die Bindung chemischer Substanzen geregelt wird. Typische chemische Substanzen, die diese Kanäle aktivieren und durch ihre Wirkung die Zellmembran de- oder hyperpolarisieren können, sind sog. Neurotransmitter, wie z.B. Acetylcholin (ACh), Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA) oder Glycin.

Aufgrund der Vielfalt und der Verteilung dieser funktionell essentiellen Proteine im Organismus können ihre Fehlfunktionen eine breite Spanne von Erkrankungen hervorrufen.

So kommt es z.B. durch eine Beeinträchtigung der Funktion von Acetylcholinrezeptoren in der neuromuskulären Endplatte zur Myasthenia gravis, einer Autoimmunerkrankung, deren charakteristisches Kennzeichen eine belastungsabhängige Muskelschwäche ist. Weiterhin stellen Ionenkanäle auch wichtige Angriffspunkte für chemische Substanzen wie Toxine und Arzneistoffe dar, durch deren Wirkung die Funktion der Kanäle spezifisch oder unspezifisch beeinflusst wird.

2.2. Acetylcholinrezeptoren

Wie andere Neurotransmitterrezeptoren werden Acetylcholinrezeptoren aufgrund ihrer Wirkungsweise und ihrer pharmakologischen Eigenschaften klassifiziert. Man unterscheidet metabotrope (muskarinische) Acetylcholinrezeptoren und ionotrope (nikotinische) Acetylcholinrezeptoren, die neben Acetylcholin durch die Alkaloide Muskarin oder Nikotin aktiviert werden (Kandel et al. 2000).

Muskarinische AChRs (mAChRs) sind sog. metabotrope Rezeptoren, wobei sich das Rezeptormolekül vom Kanal, den es reguliert, unterscheidet und durch die Vermittlung von G-Proteinen wirksam wird („indirect gating“).

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs $\hat{=}$ nicotinic acetylcholine receptors) sind sog. ionotrope Rezeptoren, bei denen sowohl die Rezeptorbindungsstelle als auch der Kanalkomplex integrale Bestandteile eines Makromoleküls sind („direct gating“). Dieser Rezeptortyp wird deshalb auch als Rezeptorkanalkomplex oder ligandengesteuerter Kanal bezeichnet.

2.2.1. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs)

Die nikotinischen ionotropen Acetylcholinrezeptoren sind unspezifische Kationenkanäle, bei denen die Bindung von Acetylcholin zu einer Öffnung der porenformenden Region führt und den Fluss von Natrium-, Kalium- und Kalziumionen ermöglicht. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren gehören zu der Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle, zu der auch bestimmte Glutamat-, γ -Aminobuttersäure- (GABA), Glycin- und Serotonin- (5-Hydroxytryptamin) Rezeptoren gehören (Changeux and Edelstein 2001; Lindstrom 1997). Obwohl die Rezeptoren große pharmakologische und funktionelle Unterschiede

aufweisen, teilen sie einige Grundeigenschaften. Sie weisen mehrere funktionelle Zustände als Antwort auf eine Agonistenanbindung auf: Geschlossen in Ruhe, geöffnet und geschlossen desensitisiert (siehe Abschnitt 2.2.2.1).

NAChRs setzen sich aus fünf Untereinheiten zusammen und weisen eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten dieser Untereinheiten auf (siehe Abschnitt 2.2.2). Sie sind im Nervensystem und an der motorischen Endplatte zu finden, man hat sie aber auch in nichtmuskulären/nichtneuronalen Zellen (Keratinocyten, Epithelien, Makrophagen) identifiziert. Im Nervensystem spielen nAChRs eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen physiologischen Funktionen, u.a. der Herz-Kreislauf-Regulation, der Nozizeption und der Gedächtnisbildung (Dani 2001; Everitt and Robbins 1997; Picciotto et al. 2000; Tassonyi et al. 2002). Fehlfunktionen des nAChR-Kanalkomplexes können bei Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Schizophrenie oder der Suchtentstehung eine Rolle spielen (Dani and Bertrand 2007).

Anhand ihrer Entwicklung und ihrer pharmakologischen Eigenschaften lassen sich die nAChRs, wie in Abb. 2.1 dargestellt, unterteilen (siehe auch Abschnitt 2.2.2):

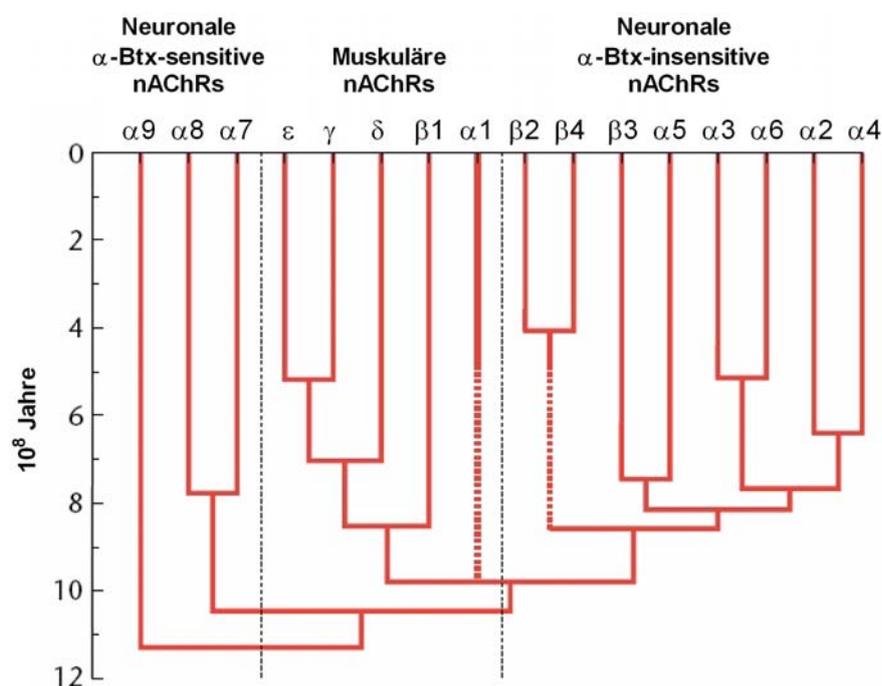


Abbildung 2.1.: Übersicht über die Evolution der Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs). Eine Vielzahl von nAChR-Subtypen kann sich aus der Kombination der einzelnen Untereinheiten formen. Die nAChRs können in drei Klassen eingeteilt werden: Neuronale homomere α -Bungarotoxin-sensitive nAChRs, muskuläre nAChRs und neuronale heteromere α -Bungarotoxin-insensitive nAChRs (Abbildung verändert nach Dani 2005).

2.2.2. Neuronale nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Neuronale nAChRs werden im ZNS und in peripheren Ganglien exprimiert, sind aber auch in einigen nichtneuronalen Geweben, wie Epithelzellen und Zellen des Immunsystems zu finden (Steinlein and Bertrand 2008).

Bei den Rezeptoren handelt es sich um integrale Membranproteine und Prototypen der Cys-Loop-Superfamilie von ligandengesteuerten Ionenkanälen. Sie bilden sich aus fünf transmembranen Untereinheiten, die um eine zentrale wassergefüllte Pore organisiert sind (Jones et al. 1999; McGehee and Role 1995). Die neuronale Rezeptorzusammensetzung kann dabei, anders als beim muskulären nikotinischen AChR, aus α - und β -Untereinheiten bestehen. Bis heute sind neun α - ($\alpha 2 - \alpha 10$) und drei β - ($\beta 2 - \beta 4$) Untereinheitengene für den neuronalen nAChR beschrieben (Abb. 2.2).

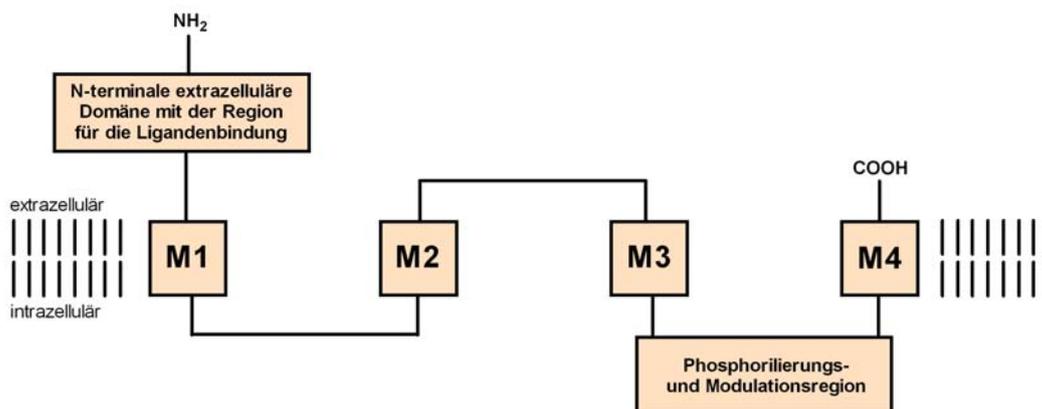


Abbildung 2.2.: Vereinfachte Darstellung der allgemeinen Topologie einer Untereinheit nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChRs). Die vier membrandurchspannenden Regionen (M1-M4, 15-20 Aminosäuren (AS) lang) sind unterteilt durch extra- und intrazelluläre Schleifen unterschiedlicher Länge. Die extrazelluläre Domäne ist ca. 200-220 AS lang und beinhaltet die Bindungsstelle für Agonisten, Antagonisten, Ionen und Modulatoren. Die Verbindungssequenz zwischen Segment M3 und M4 (100-150 AS lang) beinhaltet die Phosphorylierungsstelle für intrazelluläre Liganden, die nAChRs modulieren und regulieren können. Das C-terminale Ende jeder Untereinheit stellt das hydrophile extrazelluläre Segment (Abbildung verändert nach Dani 2005).

Die Untereinheiten können sich zu einer Vielzahl von pentameren Kombinationen zusammenschließen (Plazas et al. 2005; Dani 2005):

1) Homomere α -nAChRs bestehend aus jeweils fünf identischen $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - oder $\alpha 9$ -Untereinheiten.

-
- 2) Heterodimere α -nAChRs bestehend aus $\alpha 7/\alpha 8$ - oder $\alpha 9/\alpha 10$ -Untereinheiten.
 - 3) Heterodimere $\alpha\beta$ -nAChRs aus einer Kombination von α - ($\alpha 2$ - $\alpha 6$) und β - ($\beta 2$ - $\beta 4$) Untereinheiten.
 - 4) Komplexe Rezeptoren, zusammengesetzt aus mehr als einem Typ der α - oder β -Untereinheiten (z.B. $\alpha_3\beta_2\beta_4$).

Die letzte Gruppe umfasst auch nAChRs, die die Untereinheiten $\alpha 5$ oder $\beta 3$ aufweisen. Diese Untereinheiten können nur in solchen Dreierkombinationen funktionstüchtige Kanäle formen und verändern, wenn sie eingebaut werden, die Eigenschaften der Rezeptoren (Kuryatov et al. 2008; Ramirez-Latorre et al. 1996).

Neben ihren Zusammensetzungen lassen sich neuronale nAChRs auch pharmakologisch unterscheiden. Das aus dem Gift der Natter *Bungarus multicinctus* stammende α -Bungarotoxin verhindert irreversibel die Anlagerung eines Agonisten an den Rezeptor und erlaubt folgende Einteilung (siehe auch Abb. 2.1):

- A) Die Rezeptoren, die ACh hochaffin binden, gegen α -Bungarotoxin unempfindlich sind und aus heteropentameren nAChRs mit $\alpha 2$ - $\alpha 6$ - und $\beta 2$ - $\beta 4$ -Untereinheiten bestehen.
- B) Die Rezeptoren mit weniger hohen Affinitäten für den Agonisten, die durch α -Bungarotoxin blockiert werden und aus fünf identischen Untereinheiten ($\alpha 7$ - $\alpha 9$) aufgebaut sind.

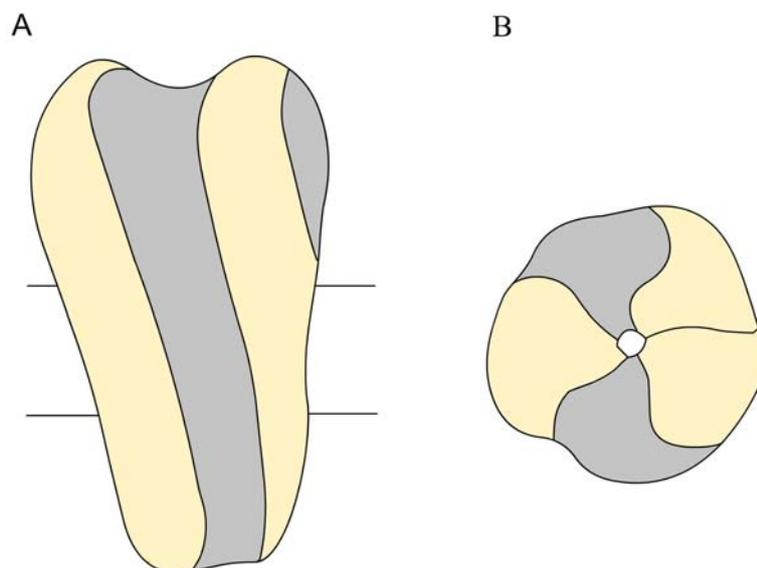


Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung eines nikotinischen Acetylcholinrezeptors.
 A) Seitenansicht eines heteromeren Rezeptors in der Zellmembran.
 B) Aufsicht auf den heteromeren Rezeptor von der extrazellulären Seite.
 Die unterschiedlichen Farben stellen alpha- (gelb) und beta- (grau) Untereinheiten dar.

Die Expression der Untereinheiten und die Zusammensetzung der Rezeptoren bestimmen die strukturellen Eigenschaften der Ligandenbindungsstelle und die Pharmakologie des Rezeptors. Bewegungen dieser fünf Untereinheiten relativ zueinander führen zu einer Konformationsänderung des nikotinischen Rezeptors, was das Öffnen oder Schließen des Kanals bewirkt (Abb. 2.3).

2.2.2.1. Aktivierungsmechanismus von neuronalen nAChRs

Prinzipiell öffnet sich der Ionenkanal für wenige Millisekunden, sobald an den nAChR ein Agonist, wie z.B. Acetylcholin oder Nikotin, bindet. Dadurch kommt es zu einer Leitung von Natrium-, Kalium- und Kalziumionen durch die Membran und anschließend wieder zu einem Schließen des Kanals. Noch während der Anwesenheit des Agonisten am Rezeptor kann der Kanal bereits wieder schließen, ein Prozess, den man als Desensibilisierung bezeichnet. Die Mechanismen, die den Schritten des Öffnens und Schließens unterliegen, sind noch nicht komplett verstanden. Jedoch haben Studien der letzten Jahre zu wichtigen Erkenntnissen über die Struktur und Funktion von nAChRs geführt (Albuquerque et al. 1997; Dani and Mayer 1995; Galzi and Changeux 1995; McGehee and Role 1995; Role and Berg 1996; Wonnacott 1997). Schon 1965 wurde von Wymann, Monod und Changeux die Möglichkeit der Stabilisierung eines Proteins in einer bestimmten Konformation beschrieben (Monod et al. 1965). Seitdem gibt es verschiedene Wahrscheinlichkeitsmodelle, die den Übergang eines Kanals von dem offenen in den geschlossenen bzw. desensibilisierten Zustand beschreiben.

Ein Modell (Abb. 2.4) geht davon aus, dass der Rezeptor im geschlossenen Zustand (R) zwei gleichermaßen affine Acetylcholinbindungsstellen aufweist. Die Bindung der Acetylcholinmoleküle erfolgt dabei in separaten Schritten und jede Bindung erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der Rezeptor in den geöffneten Zustand (R^*) übergeht. So wird davon ausgegangen, dass nach Belegung der ersten Bindungsstelle des Rezeptors dieser positiv kooperativ für die Bindung eines weiteren Acetylcholinmoleküls ist. Neben dem geschlossenen und offenen Zustand gibt es aber noch verschiedene Zwischenzustände, deren Übergänge durch unterschiedliche Energiebarrieren gekennzeichnet sind und unterschiedliche Zeitkonstanten aufweisen. In ständiger Anwesenheit des Agonisten erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein Rezeptor in den desensibilisierten Zustand A_2R_D übergeht und nicht mehr leitet, wobei die Rückreaktion in den offenen Zustand wenige Millisekunden bis mehrere Minuten erfordern kann.

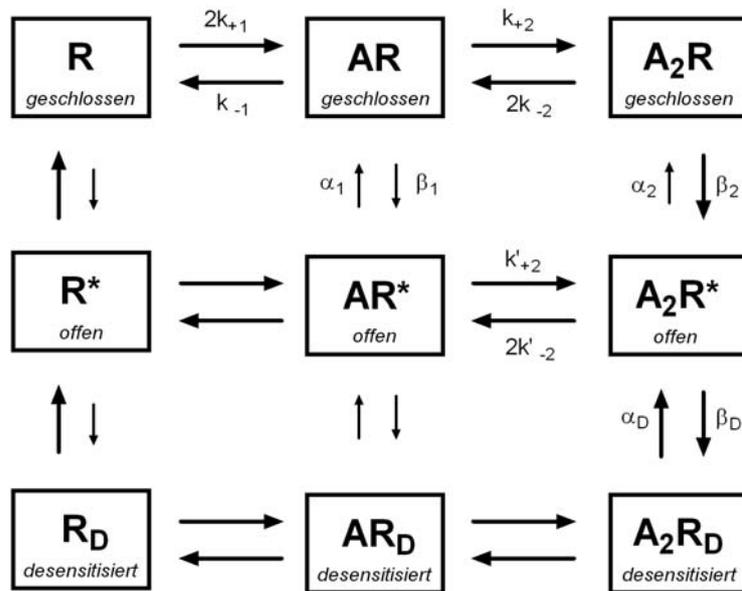


Abbildung 2.4.: Modell der nAChR-Aktivierung bei gleichwertigen ACh-Bindungsstellen (Abb. aus Hille 2001). Von links nach rechts sind die Ligandenbindungsstellen des Rezeptors unbesetzt, einfach besetzt und doppelt besetzt dargestellt. Von oben nach unten zeigt das Diagramm den Kanalrezeptor in einer geschlossenen (R), offenen (R*) und desensibilisierten (R_D) Konformation. Einige der Geschwindigkeitskonstanten (Ratenkonstanten) sind in der Grafik angegeben: k (für die Assoziation/Dissoziation), β (für das Öffnen) und α (für das Schließen). Die Größe der Pfeile stellt ein qualitatives Maß für die Wahrscheinlichkeit der Übergänge dar.

Die Rezeptoren befinden sich in einem ständigen Wechsel zwischen den oben genannten Zuständen und die Geschwindigkeitskonstanten dieser Zustandsänderungen hängen stark vom jeweiligen Subtyp des Rezeptors ab.

Sensorische Neurone, wie die Neurone der trigeminalen Ganglien (TriNs), exprimieren eine ganze Reihe von nikotinischen Rezeptorsubtypen. Neben den vorherrschenden Rezeptorkombinationen α4β2 und α3β4 wurden mRNAs für α2-, α5-, α7-, α9- und β3-Untereinheiten beschrieben (Dussor et al. 2003; Flores et al. 1996; Keiger and Walker 2000; Wada et al. 1989).

2.2.2.2. Kalziumpermeabilität von neuronalen nAChRs

Die Durchlässigkeit von nAChRs für Kalziumionen (Ca²⁺) spielt eine wichtige physiologische Rolle (Dani 2001; MacDermott et al. 1999; Vizi and Lendvai 1999; Wonnacott et al. 2006). Neuronale nAChRs zeigen eine signifikante und subtypabhängige Permeabilität für Kalziumionen (Adams and Nutter 1992; Castro and Albuquerque 1995), deren

Aktivierung einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Folge hat. Der Einstrom von Kalziumionen in die Zelle und die daraus resultierende Depolarisation der Zellmembran können zusätzlich spannungsabhängige Kalziumkanäle aktivieren (Dajas-Bailador et al. 2002; Rathouz and Berg 1994) und zur Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern führen. Auf diese Weise können anhaltende Kalziumsignale ausgelöst werden (Beker et al. 2003; Brain et al. 2001; Dajas-Bailador et al. 2002; Shoop et al. 2001).

Die Komplexität der Rezeptortypen wird am Aufbau des $\alpha 7$ -Rezeptors deutlich, bei dem bereits kleine strukturelle Veränderungen mit Änderungen der Kalziumpermeabilität einhergehen. Das Arrangement der geladenen Seitenketten der inneren Öffnung der Pore und die polaren Reste am äußeren Rand der Kanäle spielen eine entscheidende Rolle. Ersetzt man die Glutamatseitenkette der inneren Öffnung des $\alpha 7$ -Rezeptors durch eine neutrale Alaninseitenkette, wird die Kalziumpermeabilität des Kanals stark unterdrückt (Smit et al. 2001). Die Substitution des $\alpha 7$ -Leucins am synaptischen extrazellulären Ende (Position 254 oder 255) der Pore durch Threonin verändert die Permeabilität der Rezeptoren ebenfalls deutlich. Dagegen hat der Austausch von Leucin durch Threonin an einem anderen polaren Ring der Pore (Position 247 bei $\alpha 7$ -Rezeptoren von Küken) keinen Einfluss auf den Fluss der divalenten Kationen. Jedoch verändern sich die Affinität für ACh und die Desensibilisierungskinetiken des Rezeptors (Bertrand et al. 1993a; Revah et al. 1991).

Solche Untersuchungen verdeutlichen die Wichtigkeit der teilweise stark konservierten Aminosäurestrukturen und die komplexe Beziehung zwischen der Struktur der Pore und der daraus resultierenden Funktion.

2.3. Modulation von nAChRs

Neuronale Erregbarkeit kann durch eine Vielzahl von Einflüssen auf den Rezeptorkanal-komplex reguliert werden. Dabei können Neuromodulatoren, Hormone oder Enzyme zu Änderungen der Leitfähigkeiten, der Öffnungszeiten, der Desensibilisierungsraten, der Ligandenaffinitäten oder der Ionenselektivität des Rezeptors führen.

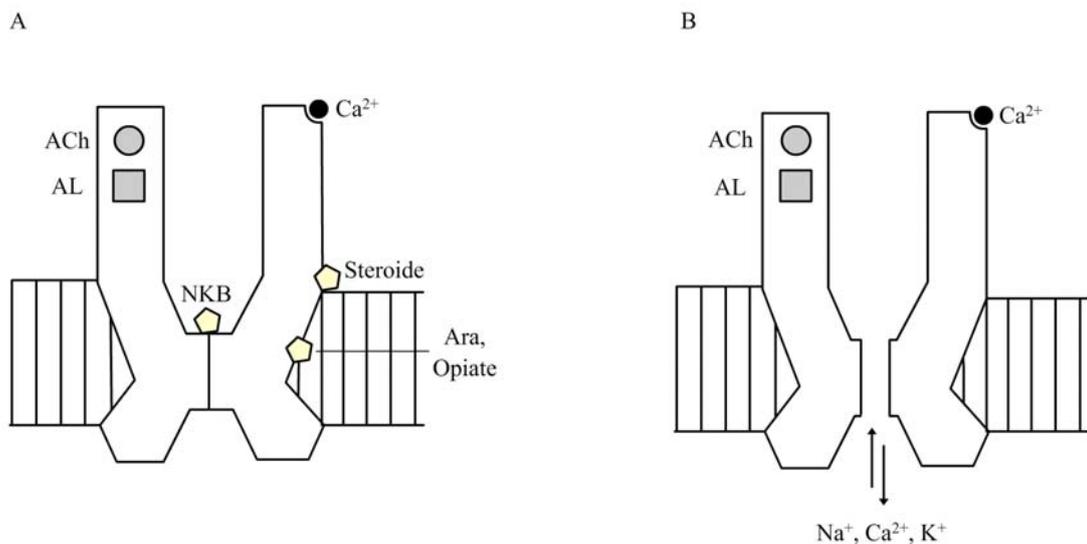


Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung der Regulation eines nAChR durch verschiedene Liganden. Der nAChR ist ein ligandengesteuerter unspezifischer Kationenkanal. Er hat Bindungsstellen für Agonisten, wie Acetylcholin (ACh), allosterische Liganden (AL), nichtkompetitive Blocker (NKB), Steroide und Opiate oder Arachidonsäure (Ara), sowie extrazelluläre Kalziumionen. (Abbildung verändert nach Galzi and Changeux 1995).

A) zeigt den Kanal im geschlossenen und B) im geöffneten Zustand.

Kompetitive Antagonisten, wie z.B. Methyllycaconitin (MLA) aus dem Rittersporn *Consolida sp.*, konkurrieren mit den Agonisten um die gleiche Bindungsstelle und inaktivieren auf diese Weise den Rezeptor.

Direkte Kanalblocker, wie Lokalanästhetika, dringen direkt in den aktivierten nAChR-Kanal ein (Neher and Steinbach 1978), wo sie mit den Aminosäuren der M2-Region in Wechselwirkung treten (Giraudat et al. 1987; Hucho 1986). Infolgedessen wird der Rezeptor aufgrund einer sterischen Blockade des Rezeptorkanals durch den gebundenen Liganden inhibiert.

Andere nichtkompetitive Antagonisten, wie z.B. Steroide und die Arachidonsäure, inaktivieren den Rezeptor, indem sie im Grenzbereich zwischen Rezeptorprotein und Lipidmembran anlagern (Quik et al. 1996; Valera et al. 1992).

Eine weitere wichtige Möglichkeit der Modulation von nAChRs bilden allosterische Liganden. Sie binden in einiger Entfernung der Neurotransmitterbindungsstelle und können, z.B. durch Konformationsänderungen, die Funktion des Rezeptors modulieren (Changeux and Edelstein 2005). Allosterische Modulatoren, die die nAChR-Funktion potenzieren, nennt man positive Effektoren, solche, die inhibieren, bezeichnet man als negative Effektoren.

Neben der Modulation nikotinischer Rezeptoren durch allosterische Effektoren, wie divalente oder trivalente Kationen (Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}) (Hsiao et al. 2006; Hu et al. 2007; McLaughlin 2006) oder Hormone (Curtis et al. 2002; Im et al. 1990), wurden zudem kleine endogene Proteine mit einer Homologie zu α -Neurotoxinen identifiziert, die an nAChRs binden und ihre Aktivität modulieren (Hogg et al. 2005). Sequenzanalysen (Fleming et al. 1993), Tertiär- und Genstrukturanalysen (Gumley et al. 1995) brachten den Nachweis, dass sie eine Beziehung zu den Säugetiergenen der Familie Ly6 aufweisen. Diese Ly6-Gene kodieren primär akzessorische Oberflächenproteine, vorwiegend auf Zellen des Immunsystems.

2.3.1. Ly6-uPAR-Proteine als Modulatoren von nAChRs

Ly6-uPAR-Proteine sind meist verankerte Zelloberflächenproteine (Mallya et al. 2006). Dem endogenen allosterischen Modulator Lynx1 wurde als erstes eine Beziehung zu der Familie der Ly6-uPAR-Proteine nachgewiesen (Miwa et al. 1999). Dieses Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-verankerte Protein Lynx1 verändert die Ionenpermeabilität und das Desensitierungsverhalten von $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs (Ibanez-Tallon et al. 2002; Miwa et al. 1999). Die Lynx1-Knockout-Maus zeigt eine verstärkte Bindungsaffinität der nAChRs für Nikotin und eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit dieser Rezeptoren (Miwa et al. 2006).

Die Sekretionsproteine Slurp1 und Slurp2 regulieren als weitere Mitglieder der Ly6-uPAR-Familie in der Epidermis Keratinocytenfunktionen über die Aktivierung von nikotinischen AChRs (Arredondo et al. 2005, 2006). Sie verfügen aber im Gegensatz zu Lynx1 über keinen GPI-Anker (Adermann et al. 1999; Tsuji et al. 2003). Mutationen des menschlichen Slurp1-Gens führen zur „Mal de Meleda“, einer autosomal rezessiven Hautkrankheit (Chimienti et al. 2003).

Das Protein Lypd6 (Ly6-Plaur-Domäne6) wurde 2007 als ein weiteres Mitglied der uPAR/Ly6-Proteinfamilie klassifiziert. Homologieanalysen und Auswertungen der Expressionsprofile von 90 hypothetischen Neuropeptiden führten zu der Identifizierung des Proteins. Die Funktion von Lypd6 wurde in vivo durch die Erzeugung transgener Mauslinien analysiert (Darvas 2007).

2.4. Verhaltensphysiologische Funktionsanalyse von *Lypd6* in transgenen Tieren

Lypd6 zeigt eine mäßig starke Homologie zu den endogenen Modulatoren nikotinerger Acetylcholinrezeptoren *Lynx1* und *Slurp1* (Darvas 2007).

Die Expression von *Lypd6* im adulten Nervensystem erstreckt sich auf die Hinterwurzelganglien, die trigeminalen Ganglien, das Rückenmark, den cerebralen Cortex und wenige weitere Kerngebiete (Abb. 2.6). Das Expressionsmuster von *Lypd6* erinnert stark an das von *Lynx1* und platziert *Lypd6* damit zu großen Teilen im cholinergen Projektionsystem. Eine detailliertere Beschreibung der hier dargestellten Ergebnisse findet sich in Darvas 2007.

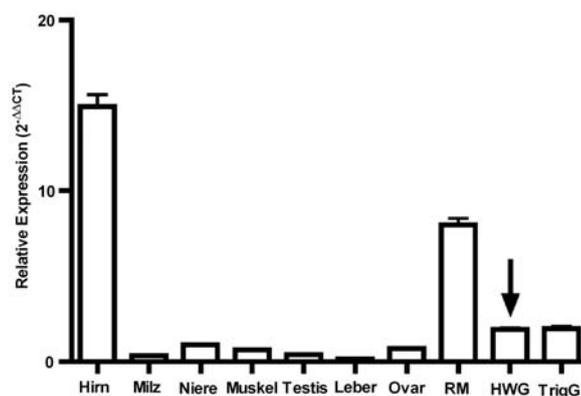


Abbildung 2.6.: Quantifizierung der Expression des *Lypd6*-Gens in Organen von adulten Mäusen. Quantitative Analyse der Gesamt-RNA aus Gehirn, Milz, Niere, Skelettmuskulatur, Testis, Leber, Ovar, Rückenmark (RM), Hinterwurzelganglien (HWG), Trigeminalganglien (TrigG) durch Real-Time-PCR mit spezifischen Primern für *Lypd6* und TBP (TATA-Binding-Protein, interne Kontrolle). Die Messwerte wurden auf die Expression von TBP hin standardisiert. Es wurden Organe von fünf Tieren verwendet ($n = 5$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der relativen Expression von *Lypd6* nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Alle Expressionsdaten sind auf die ΔCT -Werte der *Lypd6*-Expression in den HWG normalisiert. Mit einem Pfeil hervorgehoben ist das Referenzorgan für die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Bestimmung der Expressionsdaten (Abb. verändert nach Darvas 2007).

Zur Analyse der Funktion von *Lypd6* wurde das Gen in Neuronen transgener Mauslinien überexprimiert (Abb. 2.7). Hier zeigte sich bei der Verhaltensanalyse eine signifikante Steigerung von neuigkeitsinduzierter Lokomotion im Offenfeld und im Y-Labyrinth. Auch konnte eine leicht gesteigerte Präpulsinhibition durch die Überexpression von *Lypd6* nachgewiesen werden. Des Weiteren führte die Überexpression zu einer verringerten Sensitivität auf viszerale Schmerzreize im Writhing-Test.

2. Einleitung

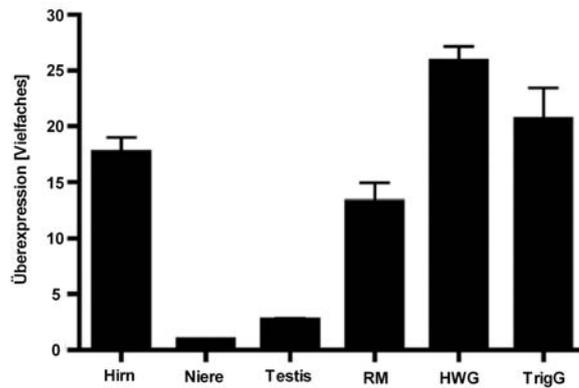


Abbildung 2.7.: Lypd6-Überexpression in transgenen Tieren der Mauslinie FVB/N. Quantitative Analyse der Gesamt-RNA aus Hinterwurzelganglien (HWG) und Trigeminalganglien (TrigG) von transgenen und Wildtyp-Tieren durch Real-Time-PCR mit spezifischen Primern für Lypd6 und TBP (TATA-Binding-Protein, interne Kontrolle). Die Messwerte wurden auf die Expression von TBP hin standardisiert. Es wurden Präparationen von je vier Tieren verwendet ($n = 4$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der relativen Expression von Lypd6. Die relative Expression wurde als Vielfaches der Expression in den Wildtyp-Hinterwurzelganglien berechnet. (Abb. verändert nach Darvas 2007).

Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zeigten zudem einen deutlichen Zusammenhang zwischen gesteigerter Sensitivität auf die analgetische Wirkung von Nikotin und der Expression von Lypd6 (Abb.2.8).

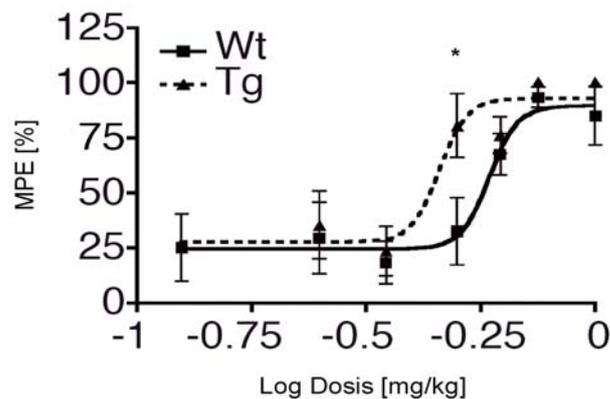


Abbildung 2.8.: Nozizeptive Reaktionen im Tail-flick-Test nach akuter Injektion von Nikotin (0.125, 0.25, 0.35, 0.5, 0.625, 0.75 sowie 1 mg/kg s.c.) bei Wildtyp-Tieren (durchgezogene Linie) und transgenen Tieren (gestrichelte Linie). Dosiswirkung nach 5 Minuten als logarithmische Darstellung der Dosen und sigmoide Kurvenanpassung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) der Latenz. $MPE \% = 100 \times (\text{Gemessene Latenz} - \text{Kontrolllatenz}) / (\text{Cutoff Zeit} - \text{Kontrolllatenz})$.

* $p < 0,05$ für den two-way ANOVA-Test. (Abb. verändert nach Darvas 2007).

2.5. Ziele der Arbeit

Aufbauend auf den Verhaltensuntersuchungen wird in dieser Arbeit untersucht, ob Lypd6 ebenfalls ein Modulator nikotinischer Acetylcholinrezeptoren ist.

Aufgrund der vielfach erhöhten Expression von Lypd6 in trigeminalen Neuronen von transgenen Tieren wurden diese als Ziel der Untersuchung ausgewählt und Zellkulturen dieser akut dissoziierten Neurone angelegt.

Vergleichende elektrophysiologische Whole-Cell-Patch-Clamp-, mikrofluorometrische und pharmakologische Untersuchungen wurden durchgeführt, um nikotininduzierte Ströme durch nikotinische Acetylcholinrezeptoren in Wildtyp- und transgenen Tieren zu analysieren.

3. Material & Methoden

3.1. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurde der Mausstamm FVB/N (inbred) von der Firma Charles River verwendet.

Die transgenen Mauslinien dieses Stammes wurden im Haus für Experimentelle Therapie (HET, Universitätsklinikum Bonn) durch die Arbeitsgruppe von Prof. A. Zimmer hergestellt. Der Genotyp der Mäuse wurde durch Southern-Blot verifiziert (Darvas 2007).

3.2. Herstellung trigeminaler Neurone

3.2.1. Präparation der trigeminalen Ganglien

Zur Gewinnung trigeminaler Neurone (TriNs) wurden 20 - 40 Tage alte Mäuse (post partum) verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert und nach Entfernen der Kopfhaut wurde die Schädelkapsel dorsal, von rostral nach caudal, entlang der Sutura sagittalis mit einer feinen Schere durchtrennt. An den Enden des Schnittes wurde die Schädelkapsel mit jeweils zwei Schnitten orthogonal zur Sutura sagittalis entlang der Sutura lambdoidea und der Sutura coronalis eingeschnitten, so dass die Schädelkapsel (Os parietalia, ein Teil des Os frontale und des Os interparietale) großräumig weggeklappt werden konnte. Daraufhin wurde das Gehirn entfernt um Zugang zu den trigeminalen Ganglien zu ermöglichen. Unter Verwendung eines Binokulars (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die Verbindungen zu den beiden Ganglien mithilfe einer Schere an den maxillaren und mandibularen Ästen durchtrennt. Auf diese Weise ließen sich die Ganglien vorsichtig aus dem Bindegewebe lösen und in ein Verdaugefäß von 35 mm Durchmesser (Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA) mit 2 ml artifizieller Cerebrospinallösung (ACSF, siehe Tabelle 3.1, Lösung 1) überführen.

3.2.2. Enzymatischer Verdau der trigeminalen Ganglien

Vor dem enzymatischen Verdau wurden die Ganglien mithilfe der Schere mechanisch zerkleinert. Zum Verdau wurden Collagenase 1A (0,07 %), Trypsin (0,02 %) und DNase (0,001 %) verwendet. Danach wurden die Ganglien in einer 35 mm breiten Schale für ca. 20 min in ein Schüttelbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) gestellt, um die Enzymaktivität am Gewebe zu maximieren. Der Verdau erfolgte bei einer Temperatur von 35 °C und wurde durch die Zugabe von DMEM-F12 (1:1)-Medium (zzgl. 10 % FBS, 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin) gestoppt.

3.2.3. Mechanische Dissoziation der Neurone

Nach Überführung der Gewebestücke in ein Falkonröhrchen (15 ml, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland) und weiterer Zugabe von 8 ml DMEM-F12 wurden die Gewebestücke mithilfe von feuerpolierten Glaspipetten (Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland) unter einer Sterilbank (Laminar Flow Wekbank, Kojair Tech Oy, Vilpula, Finnland) mechanisch dissoziiert. Durch wiederholtes Aufsaugen der Zellsuspension in die Glaspipetten wurden die Zellen aus dem Gewebe gelöst. Dieser Vorgang wurde mit drei feuerpolierten Triturationspipetten (Öffnungsdurchmesser 0,05 - 0,5 mm) wiederholt bis sich eine homogene, milchige Zellsuspension eingestellt hat. Die Vereinzelung der Ganglienzellen aus dem Gewebe wurde unter einem Mikroskop optisch kontrolliert.

3.2.4. Aufreinigung der Zellsuspension

Die Zellsuspension wurde durch einen Filter von 100 µm Porengröße gespült, um Bindegewebsreste und Verunreinigungen herauszufiltern. Die filtrierte Suspension wurde anschließend bei 1000 U/min für 4 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurden erneut 5 ml DMEM-F12 zum Zellpellet hinzugegeben und der Zentrifugationsvorgang wiederholt. Nach diesen Schritten wurden 320 µl frisches DMEM-F12 auf das Zellpellet gegeben, um die Suspension schließlich auf bis zu acht mit poly-L-Lysin beschichtete Coverslips (Durchmesser 6 mm, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland) á 40 µl zu pipettieren. Je vier der Coverslips wurden in einer 35 mm breiten Schale aufbewahrt. Vor dem Ausplattieren wurden die Neurone unter einem Binokular (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) optisch kontrolliert. Die Coverslips wurden anschließend

in einen Brutschrank (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland) mit 35 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre überführt. Nach ca. 30 minütiger Absetzzeit wurden jeweils zwei Milliliter DMEM-F12 zu den Coverslips hinzugegeben. Die Coverslips mit den ausplattierten Ganglienzellen wurden nach ca. 60 Minuten Inkubationszeit für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet. Alle Patch-Clamp-Messungen erfolgten an Zellen, die nicht länger als 24 Stunden in Kultur gehalten wurden. Für die Kalzium-Mikrofluorometrie wurden die Zellen zum Teil bis zu 72 Stunden in Kultur gehalten, wobei alle 24 Stunden das Medium gewechselt wurde.

3.3. Lösungen

Die extrazellulären Lösungen wurden täglich frisch hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit HCl bzw. den entsprechenden Hydroxidionen auf 7,35 eingestellt (siehe Tabelle 3.1). Die Osmolalität der Lösungen (zwischen 300 und 320 mmol/kg) wurde mithilfe eines Osmometers (Vapro 5520, Wescor Inc, Logan, Utah, USA) kontrolliert.

Die Intrazellulärlösungen wurden nach Kontrolle des pH-Wertes (7,35) und der Osmolalität (305 - 320 mmol/kg) aliquotiert und bei -18 °C eingefroren.

3.3.1. Extrazellulärlösungen

Tabelle 3.1.: Ionenzusammensetzungen der Extrazellulärlösungen zur Ableitung der Ströme (in mM)

	ACSF	MMR (Mam- mali- an Rin- ger)	Ca- Lsg	Na- Lsg	K-Lsg	MMR [Ima- ging]	MMR 20 mM KCl	MMR 30 mM KCl
NaCl	124	145		120		145	145	145
KCl	2,5	2,5				2,5	20	30
NaHCO ₃	26							
NaH ₂ PO ₄	1							
MgSO ₄	1,3							
CaCl ₂		2	2			10	10	10
CholineCl ₂			120		135			
CdCl					0,03	0 bzw. 0,1	0 bzw. 0,1	0 bzw. 0,1
MgCl ₂		1,3	1	1	1	1,3	1,3	1,3
4-Amino- Pyridine			4	4				
TEA- Hydroxid			20	20				
HEPES		10	10	10	10	10	10	10
Glucose	10	20	10	10	15	20	20	20
pH	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
eingestellt mit	Carbo- gen, HCl / NaOH	HCl / NaOH	HCl / TEA- OH	HCl / NaOH	HCl / KOH	HCl / NaOH	HCl / NaOH	HCl / NaOH
Verwen- dung	(1) Präpa- ration	(2) Mes- sung Ge- samt- zellströ- me	(3) Mes- sung Kal- zium- ströme	(4) Mes- sung Na- trium- ströme	(5) Mes- sung Kalium- ströme	(6) Ima- ging	(7) Ima- ging	(8) Ima- ging

3.3.2. Intrazellulärlösungen

Tabelle 3.2.: Ionenzusammensetzungen der Intrazellulärlösungen zur Ableitung der Ströme (in mM)

	Standard	Ca-Int	Na-Int	K-Int
NaCl	10			10
KCl	130			130
EGTA	10			10
CsCl		140	140	
MgCl ₂	5	1	1	
CaCl ₂				1
NaATP		2	2	2
GTP		0,05	0,05	0,1
BAPTA		10		
HEPES	10	20	20	10
pH	7,5	7,5	7,5	7,5
eingestellt mit	HCl / NaOH	HCl / MgOH	HCl / MgOH	HCl / KOH
Verwendung	(1) Messung Gesamtzell- ströme	(2) Messung Kalzium- ströme	(3) Messung Natrium- ströme	(4) Messung Kaliumströme

3.4. Elektrophysiologie

3.4.1. Voltage-Clamp-Technik

Mithilfe der Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Technik), die bereits in den dreißiger Jahren durch K. S. Cole und H. J. Curtis angewandt wurde, kann das Membranpotential einer Zelle experimentell auf einen definierten Wert festgelegt werden (Cole and Curtis 1938; Hamill et al. 1981). Um Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern, wird nach Auftreten eines Membranstroms ein Strom in die Zelle injiziert, der dem Membranstrom entgegengerichtet ist. Dieser vom Verstärker durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus erzeugte Ausgleichstrom kann gemessen werden (vergleiche Abb. 3.1) und lässt unmittelbar Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit

der Membran zu. Diese Leitfähigkeit wird von Ionenkanälen und Iontentransportern in der Membran bestimmt.

3.4.2. Patch-Clamp-Technik

Aufbauend auf der Voltage-Clamp-Technik wurde die Patch-Clamp-Technik entwickelt, die heute eine Standardmethode der elektrophysiologischen und pharmakologischen Forschung ist (Hamill et al. 1981; Neher and Sakmann 1976; Neher et al. 1978; Sigworth and Neher 1980). Sie ist die wohl wichtigste Messmethode zur Untersuchung von Ionenkanälen in biologischen Membranen. Mithilfe dieser Technik können sowohl Gesamtzellströme als auch Ströme durch Einzelkanäle gemessen werden (Abb. 3.1).

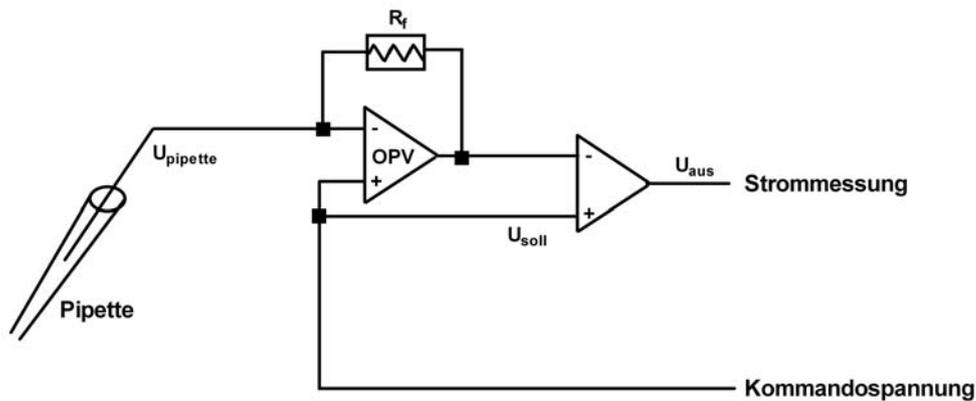


Abbildung 3.1.: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers. Abkürzungserklärung: OPV: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, $U_{pipette}$: Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung (Abb. verändert nach Numberger und Draguhn 1996).

3.4.3. Patch-Clamp-Konfigurationen

Nach Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran und Anlegen eines leichten Unterdrucks kommt es zu einem engen Kontakt zwischen Elektrodenglas und Zellmembran, bei dem der Abdichtwiderstand maximiert wird. Der elektrische Widerstand kann einige Giga-Ohm ($G\Omega$) erreichen und dieser feste Kontakt wird als Giga-Seal bezeichnet. In dieser sog. Cell-Attached-Konfiguration kann der Fluss durch einzelne Ionenkanäle, die in dem isolierten Membranstück liegen, gemessen werden. Durchbricht man das Membranstück unter der Pipette durch einen kurzzeitigen Unterdruck in der Pipette,

entsteht ein niederohmiger, offener Zugang zum Zytoplasma der Zelle. Man erhält die sog. Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzellkonfiguration), in der der Stromfluss über die gesamte Membranfläche einer Zelle gemessen werden kann.

Durch unterschiedliche Manipulationen ist es möglich, weitere Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik anzuwenden (Detaillierte Darstellung in Abb. 3.2).

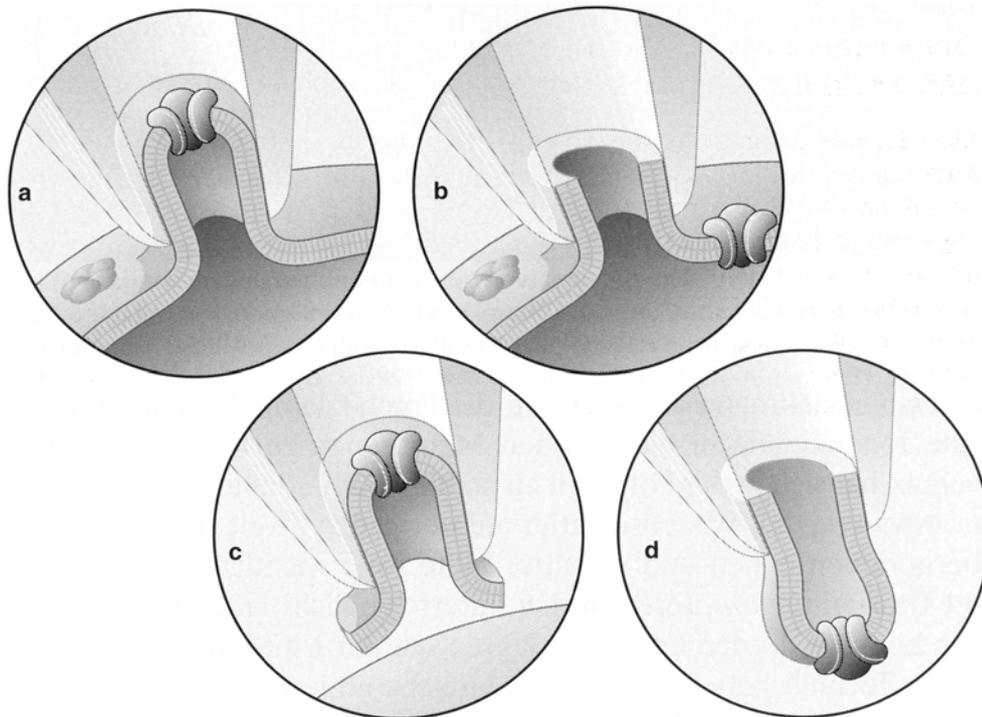


Abbildung 3.2.: Die Abbildung zeigt die vier wichtigsten Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik (Abb. aus Numberger und Draguhn 1996).

Man unterscheidet zwischen a) der Cell-Attached-Konfiguration (Aufsetzen der Pipette auf die Zellmembran), b) der Whole-Cell-Konfiguration (Durchbrechen des Membranflecks durch Anlegen eines Unterdrucks), c) der Inside-Out-Konfiguration (Umdrehen der ursprünglich zytoplasmatischen Seite zur Badlösung) und d) der Outside-Out-Konfiguration (Umdrehen der ursprünglich extrazellulären Seite zur Badlösung).

In der Whole-Cell-Konfiguration wird das Zytoplasma allmählich gegen die Intrazellulärlösung der Patchpipette ausgetauscht. Dies ermöglicht, die Zelle mit Lösungen definierter Zusammensetzungen und bestimmten Wirkstoffen zu dialysieren.

3.5. Messplatz mit Applikationssystem

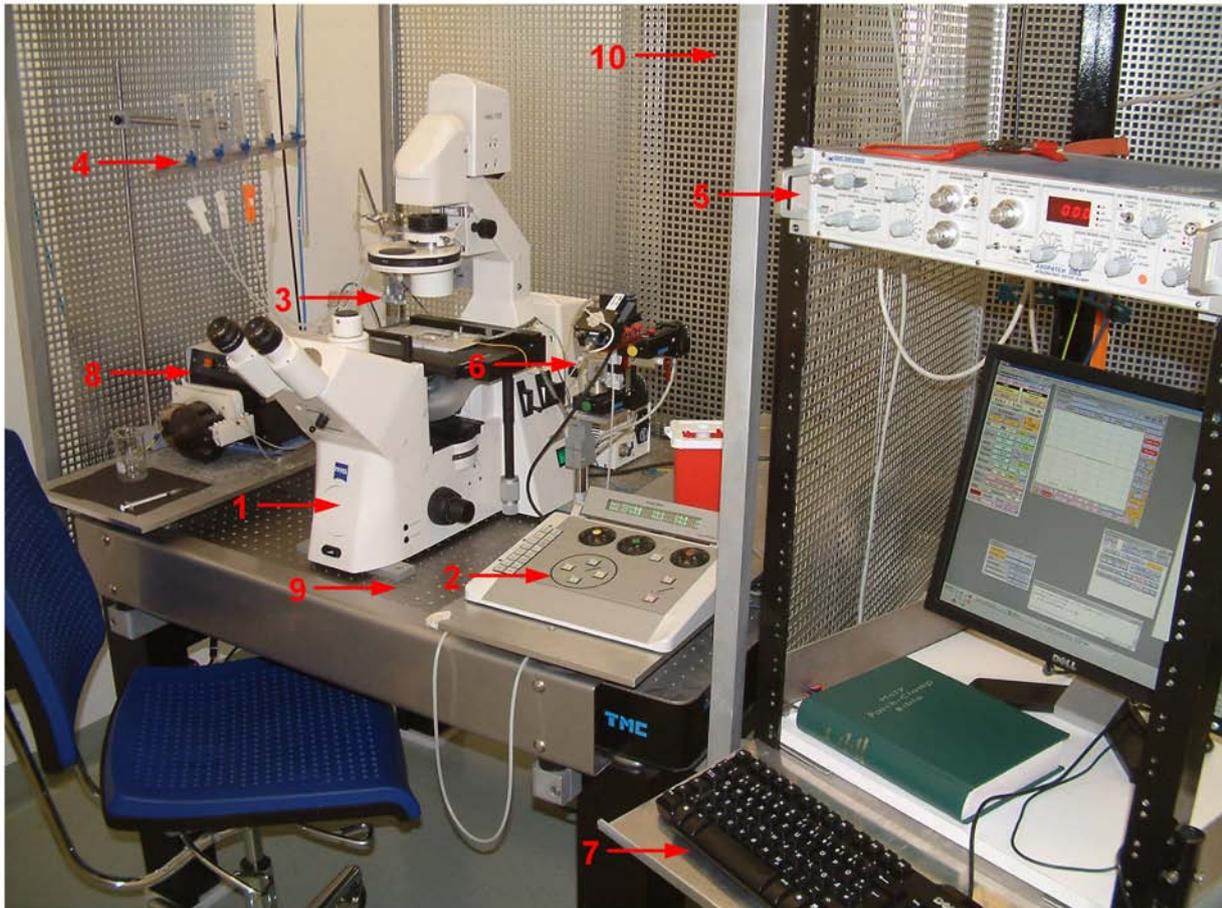


Abbildung 3.3.: Die Abbildung zeigt den Aufbau des Patch-Clamp-Setups mit folgenden Komponenten:

1) Mikroskop, 2) Mikromanipulator zur Positionierung der Patchpipette, 3) Mikromanipulator zur Positionierung der Applikationsspitze, 4) Schwerkraft-Applikationssystem, 5) Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch 200A), 6) Pipettenhalter und Vorverstärker, 7) Computersystem zur Datenerfassung, 8) Kreiselpumpe, 9) Schwingungsgedämpfter Tisch, 10) Faraday-Käfig.

3.5.1. Messplatz

In den vorliegenden Patch-Clamp-Experimenten wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, Abb. 3.3 Nr. 1) verwendet, das auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Technical Manufacturing Co., MA, USA, Abb. 3.3 Nr. 9) aufgestellt wurde. Zudem befanden sich auf dem Tisch die Messkammer, eine Kreiselpumpe (Abb. 3.3 Nr. 8), das Applikationssystem (Abb. 3.3 Nr. 4) sowie Pipettenhalter mit

Vorverstärker (Abb. 3.3 Nr. 6). Zur elektrischen Abschirmung des Messstands wurde ein Faraday-Käfig (Eigenbau Physiologie II, Universität Bonn, Abb. 3.3 Nr. 10) verwendet. Der Faraday-Käfig ermöglicht es, die winzigen Zellsignale vom elektrischen Hintergrundrauschen, welches u.a. durch das sog. Netzbrummen (elektromagnetisches Wechselfeld des Spannungsnetzes) entsteht, herauszufiltern und somit das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren.

3.5.2. Manipulatoren und Patchpipetten

Zur Positionierung der Applikationspipette wurde ein mechanischer Mikromanipulator (Eigenbau Physiologie II, Universität Bonn, Abb. 3.3 Nr. 3) verwendet. Zur mikrometergenauen Positionierung der Patchpipette kam ein elektrischer Mikromanipulator (Luigs und Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland, Abb. 3.3 Nr. 2) zum Einsatz. Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Kimble Products, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland) mit einem programmierbaren horizontalen Puller (Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, Augsburg, Deutschland) gefertigt und poliert. Die dabei entstandenen Pipetten wurden mit interner Lösung (siehe Tabelle 3.2, Lösungen 1 - 4) befüllt und hatten einen Widerstand zwischen 1,5 und 3,5 M Ω . Sie wurden in den Pipettenhalter eingesetzt, der wiederum direkt am Vorverstärker befestigt war.

3.5.3. Applikations-Perfusions-System

Die Perfusion der Zellen (Abb. 3.4) mit Extrazellulärlösung wurde durch eine Kreiselpumpe (Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland, Abb. 3.3 Nr. 8) auf eine Flussrate von ca. 4 ml/min durch die Badkammer eingestellt.

Für die Analyse der nikotinischen Komponenten der Zellen kamen zwei Applikationssysteme zum Einsatz. Zum Einen wurde ein Druckapplikationssystem (DAD-VM-8SP Superfusion System, ALA Scientific Instruments, NY, USA) eingesetzt, bei dem mittels Druck (40-50 kPa) die zu applizierende Substanz in geringen Mengen direkt fokal an die Zelle appliziert werden konnte (Durchmesser Applikationsspitze 100 μ m). Über einen Computer (Toshiba Satellite, Neuss, Deutschland) konnten die Magnetventile des DAD-Systems zeitlich genau angesteuert werden.

Zum Anderen kam ein Schwerkraft-Applikationssystem mit einem Verteiler (ALA Scientific Instruments, NY, USA) zum Einsatz (siehe Abb. 3.4). Die Steuerung der Applikation

3. Material & Methoden

erfolgte manuell über Dreiwegehähne. Die Zellen wurden bei diesem System mit größeren Volumina der zu applizierenden Substanz (ca. 80 $\mu\text{l/s}$, Durchmesser Applikationsspitze 500 μm , ALA Scientific Instruments, NY, USA) umspült.

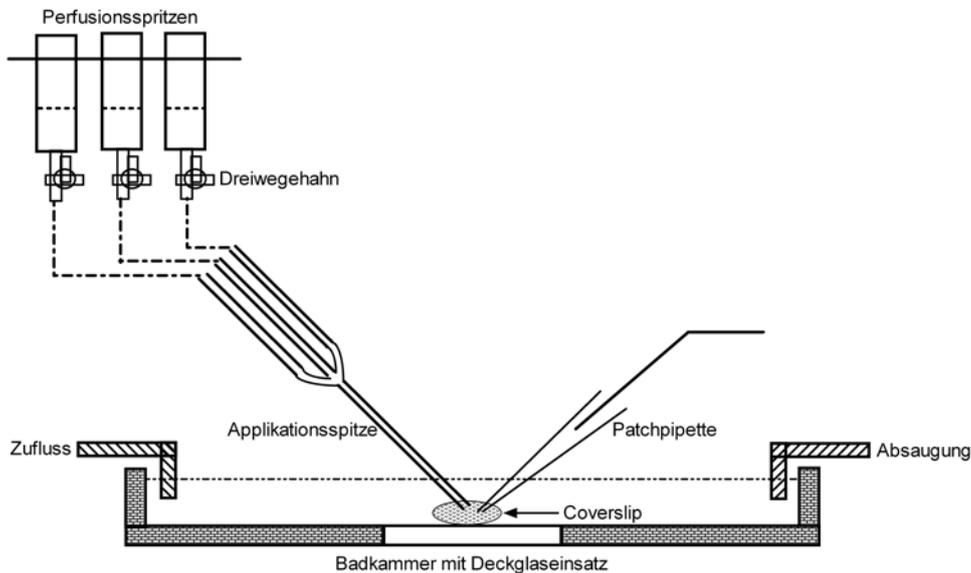


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der Badkammer und des Schwerkraft-Applikationssystems. Als Messkammer diente eine Plexiglaskammer, bei der ein Deckglas als Boden eingesetzt wurde. Zu- und Ablauf konnten durch Höhenverstellungen reguliert werden. Applikationsspitze und Pipettenspitze konnten über Manipulatoren mikrometergenau positioniert werden.

3.5.4. Patch-Clamp-Verstärker und Vorverstärker

Der Vorverstärker (Abb. 3.3 Nr. 6) misst das eingehende Stromsignal und liest es als Spannung aus, welche vom Hauptverstärker (Abb. 3.3 Nr. 5) verstärkt wird. Als Hauptverstärker dienten der Axopatch 200A (Axon Instruments, Kalifornien, USA, Abb. 3.3 Nr. 6) sowie der EPC10 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland). Über einen angelegten Rechteckimpuls (5 mV, 5 ms) wurde vor und während der Patch-Clamp-Ableitung der Widerstand der Messanordnung in der Badlösung bestimmt. Nach Ausgleich des Stroms zwischen Pipetten- und Badelektrode, dem sog. Pipetten-Offset, wurde die Pipette unter optischer Kontrolle (40fache Vergrößerung) auf die Zellmembran aufgesetzt und der Giga-Seal etabliert. Danach konnte der Whole-Cell-Modus eingeleitet werden.

Bei Spannungsänderungen entstehen durch den Umladeprozess der Zellmembran relativ

große kapazitive Ströme, die durch entsprechende kompensatorische Einstellungen des Verstärkers ausgeglichen werden konnten. Zudem konnte an den Verstärkern der Serienwiderstand, die Gesamtsumme der Widerstände der Aufzeichnungskomponenten, kompensiert und somit Rückschlüsse auf die Zugangsbedingungen zur untersuchten Zelle gezogen werden.

3.5.5. Zellstimulation

Stimulationsmuster, wie Spannungsrampen, wurden computergesteuert (Optiplex 745, Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) über einen DA-Wandler (ITC-16 AD/DA interface, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) an den Axopatch-Verstärker geleitet. Bei dem Heka-EPC10-Verstärker erfolgte dies softwaregesteuert (Pulse, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) über einen integrierten DA-Wandler.

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Zellen auf einem Potential von -60 mV gehalten und nach Überprüfung der Zugangsbedingungen eine sog. Rampe initiiert. Darunter ist eine kontinuierliche Spannungsänderung von -60 mV auf +100 mV innerhalb von 150 ms zu verstehen, mit der man Ströme über die Zellmembran aktivieren kann.

Agonisten/Antagonisten-Applikationen wurden von Applikationen mit externer Lösung (ES, siehe Tabelle 3.1, Lösungen 2 - 5) eingebettet, um Druckartefakte auszuschließen. Der Agonistenapplikation wurden ohne zeitliche Verzögerung ES-Applikationen von 1 s Dauer vor- bzw. nachappliziert.

Zwischen zwei Agonistenapplikationen wurde ein zeitlicher Abstand von mind. zwei Minuten eingehalten, um zu gewährleisten, dass die Rezeptoren vollständig reaktiviert waren. Die Applikationen erfolgten in randomisierter Reihenfolge.

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (19 - 21 °C klimatisiert) durchgeführt.

3.5.6. Datenerfassung

Die experimentellen Daten, die den Verstärker bei den Messungen analog verlassen, wurden über einen AD/DA-Wandler (beim Axopatch 200A: ITC-16 AD/DA interface, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland; beim EPC10 im Verstärker integriert) digitalisiert und auf der Festplatte des Computers (Optiplex 745, Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland, Abb. 3.3 Nr. 7) gespeichert. Zur Erfassung dieser Daten

wurde das Programm Pulse (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) auf dem PC (oben genanntes Modell) verwendet. Die Daten wurden mit einer Samplingrate von 5 kHz (200 μ s) aufgezeichnet.

Die Auswertung der Daten, z.B. Amplitudenmessungen, Amplitudenhistogramme und Kurvenanpassungen, wurde mit PulseFit (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland), Igor (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) und Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit erfolgte über die Programme Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA), Microsoft Excel und Powerpoint (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

Wenn nicht anders bezeichnet, sind die Werte als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben und mit den entsprechenden Fehlerbalken in den Abbildungen dargestellt. Jedes „n“ entspricht einer neuen Zelle, wobei die Anzahl der verwendeten Tiere für die einzelnen Untersuchungen jeweils ≥ 4 war.

3.6. Kalzium-Mikrofluorometrie (Imaging)

3.6.1. Fura-2-AM / Fura-2

Für die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration stehen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (Fura-2, Fluo-3 u.a.) zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 in seiner veresterten Form Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxy-Methylester) verwendet. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen polyzyklischen Komplexbildner für zweiwertige Kationen, der an ein Chromophor gekoppelt ist. Fura-2 ist ein Derivat des Kalziumchelators BAPTA (1,2-bis-Aminophenoxytetraessigsäure), dessen Anregungsspektrum sich mit der Kalziumkonzentration verändert (siehe Abb. 3.5).

Hiermit ist es möglich, intrazelluläre Kalziumänderungen direkt und in hoher zeitlicher Auflösung zu messen. Fura-2 bindet sehr spezifisch an intrazelluläres Kalzium und ist ein

weiterentwickelter Fluoreszenzfarbstoff. In seiner Esterform ist Fura-2-AM lipophil und damit membrangängig. Im Zytosol wird der Farbstoff Fura-2 dann durch unspezifische Esterasen freigesetzt. Das entstehende Spaltprodukt wird kalziumsensitiv und kann sich als freie Säure in der Zelle anreichern (Grynkiewicz et al. 1985).

Vorteile dieser Methode sind die minimalen Wechselwirkungen mit den zellulären Vorgängen, die gute Zellgängigkeit von Fura-2-AM, die non-invasive Messung der Kalziumkonzentrationen und die hohe Selektivität des Farbstoffes gegenüber anderen mono- und bivalenten Ionen.

Die Fluoreszenzintensität ist von der umgebenden Kalziumkonzentration abhängig. Das Maximum des Exzitationsspektrums liegt für die kalziumgebundene Form (Ca^{2+} -Fura-Komplex) bei $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$, für die kalziumfreie Form (Fura ungebunden) bei $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$. Die maximale Emission erfolgt in beiden Fällen bei $\lambda_E = 510 \text{ nm}$. Die Intensität des Fluoreszenzlichts wird bestimmt durch die Konzentration des Farbstoffes (c), die Dicke der Zelle (d) und eine Konstante (K), welche die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst. Letztere ist ebenfalls eine Funktion der Ca^{2+} -Konzentration $F_{[\text{Ca}^{2+}]}$: $F_{340} = c * d * K * F_{[\text{Ca}^{2+}]}$. Da aber weder c noch d noch K bekannt sind, ist es nicht möglich, die Ca^{2+} -Konzentration aus der Intensität des Fluoreszenzlichtes F_{340} zu berechnen. Hier hilft die Eigenschaft von Fura-2 auf Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration mit einem Anstieg von F_{340} und mit einem Abfall von F_{380} zu reagieren. Führt man zwei Fluoreszenzmessungen kurz hintereinander durch, und zwar zuerst mit einem Anregungslicht von 340 nm und danach bei 380 nm , kann man annehmen, dass sich weder c noch d oder K zwischen den beiden Messungen ändern. Bei der Bildung des Quotienten $\left(\frac{F_{340} = c * d * K * F_{[\text{Ca}^{2+}]}}{F_{380} = c * d * K * F_{[\text{Ca}^{2+}]}}\right)$ der beiden gemessenen Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} werden die drei unbekanntenen Größen eliminiert. Durch diese Methode erhält man eine experimentell bestimmbare Messgröße (den Quotienten $\frac{F_{340}}{F_{380}}$), die nur von der Ca^{2+} -Konzentration abhängt. Da sich beide Werte in einem ständigen Gleichgewicht befinden, kann über das Verhältnis (Ratio, R) der beiden Emissionen die Kalziumkonzentration der Zelle berechnet werden. Der Quotient $R = \frac{F_1}{F_2}$ verhält sich proportional zur Konzentration freier Kalziumionen. Als eigentliche Messgrößen dienen die Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 , die bei gegebenen Anregungswellenlängen λ_1 und λ_2 emittiert werden (Abb. 3.5).

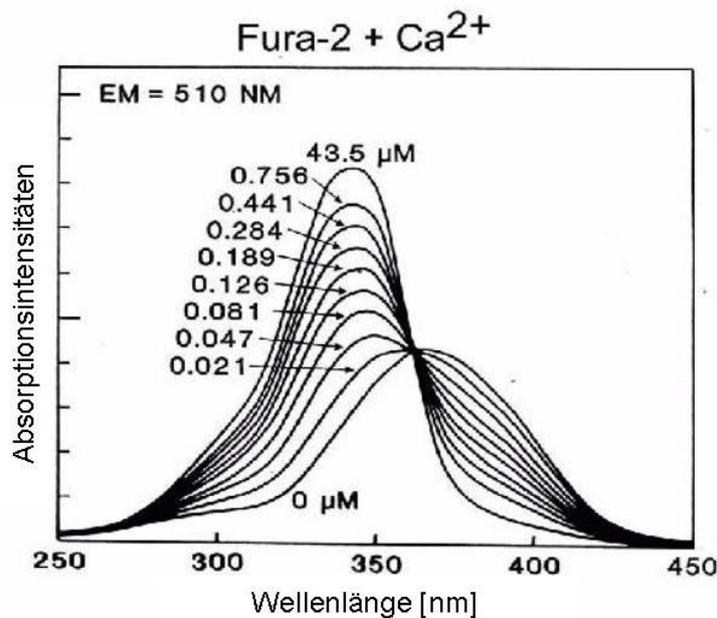


Abbildung 3.5.: Anregungsspektrum von Fura-2 für verschiedene Ca²⁺-Konzentrationen. Dargestellt sind die Fluoreszenz-/Absorptionsintensitäten, gemessen bei 510 nm für Anregungswellenlängen jeweils im Bereich zwischen 250 nm und 450 nm (Abb. verändert nach Probes 2008).

3.6.2. Vorbereitung der Zellen für die Imagingmessungen

Für die hier dargestellten Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i wurden die Zellen 45 - 60 Minuten mit Fura-2-AM (5 μM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in DMEM-F12 im Brutschrank in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Coverslips in die Badkammer überführt und ständig mit Extrazellulärlösung umspült. So wurden zugleich extrazelluläre Furareste beseitigt und die weitere Furaaufnahme gestoppt.

Anschließend wurde das Experiment gestartet und die Fluoreszenzsignale kontinuierlich mit dem Computer (Optiplex GX 270, Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) aufgezeichnet.

3.6.3. Anregungssystem

Als Anregungseinheit für den kalziumsensitiven Farbstoff Fura-2 wurde ein Monochromatorsystem (T.I.L.L.-Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) verwendet. Dieses po-

lychromatische Beleuchtungssystem generiert über eine 75 W Xenon Bogenlampe (XBO/OFR Osram) einzelne Lichtwellen durch Beugung an einem Gitter. Die einzelnen Maxima werden dabei über einen Spiegel in einen Lichtleiter eingekoppelt. Dieses Monochromatorsystem ermöglicht eine intensive Anregung und einen schnellen Wechsel der Wellenlängen λ_1 und λ_2 . Das Anregungslicht wurde mit einem dichroitischen Spiegel (Grenzwellenlänge 500 nm) auf das Objekt gelenkt. Die reflektierten Fluoreszenzsignale F_1 und F_2 wurden mit einem Bandpass (500 - 550 nm) gefiltert und mit einem entsprechend empfindlichen Detektionssystem aufgenommen (Abb. 3.6). Die Detektion erfolgte mit einer peltierelement-gekühlten CCD-Kamera (Imago CCD, T.I.L.L.-Photonics, Planegg, Deutschland). Die Aufnahmen der CCD-Kamera wurden direkt in den Rechner (Optiplex GX 270, Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) eingespeist, und mit dem Programm Vision (T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) konnten Regionen von Interesse markiert, aufgezeichnet und visualisiert werden.

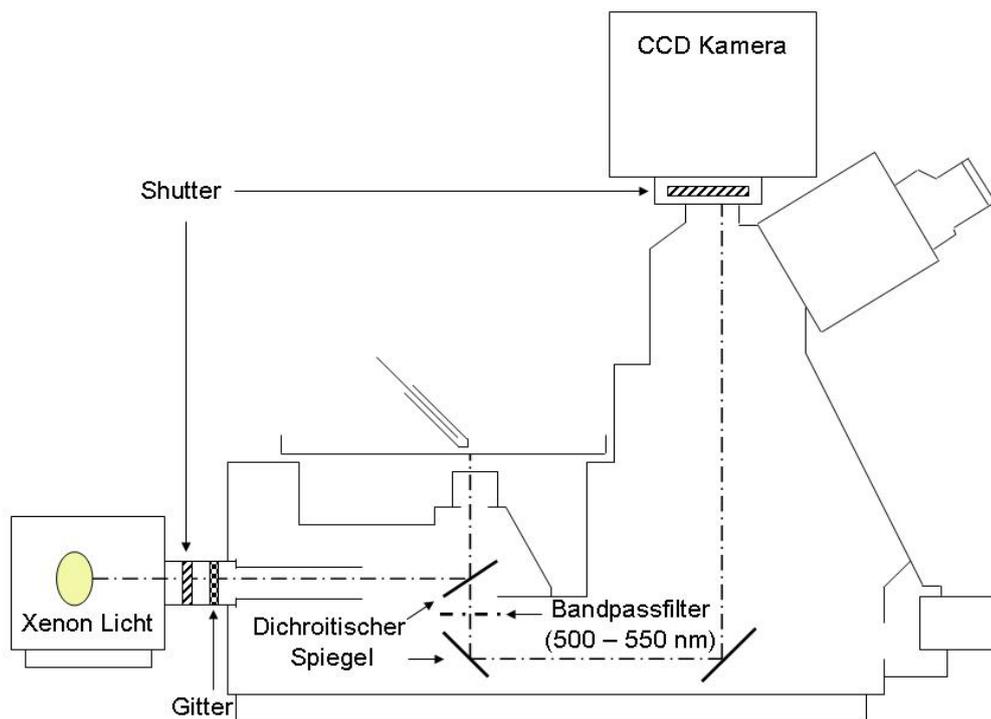


Abbildung 3.6.: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Kalzium-Mikrofluorometrie. Ausgehend von einem Monochromator ist der Strahlengang als gestrichelte Linie dargestellt. Die Anregungswellenlänge wird über einen dichroitischen Spiegel auf die Probe und das emittierende Licht wiederum über Spiegel zur Aufnahme an die CCD-Kamera geleitet.

3.6.4. Auswertung der Imagingdaten

Bei den Messungen umfasste der untersuchte Bereich die intrazelluläre Kalziumkonzentration im Soma der Zelle. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden repräsentative Zellen (mittelgroß, gleichmäßige Beladung) ausgewählt. Es wurde alle zwei Sekunden mit den Exzitationswellenlängen λ_1 und λ_2 ein Standbild aufgezeichnet. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration der trigeminalen Neurone konnte mithilfe einer Falschfarbendarstellung visualisiert und somit die Änderungen dieser Kalziumkonzentrationen am Monitor sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 4.11). Für die auf einem dieser Standbilder definierten Area Of Interests (AOI) wurde die Fluoreszenzintensität für jedes Standbild der Sequenz ermittelt. Der Quotient $R = \frac{F_1}{F_2}$ für jede AOI wurde berechnet und gegen die Versuchszeit aufgetragen. So konnten mehrere geladene Zellen in einem Experiment gleichzeitig aufgezeichnet und anschließend einzeln ausgewertet werden.

Die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen wurden als Fluoreszenzquotient ($\frac{\Delta F}{F_0}$) dargestellt, das Verhältnis der Fluoreszenzänderung zur Basalfluoreszenz.

Substanzapplikationen während der Mikrofluorometrie erfolgten in randomisierter Reihenfolge und in Mindestabständen von zwei Minuten. Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen als Reaktion auf Applikationen konnten anhand des zeitlichen Verlaufs leicht identifiziert werden. Um Druckreaktionen auszuschließen, wurden Applikationen mit Extrazellulärlösung (siehe Tabelle 3.1, Lösung 6) ohne Nikotin durchgeführt. Zudem wurde vor Ende des jeweiligen Imagingexperiments eine Kaliumchloridlösung (KCl, siehe Tabelle 3.1, Lösungen 7 - 8) appliziert. Dadurch wurden die Zellen stark depolarisiert und ein großer Kalziumeinstrom in die Zelle induziert, der eine Abschätzung des maximalen Kalziumsignals ermöglichte (Abb. 4.12).

Um den Anteil intrazellulärer Kalziumspeicher am nikotininduzierten intrazellulären Kalziumsignal zu ermitteln, wurde das Alkaloid Ryanodin der Pflanze *Ryania speciosa* eingesetzt. Ryanodin blockiert selektiv die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung durch Ryanodinrezeptoren intrazellulärer Kalziumspeicher. In den Experimenten wurden die Zellen mit Ryanodin (30 μ M) vorinkubiert, und anschließend wurde der Blocker mit Nikotin oder MMR koappliziert.

3.7. Transfektion von isolierten trigeminalen Ganglienzellen mit siRNA

Für „Loss-Of-Function“-Studien des Lypd6-Proteins wurden akut isolierte trigeminale Neurone mit siRNA (small interfering RNA) gegen das Lypd6-Protein behandelt. Dazu erfolgte die Transfektion der Zellen mit siRNA (Stealth 770, 5'GCC ACA UUU GCU ACC ACA UCA CCU A3'; 5'UAG GUG AUG UGG UAG CAA AUG UGG C3') durch das Transfektionsreagenz HiPerfect (Invitrogen, Mannheim, Deutschland). Die Zellen wurden nach der Ausplattierung auf Coverslips mit Lypd6-siRNA (50 nM) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Kalziumsignale nach Applikation von Nikotin mithilfe der Kalzium-Mikrofluorometrie untersucht. Zur Kontrolle der siRNA-vermittelten Reduktion des Lypd6-Proteins wurden zudem Messungen mit „Off-Target“-siRNA gegen Firefly-Luziferase bzw. ausschließlich mit Transfektionsmedium durchgeführt.

Zur Bestimmung der nikotininduzierten Kalziumänderungen wurde in der Regel als externe Lösung MMR mit 10 mM Kalzium und 100 μ M CdCl₂ verwendet (siehe Tabelle 3.1, Lösung 6). Durch die Zugabe von CdCl₂ konnten die spannungsaktivierten Kalziumkanäle der Neurone blockiert werden. Auch hier wurden Kontrollversuche mit 20 mM oder 30 mM KCl-haltigen Lösungen (siehe Tabelle 3.1, Lösungen 7 - 8) durchgeführt, um die Blockade spannungsgesteuerter Kalziumkanäle zu überprüfen.

4. Ergebnisse

4.1. Agonisteninduzierte Ströme durch nAChRs

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde der Gesamtzell- oder makroskopische Strom (I) im Whole-Cell-Modus der Patch-Clamp-Technik durch nikotinische Acetylcholinrezeptorkanäle (nAChRs) in trigeminalen Neuronen (TriNs) von Wildtyp- und transgenen Mäusen gemessen. Der Strom durch einen einzelnen Rezeptorkanalkomplex wird bestimmt durch die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal geöffnet ist (P_0), sowie den Ionenfluss durch diesen Kanal (i). Der makroskopische Gesamtzellstrom fließt durch eine Vielzahl von einzelnen aktivierten Kanälen und lässt sich folgendermaßen ausdrücken:
 $I = N * P_0 * i$ (N = Anzahl der aktivierten Kanäle).

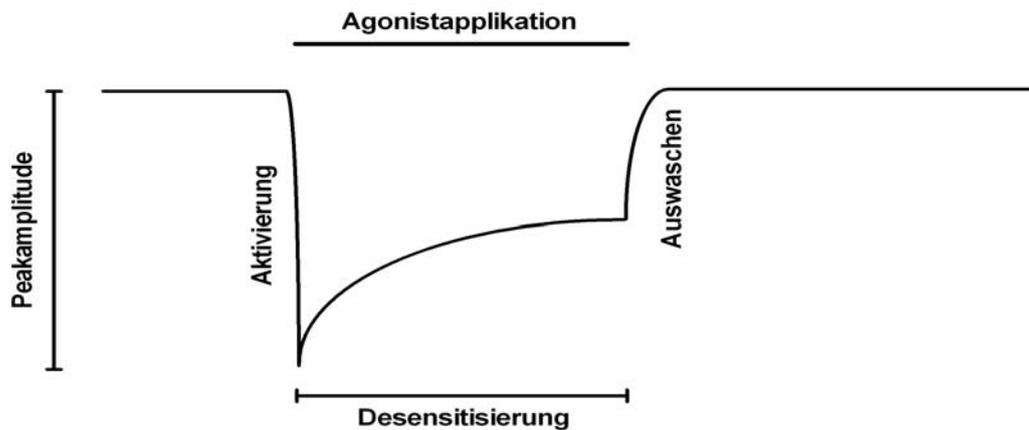


Abbildung 4.1.: Vereinfachte schematische Darstellung des Gesamtzellstroms durch nAChRs nach Aktivierung durch einen Agonisten.

Der Verlauf des Gesamtzellstroms lässt verschiedene Phasen erkennen (Abb. 4.1). Nach der Bindung des Agonisten an die nAChRs öffnen die Kanäle (Aktivierung) und es wird eine maximale Amplitude des Ionenstroms (Peakamplitude) erreicht. Der resultierende Strom durch den Kanal wird in der Nähe des Ruhemembranpotentials (ca. -60 mV) hauptsächlich von den Natriumionen getragen. Obwohl der Agonist noch am Rezeptor gebunden ist, können einzelne Kanäle bereits wieder schließen, ein Vorgang, den man als Desensibilisierung bezeichnet. Durch das Schließen der Kanäle kommt es zu einem weiteren Stromabfall bis nach Auswaschen des Agonisten wieder das Ausgangspotential erreicht ist.

4.2. Ströme durch nAChRs in Wildtyp- und transgenen Mäusen

Für unsere Experimente wurden isolierte trigeminale Neurone mit einem Soma-Durchmesser größer als 20 μm ausgewählt. Diese Auswahl erfolgte, um Neurone zu selektieren, von denen anzunehmen ist, dass sie nAChRs exprimieren (Genzen et al. 2001; Liu et al. 1993). Im Mittel hatten die trigeminalen Neurone einen Durchmesser von $30,5 \pm 6,4 \mu\text{m}$ ($n = 67$).

Die nAChRs wurden aktiviert, indem mit einem DAD-Druckapplikationssystem bzw. einem Schwerkraftapplikationssystem Nikotin in unterschiedlichen Konzentrationen (50 μM

- 5 mM) auf einzelne Zellen appliziert wurde (siehe Material & Methoden). Unter diesen experimentellen Bedingungen konnten nikotininduzierte Ströme ab Nikotinkonzentrationen von etwa 100 μM ausgelöst werden. Um gut messbare und reproduzierbare Stromantworten in den Experimenten zu erhalten, wurden in den meisten Experimenten Nikotinkonzentrationen zwischen 1 mM und 3 mM verwendet.

Die in unseren Experimenten benötigten Nikotinkonzentrationen waren im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Werten für Ratten relativ hoch (Fucile et al. 2005). Wir führten deshalb Kontrollexperimente mit trigeminalen Neuronen von Wistarratten und C57/B6-Mäusen unter gleichen Bedingungen durch und konnten die in der Literatur beschriebenen Werte bestätigen. Daher waren die zur Rezeptoraktivierung erhöhten Nikotinkonzentrationen höchstwahrscheinlich auf die Rezeptoreigenschaften der FVB/N-Mauslinie zurückzuführen.

Abbildung 4.2 zeigt beispielhaft die Gesamtzellströme durch nAChRs eines trigeminalen Neurons (Lypd6-Maus), die nach Applikation von Nikotin in unterschiedlichen Konzentrationen ausgelöst wurden.

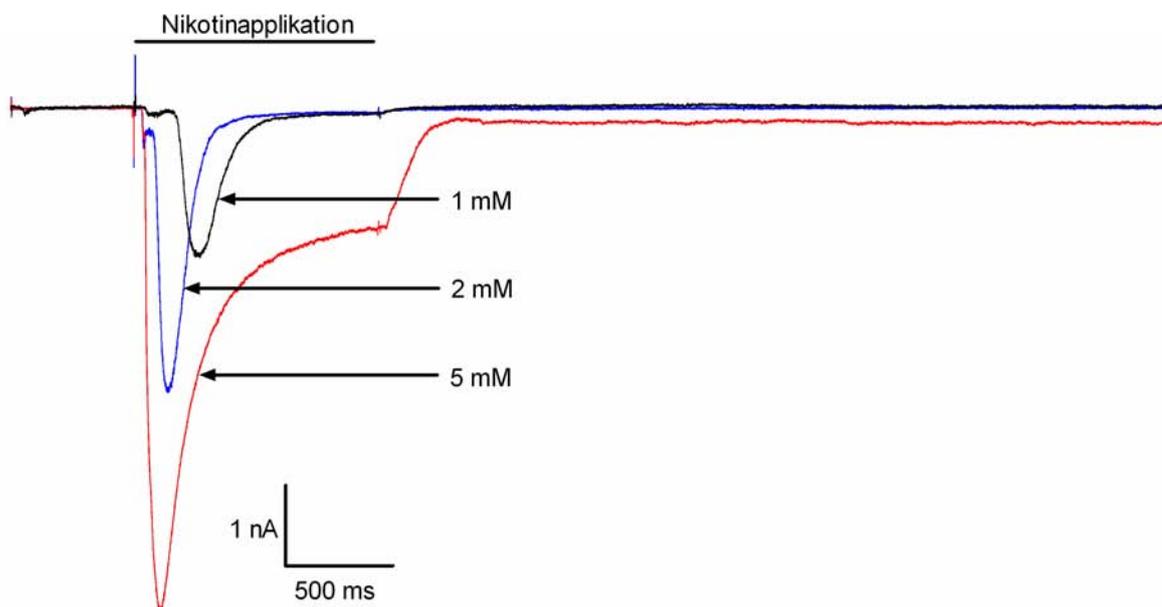


Abbildung 4.2.: Gesamtzellströme durch nAChRs eines trigeminalen Neurons (Lypd6-Maus) nach Applikation von Nikotin in unterschiedlichen Konzentrationen (wie angegeben). Die schwarze Linie oberhalb der Ableitungen kennzeichnet die Dauer der Applikation. Das Haltpotential betrug in diesen und den folgenden Experimenten -60 mV.

4. Ergebnisse

Die Stromamplituden nach Applikation von Nikotin verhielten sich konzentrationsabhängig. Eine Erhöhung der Nikotinkonzentration (100 μM - 5 mM) führte zu einem Anstieg der Peakamplituden (Abb. 4.2). Dabei unterschieden sich die mittleren Peakamplituden der Gesamtzellströme trigeminaler Neurone zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren nicht signifikant (Abb. 4.3).

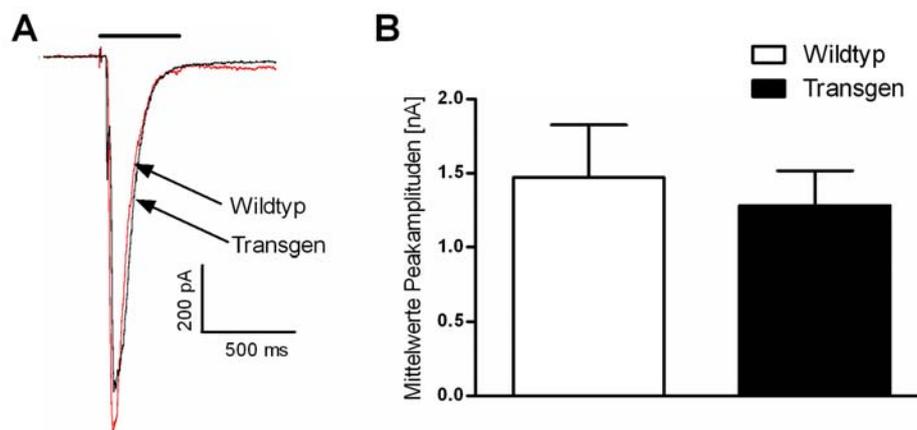


Abbildung 4.3.: Vergleich der Gesamtzellströme durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren.

A) Originalableitungen zweier Stromantworten durch nAChRs (rot $\hat{=}$ Wildtyp; schwarz $\hat{=}$ Transgen) nach Applikation von 1 mM Nikotin. Die schwarze Linie oberhalb der Ableitungen repräsentiert die Applikationsdauer.

B) Balkendiagramm der gemittelten Peakamplituden von Neuronen aus Wildtyp- und transgenen Tieren nach Applikation von 1 mM Nikotin. Die Mittelwerte der Peakamplituden der Gesamtzellströme durch nAChRs zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren ($p = 0,6603$; $n_{(\text{Wildtyp})} = 5$; $n_{(\text{Transgen})} = 13$).

Höhere Nikotinkonzentrationen führten zu einer schnelleren Aktivierung der Ströme, deren Zeitverlauf mit einer monoexponentiellen Funktion angenähert werden konnte. Dabei wurde der Stromverlauf bezogen auf die Peakamplitude zwischen 10 und 90 % ausgewählt und die zugehörige Zeitkonstante τ_{Akt} dieser Aktivierungsphase bestimmt. τ_{Akt} der Gesamtzellstromantworten nahm jeweils bei beiden Maustypen mit steigender Nikotinkonzentration ab, wies aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Maustypen auf (Abb. 4.4).

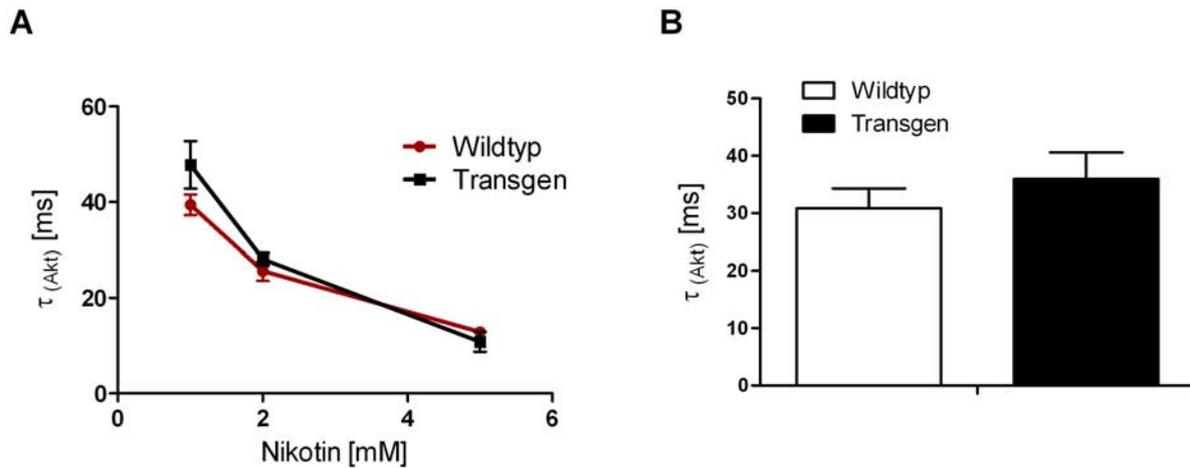


Abbildung 4.4.: Zeitverlauf der Aktivierung von nikotininduzierten Stromantworten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren.

A) Zeitkonstanten der Aktivierungsphase (τ_{Akt}) nach Applikation von Nikotin in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 2 und 5 mM). Die Zeitkonstanten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Maustypen ($n = 5 - 8$).

B) Balkendiagramm der Mittelwerte der Zeitkonstanten der Aktivierungsphase nach Applikation von 1 mM Nikotin ($p = 0,4291$, $n_{(Wildtyp)} = 11$, $n_{(Transgen)} = 16$).

Auch der Zeitverlauf der Desensibilisierungsphase der Gesamtzellströme konnte mithilfe von Zeitkonstanten bestimmt werden. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren.

4.3. Konzentrationswirkungskurven der Gesamtzellströme durch nAChRs für den Agonisten Nikotin

Es wurden sog. Konzentrations- oder Dosiswirkungskurven für einzelne Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren erstellt. Die Peakamplituden der nikotininduzierten Gesamtzellströme wurden entsprechend der maximalen Peakamplituden normalisiert (0 - 100 %) und diese normalisierten Werte gegen den Logarithmus der Konzentrationen aufgetragen (Abb. 4.5).

Die gewonnenen Messpunkte konnten durch einen sigmoidalen Fit angenähert werden. Die resultierenden Dosiswirkungskurven waren für beide Maustypen nahezu identisch. Der Wert für die EC_{50} (die Konzentration, die 50 % des maximalen Effekts hervorruft) lag für Neurone der Wildtypiere bei 0,001396 M und für Neurone der transgenen Tiere

bei 0,001456 M. Die Hillkoeffizienten für beide Kurven waren ebenfalls vergleichbar. Der Hillkoeffizient ergibt sich aus der Steigung und Form der Kurve und stellt ein Maß dar, um den Grad der Kooperativität der Liganden-Rezeptor-Interaktion auszudrücken.

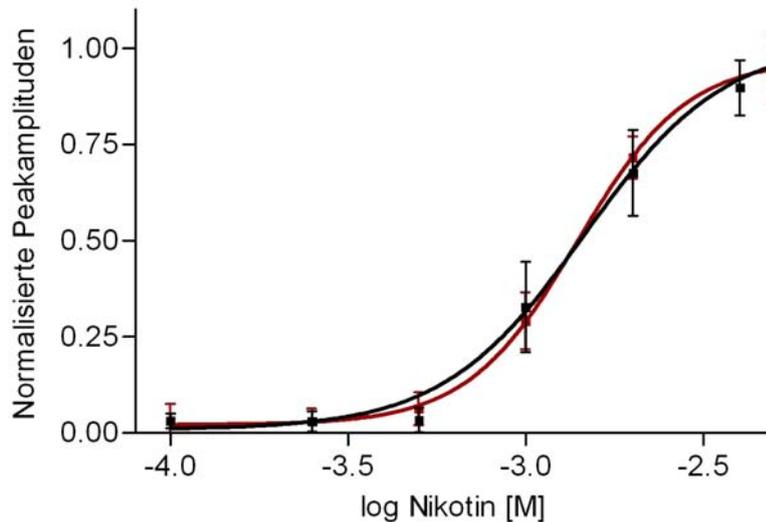


Abbildung 4.5.: Konzentrationswirkungskurven der Gesamtzellströme durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- (rote Kurve) und transgenen Mäusen (schwarze Kurve) für Nikotin. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte der normalisierten Peakamplituden \pm SEM dar (n = 3 - 21).

Wildtyp: $\text{LogEC}_{50} = -2,855$; Hillkoeffizient = 2,807; $\text{EC}_{50} = 0,001396$ M

Transgen: $\text{LogEC}_{50} = -2,837$; Hillkoeffizient = 2,193; $\text{EC}_{50} = 0,001456$ M

4.4. Pharmakologie nikotininduzierter Ströme durch nAChRs

Um zu zeigen, dass die nikotininduzierten Ströme tatsächlich durch nAChR-Kanäle fließen, wurde der Antagonist neuronaler nAChRs Mecamylamin (MEC) mit Nikotin koappliziert. MEC wirkt als nichtkompetitiver Antagonist auf neuronale nAChRs mit IC_{50} -Werten (die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird) im mikromolaren Bereich und blockiert unspezifisch diese Rezeptoren, ohne zwischen Rezeptorsubtypen zu unterscheiden.

Wie in Abb. 4.6 dargestellt, konnten die durch Nikotin induzierten Gesamtzellströme durch Koapplikation von MEC (10 μM oder 20 μM) fast vollständig blockiert werden (MEC 20 μM : 80 % \pm 16 %, n = 14, p = 0,0017). Diese Blockade war reversibel.

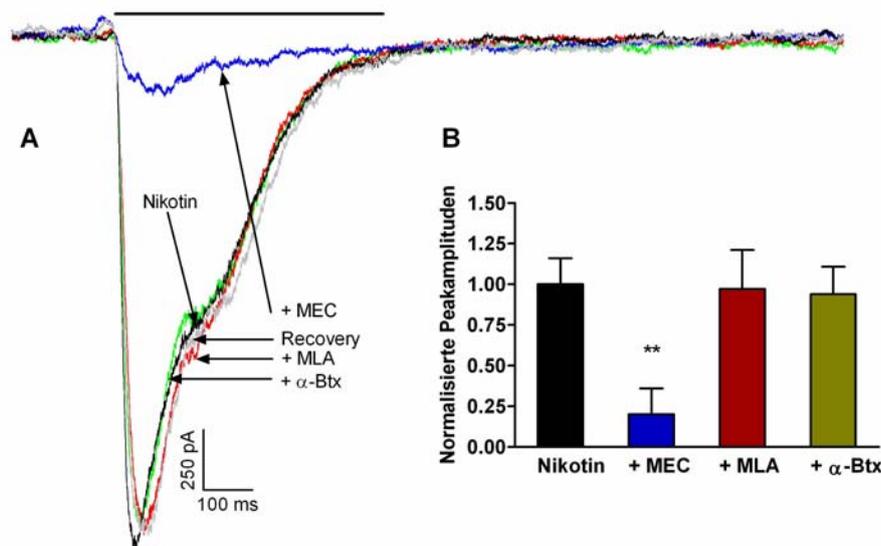


Abbildung 4.6.: Pharmakologie nikotininduzierter Gesamtzellströme durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren.

A) Originalableitungen nikotininduzierter Gesamtzellströme eines trigeminalen Neurons (transgene Maus) nach Applikation verschiedener nAChR-Antagonisten. Die Antagonisten wurden jeweils mit Nikotin koappliziert: schwarz $\hat{=}$ Kontrolle mit Nikotin (3 mM); blau $\hat{=}$ Mecamylamin (MEC, 20 μ M); grau $\hat{=}$ Recovery nach Auswaschen von MEC; grün $\hat{=}$ alpha-Bungarotoxin (α -Btx, 100 nM); rot $\hat{=}$ Methyllycaconitin (MLA, 20 nM). Die schwarze Linie oberhalb der Ableitungen kennzeichnet die Dauer der Applikation.

B) Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte normalisierter Peakamplituden von Neuronen aus Wildtyp- und transgenen Tieren nach Applikation von Nikotin (schwarz, 3 mM, n = 20), sowie nach Koapplikationen von Mecamylamin (blau, MEC, 20 μ M, n = 14), Methyllycaconitin (rot, MLA, 20 nM, n = 8) und α -Bungarotoxin (grün, α -Btx, 100 nM, n = 9). **p < 0,01 für den unpaired t-Test.

In weiteren Untersuchungen wurden spezifische Antagonisten gegen nAChRs mit einer Zusammensetzung aus identischen α -Untereinheiten appliziert. Hierzu wurden alpha-Bungarotoxin (α -Btx) und Methyllycaconitin (MLA) verwendet. Das Neurotoxin α -Btx aus dem Gift der Natter *Bungarus multicinctus* wirkt als kompetitiver Antagonist irreversibel an nAChRs des Muskels sowie an homooligomeren neuronalen nAChRs mit den Untereinheiten $\alpha 7$, $\alpha 8$ oder $\alpha 9$. Heteromere neuronale nAChRs werden nicht oder nur in sehr hoher Konzentration durch α -Btx blockiert (Colquhoun and Patrick 1997; Schoepfer et al. 1990).

Die Applikation von α -Bungarotoxin hatte in unseren Experimenten keinen signifikanten Effekt auf die nikotininduzierten Stromantworten in beiden Maustypen (Abb. 4.6). Auch das Alkaloid Methyllycaconitin (MLA) aus dem Rittersporn *Consolida sp.*, das ebenfalls als potenter kompetitiver Antagonist von homomeren $\alpha 7$ -nAChRs wirkt (Alkondon et al.

1992), zeigte keinen Effekt auf die nikotininduzierten Ströme (Abb. 4.6).

Homomere nAChRs, die aus fünf identischen α -Untereinheiten aufgebaut sind, waren somit nicht an den nikotininduzierten Strömen in diesen trigeminalen Neuronen beteiligt.

4.5. Isolierte Kationenströme durch nAChRs

Als nächstes wurden die einzelnen Kationenstromkomponenten des nikotininduzierten Gesamtzellstroms isoliert. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Ionensubstitutionen in den extra- und intrazellulären Lösungen durchgeführt (siehe Tabelle 3.1, Lösungen 3 - 5; Tabelle 3.2, Lösungen 2 - 4), so dass bei den Messungen nur noch ein Ionentyp (entweder Natrium-, Kalium- oder Kalziumionen) durch den nikotinischen Kanal permeieren konnte.

In Abb. 4.7 sind die Mittelwerte normalisierter Peakamplituden der Natrium- und Kaliumstromkomponenten in Wildtyp- und transgenen Mäusen als Balkendiagramm dargestellt. Die Peakamplituden der isolierten Natrium- bzw. Kaliumstromkomponenten zeigten, wie schon die Peakamplituden der Gesamtzellströme, keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.7). Auch die Kinetiken der isolierten Stromkomponenten unterschieden sich zwischen den beiden Maustypen nicht signifikant.

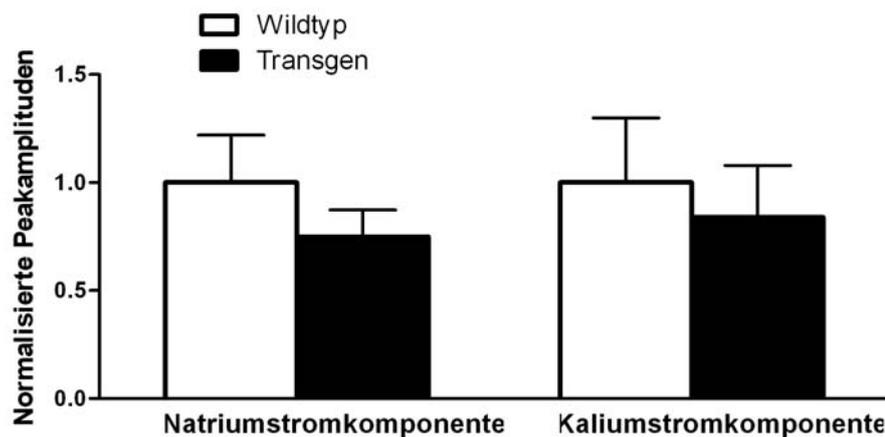


Abbildung 4.7.: Balkendiagramm der Mittelwerte normalisierter Peakamplituden der Natrium- und Kaliumstromkomponenten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Mäusen nach Applikation von 2 mM Nikotin ($n = 4 - 7$; $p_{\text{Natrium}} = 0,4387$; $p_{\text{Kalium}} = 0,6931$).

Im Gegensatz dazu waren die Peakamplituden der Kalziumstromkomponenten in Neuronen von transgenen Tieren im Vergleich zu denen von Wildtyptieren signifikant größer (Abb. 4.8). Signifikante Unterschiede in den Stromkinetiken der Kalziumkomponente waren auch hier nicht zu ermitteln.

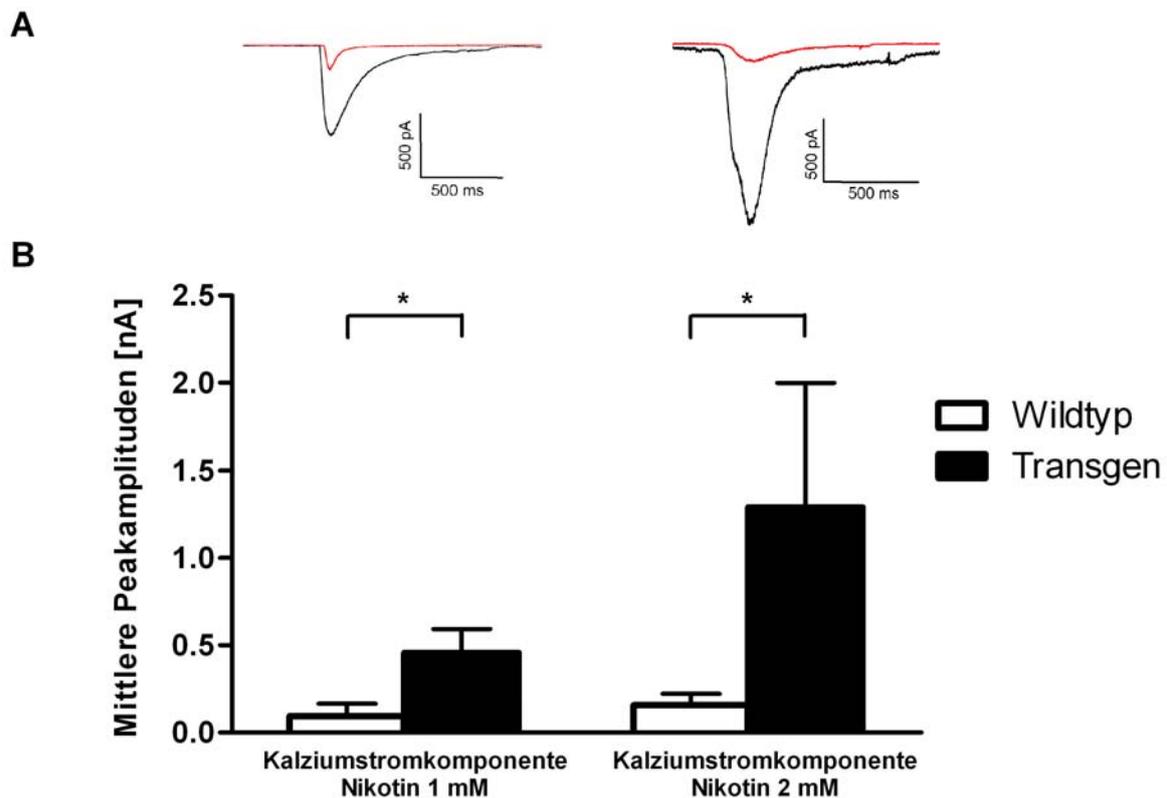


Abbildung 4.8.: Vergleich der Kalziumstromkomponenten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren nach Applikation von Nikotin.

A) Originalableitungen der Kalziumstromantworten (rot $\hat{=}$ Wildtyp; schwarz $\hat{=}$ transgen) nach Applikation von Nikotin (links 1 mM, rechts 2 mM).

B) Balkendiagramm der mittleren Peakamplituden von nikotininduzierten Kalziumstromkomponenten in Wildtyp- und transgenen Tieren (Nikotin 1 mM: $p = 0,0200$, $n_{(Wildtyp)} = 11$ und $n_{(Transgen)} = 8$; Nikotin 2mM: $p = 0,0488$, $n_{(Wildtyp)} = 9$ und $n_{(Transgen)} = 5$). * $p < 0,05$ für den t-Test zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren.

Dass der signifikante Unterschied in der Amplitude der Kalziumstromkomponente nicht in den Messungen der Gesamtzellströme sichtbar wurde, könnte auf einen geringen Anteil der Kalziumstromkomponente am Gesamtzellstrom hindeuten (Fucile et al. 2000, 2003; Fucile 2004; Fucile et al. 2005; Lax et al. 2002).

4.6. Konzentrationswirkungskurven der Kalziumströme durch nAChRs für den Agonisten Nikotin

Für die Kalziumstromkomponente des Gesamtzellstroms wurden ebenfalls Konzentrationswirkungskurven erstellt (wie in Abschnitt 4.3).

Die Dosiswirkungskurven der Kalziumstromkomponenten für Wildtyp- und transgene Tiere unterschieden sich bis auf die Konzentration für 2 mM Nikotin nicht signifikant (Abb. 4.9).

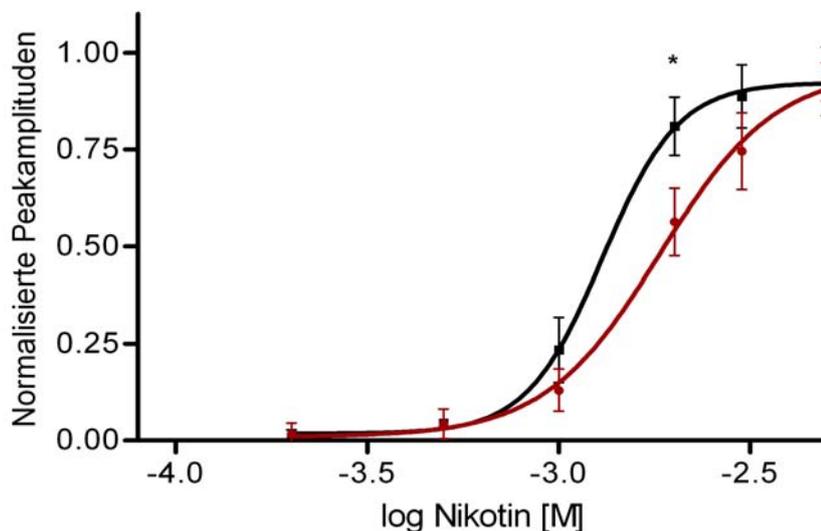


Abbildung 4.9.: Konzentrationswirkungskurven der Kalziumstromkomponente trigeminaler Neurone von Wildtyp- (rote Kurve) und transgenen Tieren (schwarze Kurve) für Nikotin. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte der normalisierten Peakamplituden \pm SEM dar ($n = 3 - 10$; $p_{\text{Nikotin}(2\text{mM})} = 0,0453$ für den t-Test zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren).

Wildtyp: $\text{LogEC}_{50} = -2,735$; Hillkoeffizient = 2,872; $\text{EC}_{50} = 0,001839$ M

Transgen: $\text{LogEC}_{50} = -2,886$; Hillkoeffizient = 4,394; $\text{EC}_{50} = 0,001299$ M

Bei vergleichbaren EC_{50} -Werten (Wildtyp: 0,001839 M; Transgen: 0,001299 M) war für transgene Tiere der Hillkoeffizient der Konzentrationswirkungskurve stark erhöht (Wildtyp: 2,872 M; Transgen: 4,394 M). Dieser Anstieg lässt eine verstärkte Kooperativität der Bindung für Nikotin durch die Wirkung von Lypd6 vermuten. Dies würde bedeuten, dass die Bindung eines Nikotinmoleküls an die erste Bindungsstelle zu einer erleichterten Bindung des zweiten Nikotinmoleküls führt.

4.7. Pharmakologie der Kalziumströme durch nAChRs

Zur Kontrolle wurden die Antagonisten nikotinischer AChRs ebenfalls auf die Kalziumstromkomponente des Gesamtzellstroms angewendet. Die Wirkung der Antagonisten hierauf war vergleichbar mit deren Wirkung auf die Gesamtzellströme (siehe Abschnitt 4.4).

Auch in diesen Experimenten hatten weder α -Btx noch MLA eine blockierende Wirkung auf die nikotininduzierten Kalziumstromkomponenten in beiden Maustypen (Abb. 4.10).

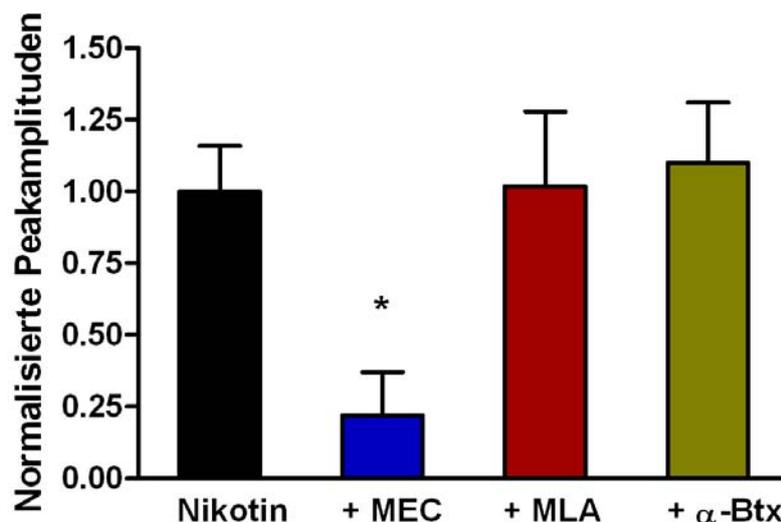


Abbildung 4.10.: Pharmakologie nikotininduzierter Kalziumstromkomponenten durch nAChRs trigeminaler Neurone von Wildtyp- und transgenen Tieren. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte normalisierter Peakamplituden der Kalziumstromkomponenten in TriNs von Wildtyp- und transgenen Tieren nach Applikation von Nikotin (schwarz; 3 mM; n = 19) sowie nach der Koapplikation von Antagonisten verschiedener nAChR-Subtypen: blau $\hat{=}$ Mecamylamin (MEC; 20 μ M; n = 6); rot $\hat{=}$ Methyllycaconitin (MLA; 20 nM; n = 16); grün $\hat{=}$ α -Bungarotoxin (α -Btx; 100 nM; n = 18). *p < 0,05 für den unpaired t-Test.

Die unspezifische Blockade nikotininduzierter Ströme durch Mecamylamin führte bei den isolierten Kalziumstromkomponenten zu einer reversiblen, fast vollständigen Blockade, wie sie auch bei den Gesamtzellströmen zu beobachten war (Abb. 4.10).

4.8. Mikrofluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen

Ergänzend zu den Gesamtzellstrommessungen wurde die Wirkung von Lypd6 in mikrofluorometrischen Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen untersucht. In diesen sog. Imagingexperimenten wurden die TriNs mit dem veresterten Fluoreszenzchelator Fura-2 (Fura-2-AM) geladen und die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach Applikation von Nikotin (1 mM und 3 mM) aufgezeichnet (siehe Material & Methoden).

Abbildung 4.11 zeigt die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Wildtypmäusen zum Zeitpunkt nach der Applikation von Nikotin bzw. KCl.

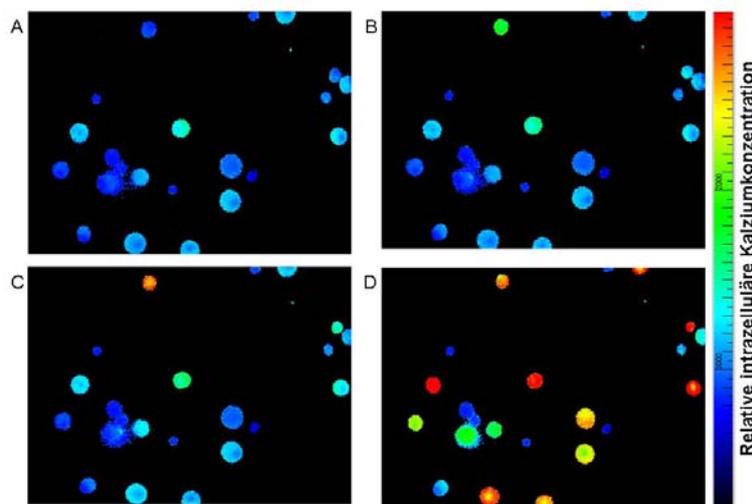


Abbildung 4.11.: Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtypmäusen nach Applikation von Nikotin und KCl. Erkennbar sind die mit Fura-2 beladenen Zellsomata einzelner Neurone:

(A) Kontrolle,

(B) nach Applikation von 1 mM Nikotin,

(C) nach Applikation von 3 mM Nikotin,

(D) nach Applikation von MMR mit 30 mM KCl (siehe Tabelle 3.1, Lösung 8).

Die unterschiedlichen Farben (blau bis rot, siehe rechte Skala) spiegeln die freie Kalziumkonzentration in den einzelnen Neuronen wieder.

Im Mittel zeigten ca. 30 % der mit Fura-2 beladenen Zellen in den Imagingexperimenten deutliche Änderungen der Kalziumkonzentrationen ($\Delta F \geq 5\%$ der Basalfluoreszenz) nach Applikation von Nikotin und wurden für die Analyse verwendet.

Abbildung 4.12 zeigt beispielhaft den Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumänderungen vor, während und nach der Substanzapplikation in trigeminalen Neuronen.

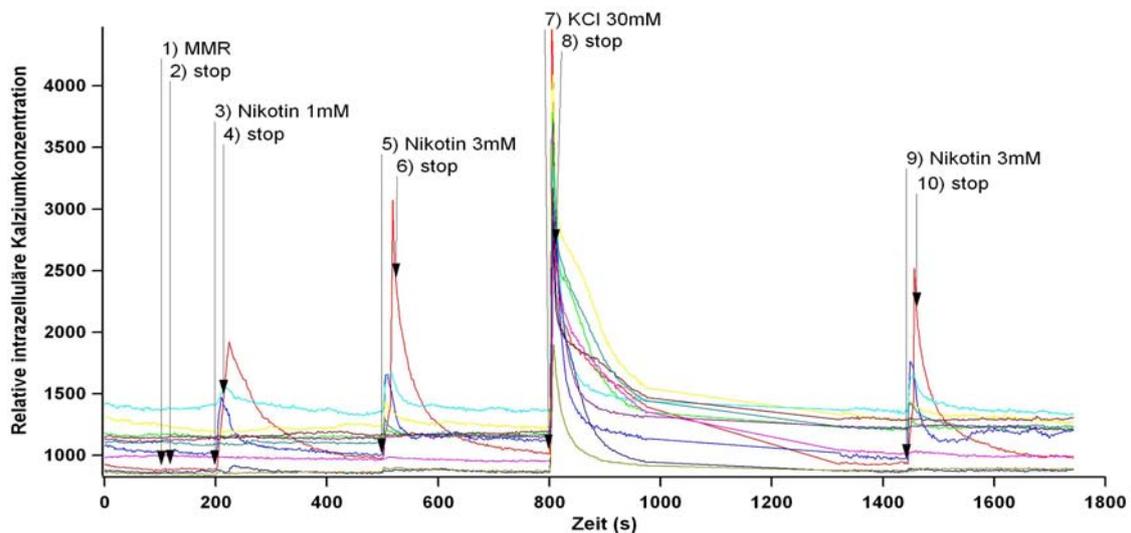


Abbildung 4.12.: Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentrationen vor, während und nach Applikation verschiedener Substanzen in trigeminalen Neuronen eines Wildtyp-tiers. Jede Linie spiegelt den Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration eines einzelnen fluoreszierenden Neurons wider, wobei die Pfeile Beginn und Ende der Applikationen von MMR (Kontrolle), Nikotin (1 mM und 3 mM) und KCl (30 mM) anzeigen.

Zur Analyse wurde der Fluoreszenzquotient ($\frac{\Delta F}{F_0}$), also die Fluoreszenzänderung (ΔF) eines Neurons in Relation zu seiner Basalfluoreszenz (F_0), berechnet. Die Fluoreszenzänderung (ΔF) ergibt sich aus der maximalen Fluoreszenz nach Applikation von Nikotin (bzw. KCl) abzüglich der Basalfluoreszenz (siehe Abschnitt 3.6.4).

In den Versuchen wurde deutlich, dass die von Nikotin hervorgerufenen intrazellulären Kalziumkonzentrationsanstiege in Neuronen von transgenen Tieren signifikant größer waren als die in Neuronen von Wildtyp-tieren ($p < 0,0001$, Abb. 4.13).

Die Basalfluoreszenzen in den trigeminalen Neuronen der Wildtyp- und transgenen Mäuse wiesen jedoch keine Unterschiede auf. Daher kann man davon ausgehen, dass die trigeminalen Neurone von Wildtyp- und transgenen Mäusen die gleichen Ausgangslevel der intrazellulären Kalziumkonzentrationen aufwiesen. Auch nach Kontrollapplikationen von MMR mit 30 mM Kalium (siehe Tabelle 3.1, Lösung 8) waren die beobachteten Erhöhungen der Kalziumkonzentration nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 4.13).

4. Ergebnisse

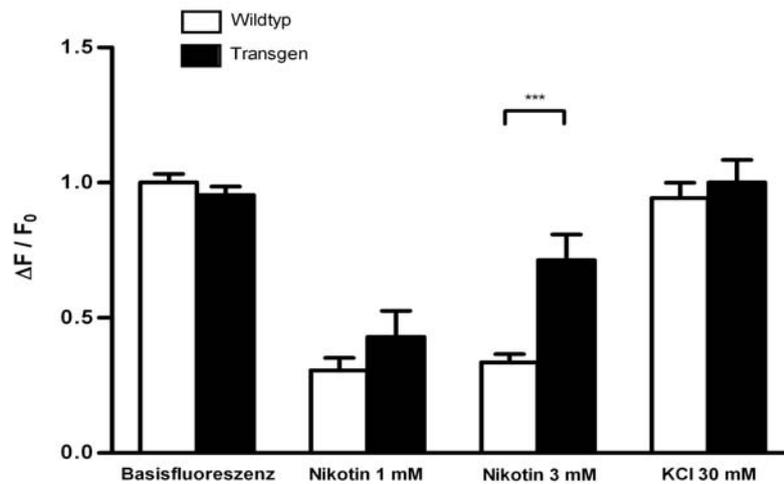


Abbildung 4.13.: Vergleich der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- und transgenen Mäusen. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der Fluoreszenzquotienten ($\frac{\Delta F}{F_0}$) nach Applikation verschiedener Substanzen (Kontrolle, Nikotin 1 mM und 3 mM sowie KCl 30 mM; n = 13 - 57). ***p < 0,0001 für den t-Test zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren.

Um in diesen Experimenten den Beitrag der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle aufzudecken, wurden diese durch die Zugabe von 100 μ M Cadmiumchlorid (CdCl_2) blockiert. Unter diesen Bedingungen konnten mit Nikotin weiterhin Änderungen der Kalziumkonzentrationen ausgelöst werden, wohingegen durch KCl induzierte Kalziumsignale ausblieben (Abb. 4.14).

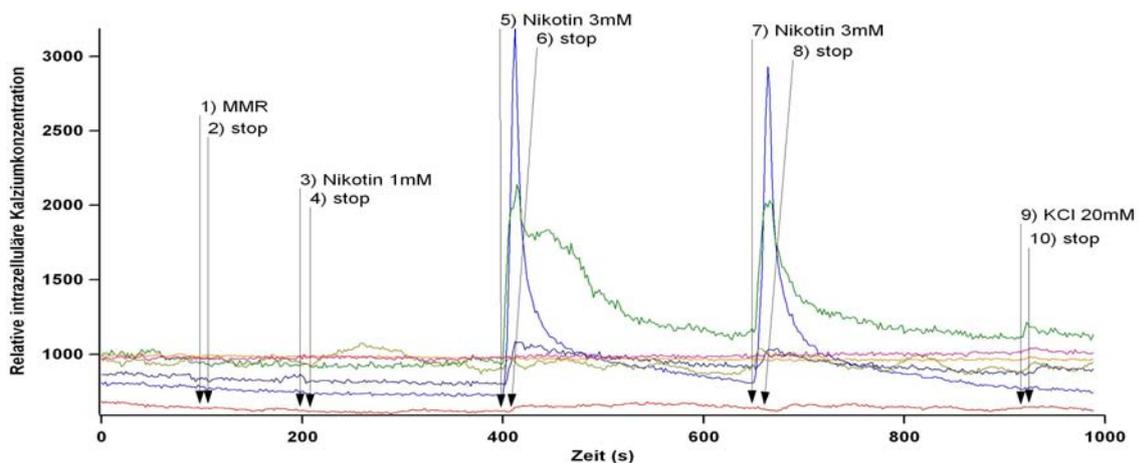


Abbildung 4.14.: Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen eines Wildtyp-tiers nach Zugabe von 100 μ M CdCl_2 und Applikation von Nikotin (1 mM und 3 mM) und KCl (20 mM). Jede Linie spiegelt den Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration im Soma eines einzelnen fluoreszierenden Neurons wider. Die Applikation von KCl führte dabei nicht zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Die durch Nikotin induzierbaren intrazellulären Kalziumanstiege in Neuronen von transgenen Tieren waren unter diesen Bedingungen weiterhin signifikant größer als in denen von Wildtyptieren (Abb. 4.15).

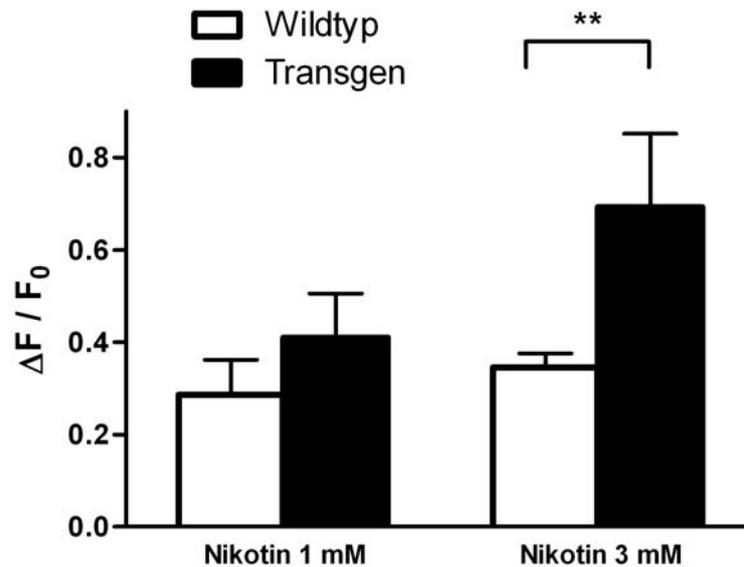


Abbildung 4.15.: Vergleich der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- und transgenen Mäusen. Das Balkendiagramm zeigt die relativen Mittelwerte der Fluoreszenzquotienten ($\frac{\Delta F}{F_0}$) nach Applikation von Nikotin (1 mM und 3 mM) in Anwesenheit von 100 μM CdCl_2 (n = 11 - 48). **p < 0,01 für den t-Test zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren.

4.9. Anteil intrazellulärer Kalziumspeicher am nikotininduzierten Kalziumsignal

Durch einen nikotininduzierten Kalziumeinstrom kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Erhöhung kann zusätzlich die Freisetzung von Kalzium aus kalziumsensitiven Kalziumspeichern der Zelle anstoßen. Um deren Beitrag am nikotininduzierten intrazellulären Kalziumanstieg abzuschätzen, wurde in weiteren Experimenten die Freisetzung von Kalzium aus diesen Speichern durch das Alkaloid Ryanodin blockiert. Dieser selektive Inhibitor wurde nach Applikation von Nikotin zu der Extrazellulärlösung hinzugegeben und nach einer Inkubationsdauer von bis zu 15 Minuten mit Nikotin koappliziert (Abb 4.16).

4. Ergebnisse

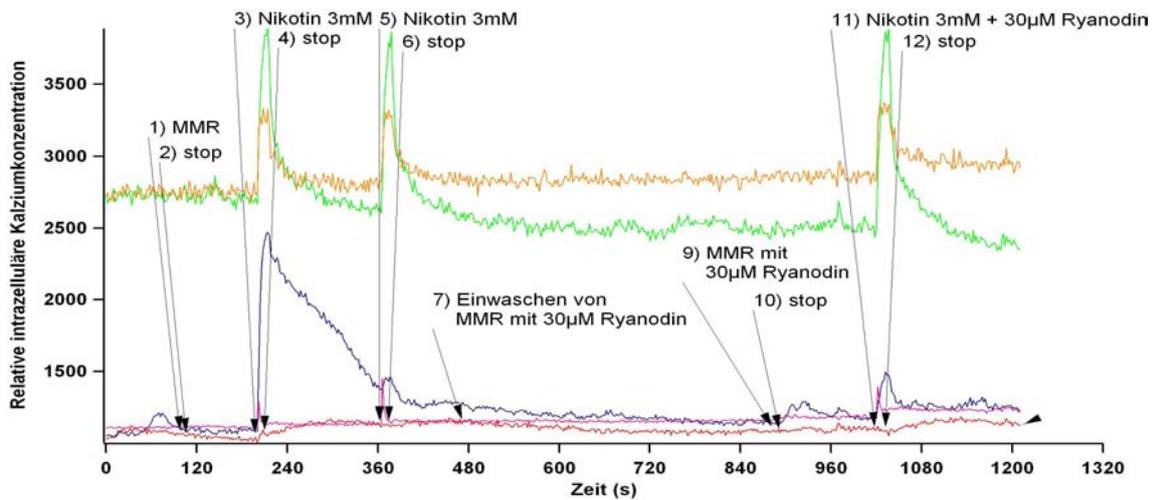


Abbildung 4.16.: Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen eines Wildtypiers in Anwesenheit von 100 µM CdCl₂ und nach Einwaschen des Blockers Ryanodin. Jede Linie spiegelt den Zeitverlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration im Soma eines einzelnen fluoreszierenden Neurons wider, wobei die Pfeile Beginn und Ende der Applikationen von MMR (Kontrolle) und Nikotin (3 mM) vor und nach Ryanodinzugabe (30 µM) anzeigen. Die Inkubation und die Koapplikation mit Ryanodin führten zu keiner Änderung in den intrazellulären Kalziumanstiegen.

Vorinkubation der Zellen mit Ryanodin (30 µM) sowie Koapplikation von Nikotin mit Ryanodin (3 mM + 30 µM) in Anwesenheit von CdCl₂ (100 µM) führten zu keinem signifikanten Unterschied in den intrazellulären Kalziumänderungen (Abb. 4.17).

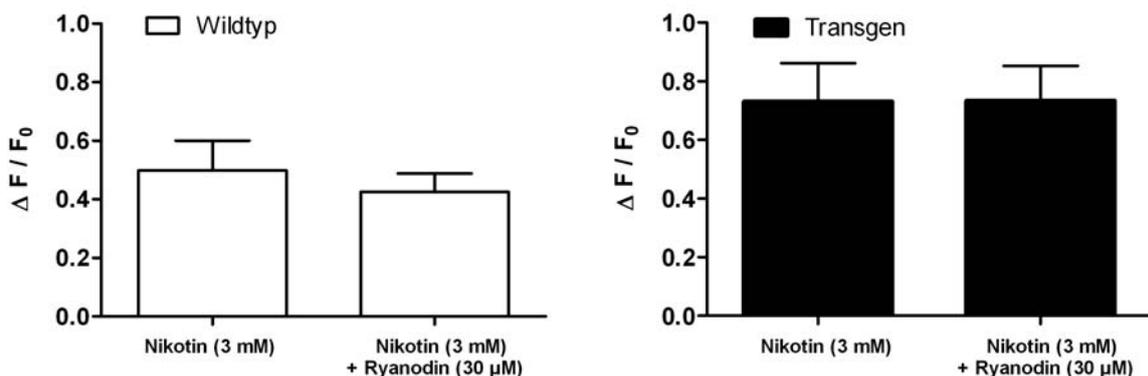


Abbildung 4.17.: Vergleich der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- (weiß) und transgenen Mäusen (schwarz) vor und nach Zugabe von Ryanodin. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der Fluoreszenzquotienten ($\frac{\Delta F}{F_0}$) ± SEM nach Applikation von Nikotin (3 mM) bzw. nach Koapplikation von Nikotin (3 mM) mit Ryanodin (30 µM) (n = 10 - 20).

Berechnet man den Anteil der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern am Gesamtanstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Applikation von Nikotin (3 mM), erhält man folgende Ergebnisse (Abb. 4.18): Die Inhibition der ryanodin-abhängigen intrazellulären Kalziumfreisetzung führte in Neuronen der Wildtyptiere zu einer $14,8 \pm 6,2$ %igen Reduktion des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration ($n = 9 - 10$). Bei transgenen Tieren blieben die Konzentrationsanstiege nahezu unverändert ($-4 \% \pm 8,1 \%$, $n = 20$).

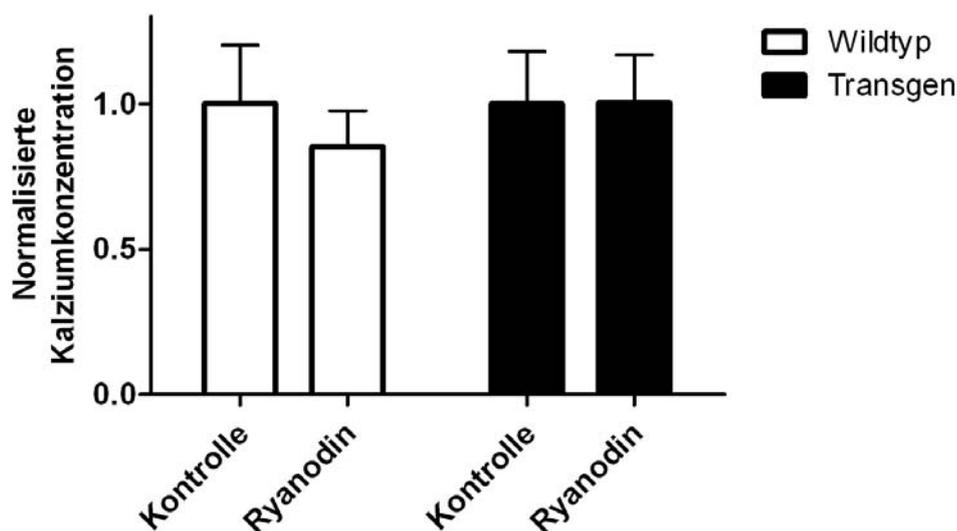


Abbildung 4.18.: Anteil des freigesetzten Ca^{2+} aus intrazellulären Kalziumspeichern am nikotinduzierten Gesamtkalziumanstieg. Jeder Balken repräsentiert die normalisierten Mittelwerte der Peakamplituden der intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderungen \pm SEM ($n = 9 - 20$) in trigeminalen Neuronen von Wildtyp- (weiß) und transgenen Tieren (schwarz). Die Kontrollen zeigen die Kalziumkonzentrationen nach Applikation von Nikotin, und die als „Ryanodin“ bezeichneten Balken zeigen die Kalziumkonzentrationen nach Koapplikation von Nikotin (3 mM) mit Ryanodin (30 μM). Die Daten der Ryanodinmessungen wurden auf die jeweiligen Kontrollwerte normalisiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen überwiegend aufgrund der Permeation der Kalziumionen durch die nAChRs erfolgen.

4.10. siRNA-vermittelter Knockdown des Lypd6-Transkripts

Die Bedeutung des Lypd6-Proteins für die Kalziumpermeation durch nAChRs in TriNs von Wildtypmäußen wurde in weiteren mikrofluorometrischen Messungen untersucht. Dazu wurde in Knockdown-Experimenten die Expression von Lypd6 durch eine 24stündige Inkubation mit siRNA (Stealth 770) reduziert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte TriNs, ausschließlich mit dem Transfektionsmedium HiPerFect behandelte und mit siRNA gegen Firefly-Luziferase behandelte Zellen untersucht (alle jeweils nach 24 Stunden).

Die transiente Transfektion der TriNs mit der siRNA gegen Lypd6 führte bei Wildtypmäusen nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Kalziumkonzentrationsanstiege nach Applikation von Nikotin (3 mM) im Vergleich zu den unbehandelten TriNs. Die zur Kontrolle mit Transfektionsmedium sowie die mit der „Off-Target“-siRNA gegen Firefly-Luziferase behandelten Zellen reagierten unbeeinflusst auf Nikotin (Abb. 4.19).

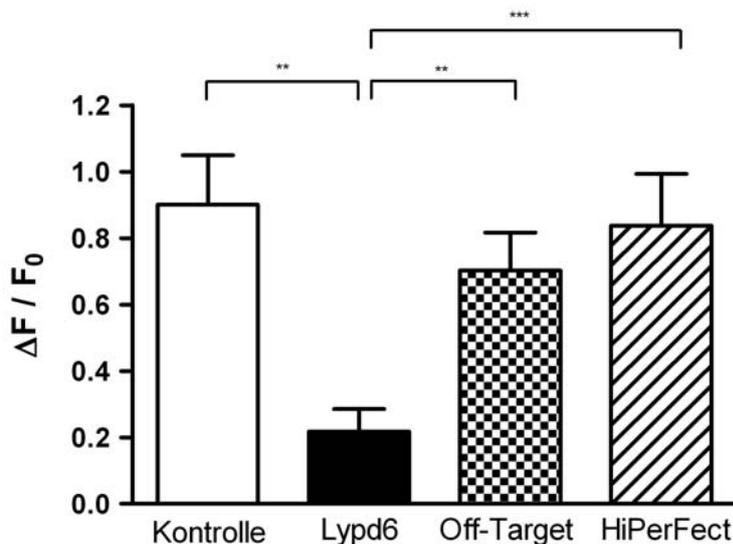


Abbildung 4.19.: Balkendiagramm der intrazellulären Kalziumkonzentrationen trigeminaler Neurone nach 24stündiger Behandlung mit siRNA gegen Lypd6 (50 nM, schwarzer Balken) und Applikation von Nikotin (3 mM). Folgende Kontrollexperimente wurden durchgeführt: Weiß $\hat{=}$ Kontrolle ohne siRNA-Behandlung; Schachbrettmuster $\hat{=}$ „Off-Target-Behandlung“ mit siRNA (50 nM) gegen Firefly-Luziferase; Gestreifter Balken $\hat{=}$ Behandlung ausschließlich mit HiPerFect-Transfektionsmedium. Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte der Fluoreszenzquotienten ($\frac{\Delta F}{F_0}$) der intrazellulären Kalziumkonzentrationen \pm SEM (n = 34 - 67).

p < 0,01; *p < 0,0001 für den unpaired t-Test.

Zur Validierung des Expressionsreduktionskonstrukts wurde zuvor in Zellkulturexperimenten die Effizienz der siRNA untersucht. In Neuro-2a-Zellen führte die transiente Transfektion mit dem siRNA-Vektor nach 24 Stunden zu einer ca. 70 %igen Reduktion der Lypd6-mRNA (Darvas 2007).

Bei einem Vergleich der siRNA-behandelten Neurone der Wildtypiere mit siRNA-behandelten Neuronen der transgenen Tiere (beide jeweils 24 Stunden mit siRNA gegen Lypd6) zeigte sich, dass die Fluoreszenzquotienten der intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach Applikation von Nikotin (3 mM) weiterhin signifikant unterschiedlich waren ($p = 0,0315$, Abb. 4.20).

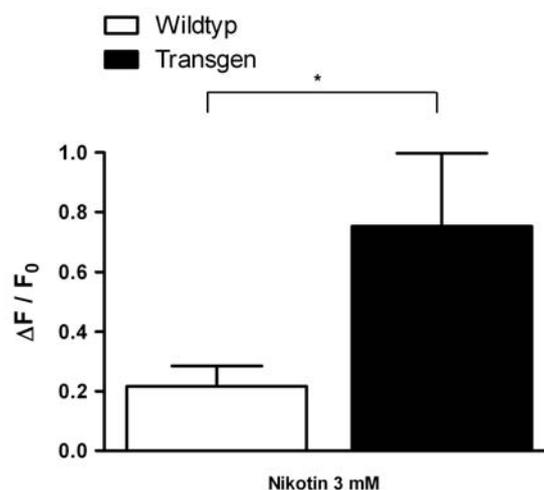


Abbildung 4.20.: Balkendiagramm der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Neuronen von Wildtyp- (weiß) und transgenen Tieren (schwarz) nach Behandlung mit siRNA gegen Lypd6 (50 nM, 24 Stunden) und Applikation von Nikotin (3 mM). Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte der Fluoreszenzquotienten ($\frac{\Delta F}{F_0}$) der intrazellulären Kalziumkonzentrationen \pm SEM ($n = 34 - 47$). * $p < 0,05$ für den t-Test zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren.

Diese Befunde legen nahe, dass Lypd6 nicht nur modulierend an nAChRs in genetisch veränderten Tieren angreift, sondern auch unter physiologischen Bedingungen (in genetisch unveränderten Tieren) eine wichtige Rolle bei der Regulation der nAChRs spielt.

5. Diskussion

5.1. Charakteristika des Lypd6-Proteins

Das kürzlich entdeckte endogene Protein Lypd6 (Ly6-Plaur-Domäne6) kann der Familie der Ly6-uPAR(Lymphocyte antigen 6 urokinase-like plasminogen activator receptor)-Proteine zugeordnet werden. Es wurde gezeigt, dass dieses Protein im ZNS von Mäusen stark exprimiert wird. Verhaltensuntersuchungen machten deutlich, dass Lypd6-überexprimierende Mäuse eine erhöhte Sensitivität für die analgetische Wirkung von Nikotin aufweisen (Darvas 2007).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Lypd6 die nikotininduzierte Kalziumstromkomponente durch nAChRs in trigeminalen Neuronen (TriNs) von transgenen Mäusen verstärkt. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, der durch einen Knockdown der Lypd6-Expression mit siRNA vermindert werden kann.

Auch in den TriNs von Wildtypmäusen führte der siRNA-vermittelte Knockdown des Lypd6-Proteins zu einem verringerten Kalziumeinstrom durch nAChRs. Dies deutet darauf hin, dass Lypd6 nicht nur bei genetisch veränderten Mäusen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen die Regulation von nAChRs beeinflusst.

Die Modulation des Kalziumeinstroms durch nAChRs kann zu wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Konsequenzen führen, da Kalzium einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe ist.

5.2. Nikotinsische cholinerge Transmission im ZNS

Das nikotinsische cholinerge System besteht aus einer Vielzahl von Projektionen, die nahezu jeden Bereich im ZNS innervieren (Dani and Bertrand 2007; Woolf 1991). Nikotinsische Acetylcholinrezeptoren findet man sowohl prä-, post- als auch nichtsynaptisch (Dani 2001; Descarries et al. 1997; Léna et al. 1993; Zarei et al. 1999). Das nikotinsische cholinerge System hat unter anderem entscheidenden Einfluss auf komplexe Funktionen des Gehirns, wie Lernen und Gedächtnis, Aufmerksamkeit und den Schlaf-Wach-Zyklus (Changeux et al. 1998; Coull 1998; Everitt and Robbins 1997; Picciotto et al. 1995; Robbins 1997). Der Verlust zentraler nikotinsischer Projektionen spielt eine wichtige Rolle bei der Abnahme kognitiver Funktionen im Alter sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson (Dani and Bertrand 2007; Gallagher and Rapp 1997; Geula 1998; Robbins et al. 1997).

Modulatoren des nikotinsich cholinergen Systems könnten somit neue Wege eröffnen, um pathophysiologischen Prozessen im ZNS entgegenwirken zu können.

Nikotinsische Rezeptoren spielen in diesem System eine zentrale Rolle. Der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt dabei eine wichtige physiologische Funktion zu, da sie unmittelbare und mittelbare Wirkungen auf unterschiedlichste kalziumabhängige Prozesse hat, wie Neurotransmitterfreisetzung (Dani 2001; MacDermott et al. 1999; Vizi and Lendvai 1999; Wonnacott 1997), synaptische Plastizität (Broide and Leslie 1999; Ji et al. 2001; Mansvelder and McGehee 2000) und Exzitotoxizität (Neurotoxizität) (Belluardo et al. 2000; Orrenius et al. 2003; Utsugisawa et al. 2002). Die intrazellulären Kalziumanstiege in den Zellen werden u.a. aufgrund der Durchlässigkeit der nAChRs für Kalziumionen bestimmt.

5.2.1. Die molekulare Struktur von nAChRs bestimmt deren Kalziumpermeabilität

Es gibt im ZNS eine Vielzahl von nAChRs mit unterschiedlichen molekularen Strukturen. Funktionelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Rezeptoren unterschiedlich auf Agonisten, Antagonisten und Modulatoren reagieren (Gerzanich et al. 1998; Jensen et al. 2005; Ramirez-Latorre et al. 1996). Die Rezeptorsubtypen weisen unterschiedliche Kalziumpermeabilitäten auf, was deren physiologische Funktion entscheidend mitbestimmt. Homomere $\alpha 7$ -Rezeptoren z.B. besitzen eine hohe Kalziumpermeabilität (Séguéla et al.

1993; Vernino et al. 1992), die auf die Zusammensetzung der geladenen Seitenketten im Inneren der Kanalpore und die polaren Molekülgruppen am äußeren Rand des Kanals zurückgeführt wird. Ein Austausch der Glutamatseitenkette im Inneren der Öffnung des $\alpha 7$ -Kanals durch eine neutrale Alaninseitenkette führt zu einer starken Reduzierung der Kalziumpermeabilität dieser Rezeptoren (Bertrand et al. 1993b).

In weiteren Untersuchungen zur Kalziumpermeabilität wurde gezeigt, dass (für einen Überblick siehe Fucile 2004):

- a) die Region M2 der Rezeptoruntereinheiten (siehe Abb. 2.2) entscheidend für die Ionen-selektivität der Rezeptoren ist und
- b) homomere α -Btx-sensitive nAChRs, bestehend aus fünf identischen α -Untereinheiten, größere Kalziumpermeabilitäten aufweisen als heteromere Rezeptoren mit weniger α -Untereinheiten.

Die membrandurchspannende Region M2 und deren benachbarte Basen spielen eine wichtige regulierende Rolle bei der Kalziumpermeabilität nikotinischer Rezeptoren, da drei Ringe negativ geladener Basen als wichtiger Filter der kationenselektiven Rezeptoren wirken (Corringer et al. 1999a, b; Galzi et al. 1992; Gunthorpe and Lummis 2001; Imoto et al. 1988; Keramidas et al. 2000; Konno et al. 1991). Punktmutationen der M2-Region bzw. der benachbarten Glutamatbasen von nAChRs reichen bereits aus, um den Kalziumfluss der Rezeptoren zu modulieren (Bertrand et al. 1993b; Fucile et al. 2000, 2003; Haghghi and Cooper 2000).

Ebenso ist bekannt, dass der Austausch einer nAChR-Untereinheit durch eine $\alpha 5$ -Untereinheit in $\alpha 3\beta 4$ - oder $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren zu einer Erhöhung der Kalziumpermeabilität dieser Rezeptoren führt (Gerzanich et al. 1998).

Die Kalziumpermeabilitäten der unterschiedlichen heteromeren nAChRs sind jedoch nur schwer untereinander zu vergleichen (Fucile 2004). Untersuchungen der menschlichen heteromeren Rezeptoren deuten darauf hin, dass $\alpha 3\beta 4$ -Rezeptoren eine höhere Kalziumpermeabilität aufweisen als $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren und diese höher permeabel für Kalzium sind als $\alpha 4\beta 4$ -Rezeptoren (Lax et al. 2002).

Der durch Lypd6 hervorgerufene Effekt des höheren Kalziumeinstroms, den wir in transgenen Tieren beobachtet haben, könnte darauf beruhen, dass z.B. mehr Rezeptoren exprimiert werden oder Rezeptoren exprimiert werden, die mehr α -Untereinheiten aufweisen. Lypd6 könnte dadurch den Kalziumeinstrom nikotininduzierter Ströme in den TriNs dieser Tiere verstärken. Jedoch spricht die Tatsache, dass die Gesamtzellströme der TriNs von Wildtyp- und transgenen Tieren unverändert waren, dagegen, dass durch die Wir-

kung von Lypd6 mehr Rezeptoren exprimiert werden. Ebenso würde man bei einem verstärkten Einbau von α -Untereinheiten in die Rezeptoren veränderte Kinetiken der Stromantworten erwarten (Gerzanich et al. 1998).

Untersuchungen zum Einfluss von Lypd6 auf die Rezeptorexpression sowie eine genaue Aufgliederung der Rolle der Rezeptoruntereinheiten wurden in unserer Studie nicht durchgeführt. Dennoch wurde in einem ersten Schritt versucht zu unterscheiden, ob Lypd6 Wirkung auf homomere und/oder heteromere Rezeptortypen hat.

5.3. Lypd6 moduliert heteromere nAChRs

Zur Eingrenzung der Wirkung von Lypd6 auf die Rezeptortypen wurden Untersuchungen mit Inhibitoren für unterschiedliche nAChR-Subtypen durchgeführt. Der unselektive Inhibitor Mecamylamin (MEC) blockierte den Strom durch die nAChRs fast vollständig. Selektive Blocker der homomeren α -nAChRs, wie α -Bungarotoxin und Methyllycaconitin (α -Btx und MLA), zeigten dagegen keinen Einfluss auf die von Lypd6 modulierten Ströme. Daher können homomere α -nAChRs als Ziel von Lypd6 ausgeschlossen werden.

Eine weitere Eingrenzung der heteromeren nAChR-Subtypen mit pharmakologischen Methoden wurde nicht durchgeführt, da sensorische Neurone, wie die TriNs, eine Vielzahl von Rezeptorsubtypen exprimieren (Dussor et al. 2003; Flores et al. 1996; Keiger and Walker 2000; Wada et al. 1989) und zurzeit nur wenige spezifische Antagonisten für einzelne Subtypen heteromerer nAChRs im Gehirn beschrieben sind (Colquhoun and Patrick 1997).

Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass Lypd6 direkt an den vorhandenen heteromeren Rezeptoren wirkt und die gesteigerte Kalziumpermeabilität durch eine direkte Interaktion von Lypd6 mit dem Rezeptorprotein hervorgerufen wird.

5.4. Wirkmechanismen des Lypd6-Proteins

In zukünftigen Untersuchungen könnte in heterologen Expressionssystemen, wie transfizierten Säugetierzellen oder *Xenopus*-Oozyten, in denen nur ein Subtyp der nAChRs

exprimiert wird, die Interaktion von Lypd6 mit diesem einzelnen nAChR-Subtyp untersucht werden. Die Öffnungswahrscheinlichkeiten und Kalziumpermeabilitäten dieser Rezeptoren könnten mit Einzelkanalmessungen und kombinierten Fluoreszenz- und Patch-Clamp-Messungen genauer bestimmt werden.

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung des Mechanismus von Lypd6 wäre die Synthese des Proteins. Mit dem isolierten Protein könnten spezifische Kanalinteraktionen im Detail untersucht werden. So könnte z.B. analysiert werden, ob Lypd6 den Rezeptorkanalkomplex als allosterischer Modulator beeinflusst.

Die Frage nach dem Wirkmechanismus von Lypd6 konnte in dieser Studie nicht endgültig geklärt werden.

5.4.1. Allosterische Modulation von Rezeptorproteinen

Für Lypd6 liegt eine Funktion als allosterischer Modulator von nAChRs nahe, da schon für die Proteine Lynx1 und Slurp1 aus derselben Proteinfamilie gezeigt werden konnte, dass sie als allosterische Modulatoren Ströme durch nAChRs regulieren und somit Einfluss auf die Funktion von nAChRs nehmen können (Adermann et al. 1999; Miwa et al. 2006).

Das Prinzip der allosterischen Modulation besteht darin, dass allosterische Liganden die Energieschwellen der Konformationszustände einzelner Proteine verändern. Dies bedeutet, dass z.B. Acetylcholin als endogener Ligand der nAChRs an der Bindungsstelle für ACh am Übergang der Untereinheitenprotomeren, an der sog. orthosterischen Stelle, andockt und dass Moleküle, die an anderer Stelle an den Untereinheiten binden, als allosterische Modulatoren wirken können. Die Anbindung eines Liganden an die orthosterische Seite stabilisiert den Rezeptor in seinem aktiven Zustand, wohingegen die Anbindung eines Effektors an der allosterischen Stelle die Gesamteigenschaften des Rezeptors ändern kann, indem er die Energiebarrieren verändert. Als positive allosterische Modulatoren (PAM) bezeichnet man Liganden, die die Energiebarriere zwischen geschlossenem und offenem Zustand eines Rezeptors herabsetzen oder zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit eines Rezeptors führen können. Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass es durch die Wirkung dieser Modulatoren oftmals zu einer Änderung ACh-induzierter Peakamplituden, einer Verringerung der Desensibilisierung, einer Verkleinerung des EC_{50} -Wertes und einem Anstieg der Steigung der Konzentrations-Aktivierungs-Kurve (größerer Hillkoeffizient) kommt (Bertrand and Gopalakrishnan 2007).

In einer Vielzahl von Studien wurden bisher positive allosterische Modulatoren der $\alpha 7$ -nAChRs beschrieben (Broad et al. 2006; Charpantier et al. 2005; Chimienti et al. 2003; Krause et al. 1998; Lopes et al. 2007; Popa et al. 2006; Zwart et al. 2002). Diese Studien haben gezeigt, dass die Ligandeninteraktionen durch ein allosterisches Modell beschrieben werden können, bei dem man zwei Effekte unterscheidet: Bei beiden moduliert der allosterische Effektor die Energieschwellen der Konformationszustände, was aber einmal vorwiegend zu einer Veränderung der Peakamplitude führt (Typ I-PAM) und im zweiten Fall sowohl zu einer Änderung der Peakamplitude als auch der Kinetik der Agonistenreaktion führt (Typ II-PAM) (Bertrand and Gopalakrishnan 2007). Bei dem Typ I-PAM geht man davon aus, dass es zu einer Stabilisierung des Öffnungszustands kommt und damit neben der Modulation der Stromamplitude keine Veränderung der Kinetik einhergeht (Ng et al. 2007). Dieser Typ von Modulatoren ist für die klinische Forschung von besonderem Interesse, da er nur eine Eigenschaft des Rezeptors beeinflusst. Man hofft, mit ihm Ansatzmöglichkeiten zu erlangen, mit denen man die Rezeptoreigenschaften hoch spezifisch modulieren kann. Im Laufe der Zeit sind neben weiteren positiven allosterischen Modulatoren der homomeren Rezeptoren auch Typ I-Modulatoren der $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs sowie weiterer heteromeren Rezeptoren beschrieben worden (Broad et al. 2006; Buisson and Bertrand 1998; Curtis et al. 2002). Auch an diesen heteromeren Rezeptoren führen die Typ I-Modulatoren zu spezifischen Anstiegen der Peakamplituden nach Applikation von ACh (Broad et al. 2006; Hsiao et al. 2001).

Für das Lypd6-Protein wäre vorstellbar, dass es als Typ I-PAM wirkt und dabei selektiv die Kalziumkomponente des Stroms durch nAChRs beeinflusst.

5.5. Funktionelle Bedeutung von Lypd6

Diese Studie beschreibt Lypd6 erstmals als spezifischen Modulator des Kalziumstroms durch nikotinische Acetylcholinrezeptoren. Die Identifizierung von Lypd6 als Mitglied der Ly6/Neurotoxin-Familie lässt vermuten, dass noch weitere uPAR/Ly6-Gene bisher unbekannte Proteine kodieren, die als mögliche Modulatoren im ZNS wirken können. Die Modulation der nAChRs durch Lypd6 hat weitreichende Auswirkungen auf die nAChR-Funktion von Mäusen. Schon für Lynx1 wurde gezeigt, dass in *Xenopus*-Oozyten, die nAChRs exprimieren, ACh-induzierte Ströme verstärkt werden und Lynx1 als allosterischer Modulator dieser nAChR-Funktion wirkt (Ibanez-Tallon et al. 2002; Miwa et al.

1999, 2006). Auch die Tatsache, dass Lynx1-defiziente Mäuse eine verstärkte neuronale Degeneration aufweisen und der Lypd6-Knockdown die Embryonalentwicklung nicht übersteht, gibt Hinweise auf eine mögliche grundlegende Bedeutung der Modulation der cholinergen Signaltransduktion im ZNS und der Peripherie (Darvas 2007). Die funktionelle Bedeutung von Lypd6 wird zudem durch die Ergebnisse der Knockdown-Experimente in Wildtyp-Tieren unterstützt.

Die in dieser Untersuchung beschriebene Wirkungsweise auf nur eine Eigenschaft des Rezeptors könnte von besonderer Bedeutung sein. Lypd6 könnte über eine Regulation des Kalziumeinstroms durch nAChRs möglicherweise unterschiedlichste zellbiologische Prozesse, wie z.B. die synaptische Transmission oder die Neurotoxizität, beeinflussen und damit neue Ansätze zur Entwicklung therapeutischer Konzepte liefern.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass nAChRs der Angriffspunkt von Lypd6 sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Rezeptoren oder Proteine Ziele von Lypd6 sein können. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Mechanismus von Lypd6 auf nAChRs *in vitro* und *in vivo* zu verstehen. Dazu gehören Verhaltensuntersuchungen, Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Lypd6, sowie die Spezifizierung des Wirkmechanismus. Zudem wäre es wünschenswert, Lypd6-überexprimierende C57/B6-Mäuse oder Lypd6-Knockout-Mäuse herzustellen.

Literaturverzeichnis

- 1 Adams D. J. and Nutter T. J. Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol Paris*, 86(1-3):67–76, 1992.
- 2 Adermann K., Wattler F., Wattler S., Heine G., Meyer M., Forssmann W. G., and Nehls M. Structural and phylogenetic characterization of human slurp-1, the first secreted mammalian member of the ly-6/upar protein superfamily. *Protein Sci*, 8(4):810–819, Apr 1999.
- 3 Albuquerque E. X., Alkondon M., Pereira E. F., Castro N. G., Schratzenholz A., Barbosa C. T., Bonfante-Cabarcas R., Aracava Y., Eisenberg H. M., and Maelicke A. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther*, 280(3):1117–1136, Mar 1997.
- 4 Alkondon M., Pereira E. F., Wonnacott S., and Albuquerque E. X. Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol Pharmacol*, 41(4):802–808, Apr 1992.
- 5 Arredondo Juan, Chernyavsky Alexander I, Webber Robert J, and Grando Sergei A. Biological effects of slurp-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 125(6):1236–1241, Dec 2005. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23973.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23973.x>.
- 6 Arredondo Juan, Chernyavsky Alexander I, Jolkovsky David L, Webber Robert J, and Grando Sergei A. Slurp-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. *J Cell Physiol*, 208(1):238–245, Jul 2006. doi: 10.1002/jcp.20661. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20661>.
- 7 Beker Friederike, Weber Martin, Fink Rainer H A, and Adams David J. Muscarinic and nicotinic ach receptor activation differentially mobilize ca²⁺ in rat intracardiac ganglion

- neurons. *J Neurophysiol*, 90(3):1956–1964, Sep 2003. doi: 10.1152/jn.01079.2002. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01079.2002>.
- 8 Belluardo N., Mudò G., Blum M., and Fuxe K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res*, 113(1-2):21–34, Aug 2000.
- 9 Bertrand D., Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Bertrand S., and Changeux J. P. Stratification of the channel domain in neurotransmitter receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 5(4):688–693, Aug 1993a.
- 10 Bertrand D., Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Bertrand S., and Changeux J. P. Mutations at two distinct sites within the channel domain m2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(15):6971–6975, Aug 1993b.
- 11 Bertrand Daniel and Gopalakrishnan Murali. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*, 74(8):1155–1163, Oct 2007. doi: 10.1016/j.bcp.2007.07.011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.011>.
- 12 Brain K. L., Trout S. J., Jackson V. M., Dass N., and Cunnane T. C. Nicotine induces calcium spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular calcium stores. *Neuroscience*, 106(2):395–403, 2001.
- 13 Broad Lisa M, Zwart Ruud, Pearson Kathy H, Lee Martin, Wallace Louise, McPhie Gordon I, Emkey Renee, Hollinshead Sean P, Dell Colin P, Baker S. Richard, and Sher Emanuele. Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(3):1108–1117, Sep 2006. doi: 10.1124/jpet.106.104505. URL <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.106.104505>.
- 14 Broide R. S. and Leslie F. M. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol*, 20(1):1–16, Aug 1999. doi: 10.1007/BF02741361. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF02741361>.
- 15 Buisson B. and Bertrand D. Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol Paris*, 92(2):89–100, Apr 1998. doi: 10.1016/S0928-4257(98)80144-7. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4257\(98\)80144-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4257(98)80144-7).
- 16 Castro N. G. and Albuquerque E. X. alpha-bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J*, 68(2):516–524, Feb 1995.
- 17 Changeux J. and Edelstein S. J. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3):369–377, Jun 2001.

- 18 Changeux J. P., Bertrand D., Corringer P. J., Dehaene S., Edelstein S., Léna C., Novère N. Le, Marubio L., Picciotto M., and Zoli M. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev*, 26(2-3):198–216, May 1998.
- 19 Changeux Jean-Pierre and Edelstein Stuart J. Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science*, 308(5727):1424–1428, Jun 2005. doi: 10.1126/science.1108595. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1108595>.
- 20 Charpantier Eric, Wiesner Andreas, Huh Kyung-Hye, Ogier Roch, Hoda Jean-Charles, Allaman Geraldine, Raggenbass Mario, Feuerbach Dominik, Bertrand Daniel, and Fuhrer Christian. Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and src-family kinases. *J Neurosci*, 25(43):9836–9849, Oct 2005. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3497-05.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3497-05.2005>.
- 21 Chimienti Fabrice, Hogg Ronald C, Plantard Laure, Lehmann Caroline, Brakch Nouredine, Fischer Judith, Huber Marcel, Bertrand Daniel, and Hohl Daniel. Identification of slurp-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of mal de meleda. *Hum Mol Genet*, 12(22):3017–3024, Nov 2003. doi: 10.1093/hmg/ddg320. URL <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddg320>.
- 22 Cole Kenneth S. and Curtis Howard J. Electric impedance of single marine eggs. *J Gen Physiol*, 21:591–599, 1938.
- 23 Colquhoun L. M. and Patrick J. W. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol*, 39:191–220, 1997.
- 24 Corringer P. J., Bertrand S., Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Changeux J. P., and Bertrand D. Molecular basis of the charge selectivity of nicotinic acetylcholine receptor and related ligand-gated ion channels. *Novartis Found Symp*, 225:215–24; discussion 224–30, 1999a.
- 25 Corringer P. J., Bertrand S., Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Changeux J. P., and Bertrand D. Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, 22(4):831–843, Apr 1999b.
- 26 Coull J. T. Neural correlates of attention and arousal: insights from electrophysiology, functional neuroimaging and psychopharmacology. *Prog Neurobiol*, 55(4):343–361, Jul 1998.

- 27 Curtis Logos, Buisson Bruno, Bertrand Sonia, and Bertrand Daniel. Potentiation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol Pharmacol*, 61(1):127–135, Jan 2002.
- 28 Dajas-Bailador Federico A, Mogg Adrian J, and Wonnacott Susan. Intracellular ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in sh-sy5y cells: contribution of voltage-operated ca²⁺ channels and ca²⁺ stores. *J Neurochem*, 81(3):606–614, May 2002.
- 29 Dani J. A. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, 49(3):166–74, Feb 1 2001. ISSN 0006-3223 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11230867. Dani, J A DA09411/DA/United States NIDA DA12661/DA/United States NIDA NS21229/NS/United States NINDS Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review United States Biological psychiatry *Biol Psychiatry*. 2001 Feb 1;49(3):166-74.
- 30 Dani J. A. and Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:699–729, 2007. ISSN 0362-1642 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17009926. Dani, John A Bertrand, Daniel Research Support, N.I.H., Extramural Review United States Annual review of pharmacology and toxicology *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:699-729.
- 31 Dani J. A. and Mayer M. L. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 5(3):310–317, Jun 1995.
- 32 Dani Lester. Nicotinic acetylcholine receptors in neurons. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2005.
- 33 Darvas M. *Funktionsanalyse des Lypd6-Gens in transgenen Mäusen*. PhD thesis, 2007. URL http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2007/darvas_martin.
- 34 Descarries L., Gisiger V., and Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the cns. *Prog Neurobiol*, 53(5):603–625, Dec 1997.
- 35 Dussor Gregory O, Leong Anthony S, Gracia Nicholas B, Kilo Sonja, Price Theodore J, Hargreaves Kenneth M, and Flores Christopher M. Potentiation of evoked calcitonin gene-related peptide release from oral mucosa: a potential basis for the pro-inflammatory effects of nicotine. *Eur J Neurosci*, 18(9):2515–2526, Nov 2003.

- 36 Everitt B. J. and Robbins T. W. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol*, 48:649–684, 1997. doi: 10.1146/annurev.psych.48.1.649. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.649>.
- 37 Fleming T. J., O’Hugin C., and Malek T. R. Characterization of two novel $\alpha 6$ genes. protein sequence and potential structural similarity to alpha-bungarotoxin and other neurotoxins. *J Immunol*, 150(12):5379–5390, Jun 1993.
- 38 Flores C. M., DeCamp R. M., Kilo S., Rogers S. W., and Hargreaves K. M. Neuronal nicotinic receptor expression in sensory neurons of the rat trigeminal ganglion: demonstration of $\alpha 3\beta 4$, a novel subtype in the mammalian nervous system. *J Neurosci*, 16(24):7892–7901, Dec 1996.
- 39 Fucile S., Palma E., Mileo A. M., Miledi R., and Eusebi F. Human neuronal threonine-for-leucine-248 $\alpha 7$ mutant nicotinic acetylcholine receptors are highly Ca^{2+} permeable. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7):3643–3648, Mar 2000. doi: 10.1073/pnas.050582497. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.050582497>.
- 40 Fucile S., Sucapane A., and Eusebi F. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors from rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, 565(Pt 1):219–28, May 15 2005. ISSN 0022-3751 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15760934. Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t England.
- 41 Fucile Sergio. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, 35(1): 1–8, 2004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WCC-49TRKBF-2/2/495377e32bdb602d16b6564e1c869ba>.
- 42 Fucile Sergio, Renzi Massimiliano, Lax Pedro, and Eusebi Fabrizio. Fractional Ca^{2+} current through human neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, 34(2):205–209, Aug 2003.
- 43 Gallagher M. and Rapp P. R. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu Rev Psychol*, 48:339–370, 1997. doi: 10.1146/annurev.psych.48.1.339. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.339>.
- 44 Galzi J. L. and Changeux J. P. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology*, 34(6):563–582, Jun 1995.
- 45 Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Hussy N., Bertrand S., Changeux J. P., and Bertrand D. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity

- from cationic to anionic. *Nature*, 359(6395):500–505, Oct 1992. doi: 10.1038/359500a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/359500a0>.
- 46 Genzen J. R., Cleve W. Van, and McGehee D. S. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol*, 86(4):1773–1782, Oct 2001.
- 47 Gerzanich V., Wang F., Kuryatov A., and Lindstrom J. alpha 5 subunit alters desensitization, pharmacology, ca⁺⁺ permeability and ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 286(1):311–20, Jul 1998. ISSN 0022-3565 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9655874. NS11323/NS/United States NINDS Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. United states.
- 48 Geula C. Abnormalities of neural circuitry in alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. *Neurology*, 51(1 Suppl 1):S18–29; discussion S65–7, Jul 1998.
- 49 Giraudat J., Dennis M., Heidmann T., Haumont P. Y., Lederer F., and Changeux J. P. Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: [3h]chlorpromazine labels homologous residues in the beta and delta chains. *Biochemistry*, 26(9):2410–2418, May 1987.
- 50 Grynkiewicz G., Poenie M., and Tsien R. Y. A new generation of ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6):3440–3450, Mar 1985.
- 51 Gumley T. P., McKenzie I. F., and Sandrin M. S. Tissue expression, structure and function of the murine ly-6 family of molecules. *Immunol Cell Biol*, 73(4):277–296, Aug 1995.
- 52 Gunthorpe M. J. and Lummis S. C. Conversion of the ion selectivity of the 5-ht(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem*, 276(14):10977–10983, Apr 2001. doi: 10.1074/jbc.M009575200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009575200>.
- 53 Haghghi A. P. and Cooper E. A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine alpha3beta4 and alpha4beta2 receptors. *J Neurosci*, 20(2):529–541, Jan 2000.

- 54 Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., and Sigworth F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391(2):85–100, Aug 1981.
- 55 Hille Bertil. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., 3rd edition, 2001.
- 56 Hogg Ron C, Buisson Bruno, and Bertrand Daniel. Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol*, 70(9):1267–1276, Nov 2005. doi: 10.1016/j.bcp.2005.06.010. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.06.010>.
- 57 Hsiao B., Dweck D., and Luetje C. W. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J Neurosci*, 21(6):1848–1856, Mar 2001.
- 58 Hsiao Bernard, Mihalak Karla B, Repicky Sarah E, Everhart Drew, Mederos Ana H, Malhotra Arun, and Luetje Charles W. Determinants of zinc potentiation on the alpha4 subunit of neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, 69(1):27–36, Jan 2006. doi: 10.1124/mol.105.015164. URL <http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.015164>.
- 59 Hu W-P., Li X-M., Chen J-G., and Li Z-W. Potentiation of the nicotinic acetylcholine receptor by aluminum in mammalian neurons. *Neuroscience*, 149(1):1–6, Oct 2007. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.018. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.018>.
- 60 Hucho F. The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel. *Eur J Biochem*, 158(2): 211–226, Jul 1986.
- 61 Ibanez-Tallon I., Miwa J. M., Wang H. L., Adams N. C., Crabtree G. W., Sine S. M., and Heintz N. Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron*, 33(6):893–903, Mar 14 2002. ISSN 0896-6273 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11906696. CA 09673/CA/United States NCI NS-22061/NS/United States NINDS NS-31744/NS/United States NINDS P01 NS30532/NS/United States NINDS Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. United States.
- 62 Im W. B., Blakeman D. P., Davis J. P., and Ayer D. E. Studies on the mechanism of interactions between anesthetic steroids and gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol Pharmacol*, 37(3):429–434, Mar 1990.

- 63 Imoto K., Busch C., Sakmann B., Mishina M., Konno T., Nakai J., Bujo H., Mori Y., Fukuda K., and Numa S. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*, 335(6191):645–648, Oct 1988. doi: 10.1038/335645a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/335645a0>.
- 64 Jensen Anders A, Frølund Bente, Liljefors Tommy, and Krogsgaard-Larsen Povl. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem*, 48(15):4705–4745, Jul 2005. doi: 10.1021/jm040219e. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jm040219e>.
- 65 Ji D., Lape R., and Dani J. A. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 31(1):131–141, Jul 2001.
- 66 Jones S., Sudweeks S., and Yakel J. L. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci*, 22(12):555–561, Dec 1999.
- 67 Kalamida Dimitra, Poulas Konstantinos, Avramopoulou Vassiliki, Fostieri Efrosini, Lagoumintzis George, Lazaridis Konstantinos, Sideri Anastasia, Zouridakis Marios, and Tzartos Socrates J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. structure, function and pathogenicity. *FEBS J*, 274(15):3799–3845, Aug 2007. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x>.
- 68 Kandel Eric R., Schwartz James H., and Jessell Thomas M. *Principles of neural science*. McGraw-Hill, 4th edition, 2000.
- 69 Keiger C. J. and Walker J. C. Individual variation in the expression profiles of nicotinic receptors in the olfactory bulb and trigeminal ganglion and identification of alpha2, alpha6, alpha9, and beta3 transcripts. *Biochem Pharmacol*, 59(3):233–240, Feb 2000.
- 70 Keramidas A., Moorhouse A. J., French C. R., Schofield P. R., and Barry P. H. M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion- to cation-selective. *Biophys J*, 79(1):247–259, Jul 2000.
- 71 Konno T., Busch C., Kitzing E. Von, Imoto K., Wang F., Nakai J., Mishina M., Numa S., and Sakmann B. Rings of anionic amino acids as structural determinants of ion selectivity in the acetylcholine receptor channel. *Proc Biol Sci*, 244(1310):69–79, May 1991. doi: 10.1098/rspb.1991.0053. URL <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1991.0053>.
- 72 Krause R. M., Buisson B., Bertrand S., Corringer P. J., Galzi J. L., Changeux J. P., and Bertrand D. Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*, 53(2):283–294, Feb 1998.

- 73 Kuryatov Alexandre, Onksen Jennifer, and Lindstrom Jon. Roles of accessory subunits in alpha4beta2(*) nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, 74(1):132–143, Jul 2008. doi: 10.1124/mol.108.046789. URL <http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.046789>.
- 74 Lax P., Fucile S., and Eusebi F. Ca(2+) permeability of human heteromeric nachrs expressed by transfection in human cells. *Cell Calcium*, 32(2):53–58, Aug 2002.
- 75 Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol*, 15(2):193–222, Oct 1997. doi: 10.1007/BF02740634. URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF02740634>.
- 76 Liu L., Pugh W., Ma H., and Simon S. A. Identification of acetylcholine receptors in adult rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res*, 617(1):37–42, Jul 1993.
- 77 Léna C., Changeux J. P., and Mulle C. Evidence for preterminalnicotinic receptors on gabaergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci*, 13(6):2680–2688, Jun 1993.
- 78 Lopes Cristiane, Pereira Edna F R, Wu Hui-Qiu, Purushottamachar Puranik, Njar Vincent, Schwarcz Robert, and Albuquerque Edson X. Competitive antagonism between the nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine and kynurenic acid at alpha7* nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(1):48–58, Jul 2007. doi: 10.1124/jpet.107.123109. URL <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.107.123109>.
- 79 MacDermott A. B., Role L. W., and Siegelbaum S. A. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci*, 22:443–485, 1999. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.443. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.443>.
- 80 Mallya Meera, Campbell R. Duncan, and Aguado Begoña. Characterization of the five novel ly-6 superfamily members encoded in the mhc, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci*, 15(10):2244–2256, Oct 2006. doi: 10.1110/ps.062242606. URL <http://dx.doi.org/10.1110/ps.062242606>.
- 81 Mansvelder H. D. and McGehee D. S. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 27(2):349–357, Aug 2000.
- 82 McGehee D. S. and Role L. W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*, 57:521–546, 1995. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.002513. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.002513>.

- 83 McLaughlin J.; Sproul A. D. & Rosenberg R. L., J. T.; Fu. Role of the outer beta-sheet in divalent cation modulation of alpha7 nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, 70:16–22, 2006.
- 84 Miwa J. M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G. W., Sanchez R., Sali A., Role L. W., and Heintz N. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*, 23(1):105–14, May 1999. ISSN 0896-6273 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10402197. 5T32 GM07524/GM/United States NIGMS P01 NS30532/NS/United States NINDS Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. United States.
- 85 Miwa J. M., Stevens T. R., King S. L., Caldarone B. J., Ibanez-Tallon I., Xiao C., Fitzsimonds R. M., Pavlides C., Lester H. A., Picciotto M. R., and Heintz N. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron*, 51(5):587–600, Sep 7 2006. ISSN 0896-6273 (Print). URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16950157. AA 15632/AA/United States NIAAA CA 09673/CA/United States NCI DA 00436/DA/United States NIDA DA 15241/DA/United States NIDA DA 17279/DA/United States NIDA R21 NS 047751/NS/United States NINDS Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't United States.
- 86 Monod J., Wyman J., and Changeux J. P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol*, 12:88–118, May 1965.
- 87 Neher E. and Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802, Apr 1976.
- 88 Neher E. and Steinbach J. H. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol*, 277:153–176, Apr 1978.
- 89 Neher E., Sakmann B., and Steinbach J. H. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch*, 375(2):219–228, Jul 1978.
- 90 Ng Herman J, Whitemore Edward R, Tran Minhtam B, Hogenkamp Derk J, Broide Ron S, Johnstone Timothy B, Zheng Lijun, Stevens Karen E, and Gee Kelvin W. Nootropic alpha7 nicotinic receptor allosteric modulator derived from gabaa receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19):8059–8064, May 2007. doi: 10.1073/pnas.0701321104. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701321104>.

- 91 Orrenius Sten, Zhivotovsky Boris, and Nicotera Pierluigi. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7):552–565, Jul 2003. doi: 10.1038/nrm1150. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1150>.
- 92 Picciotto M. R., Zoli M., Léna C., Bessis A., Lallemand Y., Novère N. Le, Vincent P., Pich E. M., Brûlet P., and Changeux J. P. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, 374(6517):65–67, Mar 1995. doi: 10.1038/374065a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/374065a0>.
- 93 Picciotto M. R., Caldarone B. J., King S. L., and Zachariou V. Nicotinic receptors in the brain. links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*, 22(5): 451–465, May 2000. doi: 10.1016/S0893-133X(99)00146-3. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00146-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00146-3).
- 94 Plazas Paola V, Katz Eleonora, Gomez-Casati María E, Bouzat Cecilia, and Elgoyhen A. Belén. Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci*, 25(47):10905–10912, Nov 2005. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3805-05.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3805-05.2005>.
- 95 Ploug M. and Ellis V. Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. comparison to other members of the ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Lett*, 349(2):163–168, Aug 1994.
- 96 Popa Rodica V, Pereira Edna F R, Lopes Cristiane, Maelicke Alfred, and Albuquerque Edson X. The n-butylcarbamate derivative of galantamine acts as an allosteric potentiating ligand on alpha7 nicotinic receptors in hippocampal neurons: clinical implications for treatment of alzheimer’s disease. *J Mol Neurosci*, 30(1-2):227–232, 2006. doi: 10.1385/JMN:30:1:227. URL <http://dx.doi.org/10.1385/JMN:30:1:227>.
- 97 Probes Molecular. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Invitrogen Corporation, tenth edition edition, 2008. URL <http://probes.invitrogen.com/handbook/>.
- 98 Quik M., Choremis J., Komourian J., Lukas R. J., and Puchacz E. Similarity between rat brain nicotinic alpha-bungarotoxin receptors and stably expressed alpha-bungarotoxin binding sites. *J Neurochem*, 67(1):145–154, Jul 1996.
- 99 Ramirez-Latorre J., Yu C. R., Qu X., Perin F., Karlin A., and Role L. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, 380(6572): 347–351, Mar 1996. doi: 10.1038/380347a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/380347a0>.

- 100 Rathouz M. M. and Berg D. K. Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci*, 14(11 Pt 2):6935–6945, Nov 1994.
- 101 Revah F., Bertrand D., Galzi J. L., Devillers-Thiéry A., Mulle C., Hussy N., Bertrand S., Ballivet M., and Changeux J. P. Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*, 353(6347):846–849, Oct 1991. doi: 10.1038/353846a0. URL <http://dx.doi.org/10.1038/353846a0>.
- 102 Robbins T. W. Arousal systems and attentional processes. *Biol Psychol*, 45(1-3):57–71, Mar 1997.
- 103 Robbins T. W., McAlonan G., Muir J. L., and Everitt B. J. Cognitive enhancers in theory and practice: studies of the cholinergic hypothesis of cognitive deficits in alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, 83(1-2):15–23, Feb 1997.
- 104 Role L. W. and Berg D. K. Nicotinic receptors in the development and modulation of cns synapses. *Neuron*, 16(6):1077–1085, Jun 1996.
- 105 Schoepfer R., Conroy W. G., Whiting P., Gore M., and Lindstrom J. Brain alpha-bungarotoxin binding protein cdnas and mabs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*, 5(1):35–48, Jul 1990.
- 106 Séguéla P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J. A., and Patrick J. W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, 13(2):596–604, Feb 1993.
- 107 Shoop R. D., Chang K. T., Ellisman M. H., and Berg D. K. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J Neurosci*, 21(3):771–781, Feb 2001.
- 108 Sigworth F. J. and Neher E. Single na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature*, 287(5781):447–449, Oct 1980.
- 109 Smit A. B., Syed N. I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K. S., Lodder H., van der Schors R. C., van Elk R., Sorgedragger B., Brejc K., Sixma T. K., and Geeraerts W. P. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*, 411(6835):261–268, May 2001. doi: 10.1038/35077000. URL <http://dx.doi.org/10.1038/35077000>.

- 110 Steinlein O. K. and Bertrand D. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the genetic analysis to neurological diseases. *Biochem Pharmacol*, 76(10):1175–1183, Nov 2008. doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.012. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.012>.
- 111 Tassonyi Edömer, Charpantier Eric, Muller Dominique, Dumont Lionel, and Bertrand Daniel. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Res Bull*, 57(2):133–150, Jan 2002.
- 112 Tsetlin V. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem*, 264(2):281–286, Sep 1999.
- 113 Tsuji Hitomi, Okamoto Koichi, Matsuzaka Yasunari, Iizuka Hajime, Tamiya Gen, and Inoko Hidetoshi. Slurp-2, a novel member of the human ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris. *Genomics*, 81(1):26–33, Jan 2003.
- 114 Utsugisawa Kimiaki, Nagane Yuriko, Obara Daiji, and Tohgi Hideo. Over-expression of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor induces sustained erk phosphorylation and n-cadherin expression in pc12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 106(1-2):88–93, Oct 2002.
- 115 Valera S., Ballivet M., and Bertrand D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(20):9949–9953, Oct 1992.
- 116 Vernino S., Amador M., Luetje C. W., Patrick J., and Dani J. A. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron*, 8(1):127–134, Jan 1992.
- 117 Vizi E. S. and Lendvai B. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, 30(3):219–235, Nov 1999.
- 118 Wada E., Wada K., Boulter J., Deneris E., Heinemann S., Patrick J., and Swanson L. W. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, 284(2):314–335, Jun 1989. doi: 10.1002/cne.902840212. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902840212>.
- 119 Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ach receptors. *Trends Neurosci*, 20(2):92–98, Feb 1997.
- 120 Wonnacott Susan, Barik Jacques, Dickinson Jane, and Jones Ian W. Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters. *J Mol*

Neurosci, 30(1-2):137–140, 2006. doi: 10.1385/JMN:30:1:137. URL <http://dx.doi.org/10.1385/JMN:30:1:137>.

- 121** Woolf N. J. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol*, 37(6):475–524, 1991.
- 122** Zarei M. M., Radcliffe K. A., Chen D., Patrick J. W., and Dani J. A. Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 88(3):755–764, 1999.
- 123** Zwart R., Filippi G. De, Broad L. M., McPhie G. I., Pearson K. H., Baldwinson T., and Sher E. 5-hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology*, 43(3):374–384, Sep 2002.

A. Anhang

A.1. Chemikalien

Tabelle A.1.: Auflistung verwendeter Chemikalien und deren jeweilige Bezugsquelle

Chemikalien	Zulieferer
4-Amino-Pyridin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Acetylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Alpha-Bungarotoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
BAPTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carbogen	Linde AG, München, Deutschland
CdCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Choline-Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Collagenase 1A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CsCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNAse I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) F12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Epibatidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen, Mannheim, Deutschland
Firefly-siRNA	Invitrogen, Mannheim, Deutschland

Fortsetzung Tabelle A.1

Fura-2-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HiPerfect (Transfektionsreagenz)	Invitrogen, Mannheim, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lypd6-siRNA (Stealth 770, 5'GCC ACA UUU GCU ACC ACA UCA CCU A3'; 5'UAG GUG AUG UGG UAG CAA AUG UGG C3')	Invitrogen, Mannheim, Deutschland
Mecamylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methyllycaconitin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ H ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nikotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NMDA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin	Invitrogen, Mannheim, Deutschland
Poly-L-Lysin	Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland
Ryanodin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	Invitrogen, Mannheim, Deutschland
TEA-Hydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TTX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xestospongin	Merck, Darmstadt, Deutschland

A.2. Geräte

- Analog-Digital Wandler: ITC-16, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland
- Analysenwaage Voyager: Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
- Aufsichtmikroskop: Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Binokular: Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Begasungsbrutschrank HERACell CO₂: Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
- Bunsenbrenner: WLD-TEC GmbH, Göttingen, Deutschland
- CCD Kamera Sensicam: Imago CCD, T.I.L.L.-Photonics, Planegg, Deutschland
- Druckapplikationssystem: DAD-VC, ALA Scientific Instruments, NY 11590, USA
- Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 135, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Heizmagnetrührer Ikamag: Janke & Kunkel GmbH u. CoKG, Staufen, Deutschland
- Kühlschrank Liebherr Premium: Liebherr-Holding GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
- Kreiselpumpe: Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
- Mikromanipulator: Luigs und Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland
- Osmometer Vapro 5520: Wescor Inc, Logan, Utah, USA
- pH-Meter Cyberscan 500: Eutech Instruments, Nijkerk, Niederlande
- Elektroden-Puller: Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, Augsburg, Deutschland
- Schüttelbad: Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
- Sterilbank Laminar flow: Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
- Verstärker Axopatch 200A: Axon Instruments, Kalifornien, USA
- Verstärker Heka EPC10: HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland
- Vortexer VF2: IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
- Wasserbad MGW M20: Lauda-Königshofen, Deutschland
- Zentrifuge Megafuge 1.0R: Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland

A.3. Publikationen zu dieser Arbeit

Darvas M.*, Morsch M.*, Racz I., Ahmadi S., Swandulla D. and Zimmer A. (2008)
Lypd6: A novel modulator of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels.
Submitted to European Journal of Pharmacology

*The first two authors contributed equally to this work.

A.4. Danksagung

Allen voran möchte ich meiner Familie und meinen Freunden meinen ganz besonderen und herzlichen Dank aussprechen. Ohne Eure vielfältige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dieter Swandulla für seine fortwährende Unterstützung während meiner Arbeit und für die Möglichkeit in seinem Labor in der Physiologie Bonn promovieren zu dürfen. Die fachlichen Ratschläge für die Durchführung dieser Arbeit waren mir sehr wichtig und haben mir für die Anfertigung dieser Dissertation die entscheidende Richtung gegeben.

Mein herzlicher Dank geht an PD Dr. Seifollah Ahmadi, der mir immer mit großer Unterstützung zur Seite gestanden hat und die Zeit der Promotion hat angenehm vergehen lassen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas Zimmer & Dr. Martin Darvas für die Kooperation in diesem Projekt, die fachliche Unterstützung und Ihre konstruktiven Diskussionsvorschläge.

Auch meinen Institutskolleginnen und -kollegen Michael Wilhelm, Dr. Michael Hans, Joachim Sternberg, Christa Oleff, Prof. Dr. Rainer Meyer & Hanne Bock möchte ich meinen Dank aussprechen. Ebenfalls möchte ich mich bei der Feinmechanikwerkstatt der Physiologie II unter Leitung von Rolf Beck für ihre Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Horst Bleckmann danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und sie vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu vertreten. Auch Prof. Dr. Dieter Fürst und Prof. Dr. Andreas Zimmer gilt mein Dank für Ihre Funktion als Mitglieder der Prüfungskommission.

A.5. Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte, fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen sind ebenfalls als solche gekennzeichnet.