

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Klaus Unertl

Sektion „Experimentelle Anästhesiologie“

Leiter: Professor Dr. B. Antkowiak

**Die Hemmung der GABA-Wiederaufnahme im Zentralen
Nervensystem: Ein Prinzip für neue Wirkstoffe in der
Anästhesie?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Daniel Simon Razik
aus
Hindenburg/Polen

2010

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwarz

Diese Arbeit ist meinen Eltern Stefan und Maria Razik und meinen Geschwistern Sebastian und Lukas gewidmet. Sie bildeten ein familiäres Umfeld, das mein Interesse an Wissenschaft und Forschung prägte.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Anästhetika und GABA-Wiederaufnahme-Hemmer wirken über GABA-Rezeptoren	1
1.2. In welchem Umfang kann neuronale Aktivität durch eine Hemmung der GABA-Wiederaufnahme inhibiert werden?	5
1.3. Fragestellungen und methodischer Ansatz.....	6
1.4. Hypothesen zur Bedeutung von GABA-Transportern für die neuronale Aktivität in kultivierten Gewebeschnitten des Neokortex.....	8
2. Material und Methoden	11
2.1. Präparation und Kultivierung	11
2.2. Elektrophysiologie	12
2.3. Applikation der Testsubstanzen.....	13
2.4. Datenanalyse und statistische Auswertung	14
3. Ergebnisse.....	18
3.1. Kortikale Spontanaktivität unter Kontrollbedingungen	18
3.2. Kortikale Spontanaktivität unter Hemmung der GABA-Wiederaufnahme	20
3.3. Kortikale Spontanaktivität unter Hemmung der Wiederaufnahme von GABA und zusätzlicher Blockade der GABA _A -Rezeptoren.....	26
3.4. Kortikale Spontanaktivität unter Hemmung der Wiederaufnahme von GABA und zusätzlicher Blockade der GABA _B -Rezeptoren	29

4. Diskussion	34
4.1. Kortikale Spontanaktivität entsteht durch das Zusammenspiel von synaptischer Erregung und Hemmung	34
4.2. Kortikale Spontanaktivität reagiert sensitiv auf eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition	35
4.3. Ein Vergleich der Wirkung von NO-711 und gebräuchlichen Anästhetika	39
4.4. Kortikale Aktivität unter Blockade GABAerger Rezeptoren.....	41
4.5. GABA _A -Rezeptoren sind entscheidend für die Wirkungen von NO-711	42
4.6. Die Blockade von GABA _B -Rezeptoren verändert die Wirkung von NO-711.....	43
4.7. Hemmung von GABA-Transportern im klinischen Kontext: Heterotransport und tonische Ströme	44
4.8. Ausblick	47
5. Zusammenfassung.....	48
6. Quellenverzeichnis für Abbildungen.....	50
7. Literaturverzeichnis	51

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
ACSF	=	Artificial Cerebrospinal Fluid
ANOVA	=	Analysis Of Variance
ATP	=	Adenosintriphosphat
BGT	=	Betain/GABA-Transporter
Ca²⁺	=	Kalzium
CGP 55845	=	(2S)-3-(((1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl)amino-2-hydroxypropyl)(phenylmethyl)phosphinic acid
Cl⁻	=	Chlorid
CO₂	=	Kohlenstoffdioxid
EC₅₀	=	Konzentration des halbmaximalen Effekts
EPSP	=	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
et al.	=	et alii
(L)FP	=	(lokales) Feldpotenzial
FR	=	Feuerrate
GABA	=	Gamma-Amino-Buttersäure
GAT	=	GABA-Transporter
G-Protein	=	Guaninnucleotid-bindendes Protein
H₂O	=	Wasser
IC₅₀	=	Konzentration der halbmaximalen Hemmung
IPSC	=	inhibitorischer postsynaptischer Strom
K⁺	=	Kalium
Mg²⁺	=	Magnesium
Na⁺	=	Natrium
NaHCO₃	=	Natriumhydrogencarbonat
NaH₂PO₄	=	Natriumdihydrogenphosphat
NMDA	=	N-Metyhl-D-Aspartat
NO-711	=	1-(2-(((diphenylmethylene)amino)oxy)ethyl)-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridinecarboxylic acid hydrochloride
P3	=	postnatales Alter von 3 Tagen

PETH	=	Peri-Event-Time-Histogramm
R²	=	Bestimmtheitsmaß
R²_{adj}	=	korrigiertes Bestimmtheitsmaß
RelZeit_{aktiv}	=	Anteil der Aufnahmedauer, in dem die Netzwerke aktiv sind
SD	=	Standardabweichung
Spx	=	Spikes (Aktionspotenziale)
Tab.	=	Tabelle
THIP	=	4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridin-3-ol
TM	=	transmembran
ZNS	=	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Anästhetika und GABA-Wiederaufnahme-Hemmer wirken über GABA-Rezeptoren

Klinisch gebräuchliche Anästhetika induzieren Bewusstlosigkeit und schalten Schmerzreflexe aus, indem sie die Aktivität von Nervenzellen in Gehirn und Rückenmark vermindern. Auf der molekularen Ebene interagieren Anästhetika mit GABA_A-Rezeptoren, die durch den hemmenden Botenstoff γ -Aminobuttersäure (GABA) aktiviert werden.

GABA_A-Rezeptoren sind Heteropentamere, die aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind. Bekannt sind sechs α -, drei β -, drei γ -, eine δ -, eine ϵ -, eine θ -, eine π - und drei ρ -Untereinheiten, wobei zumeist zwei α - und zwei β -Untereinheiten am Aufbau eines GABA_A-Rezeptors beteiligt sind (Drexler et al., 2006) (Abb. 1).

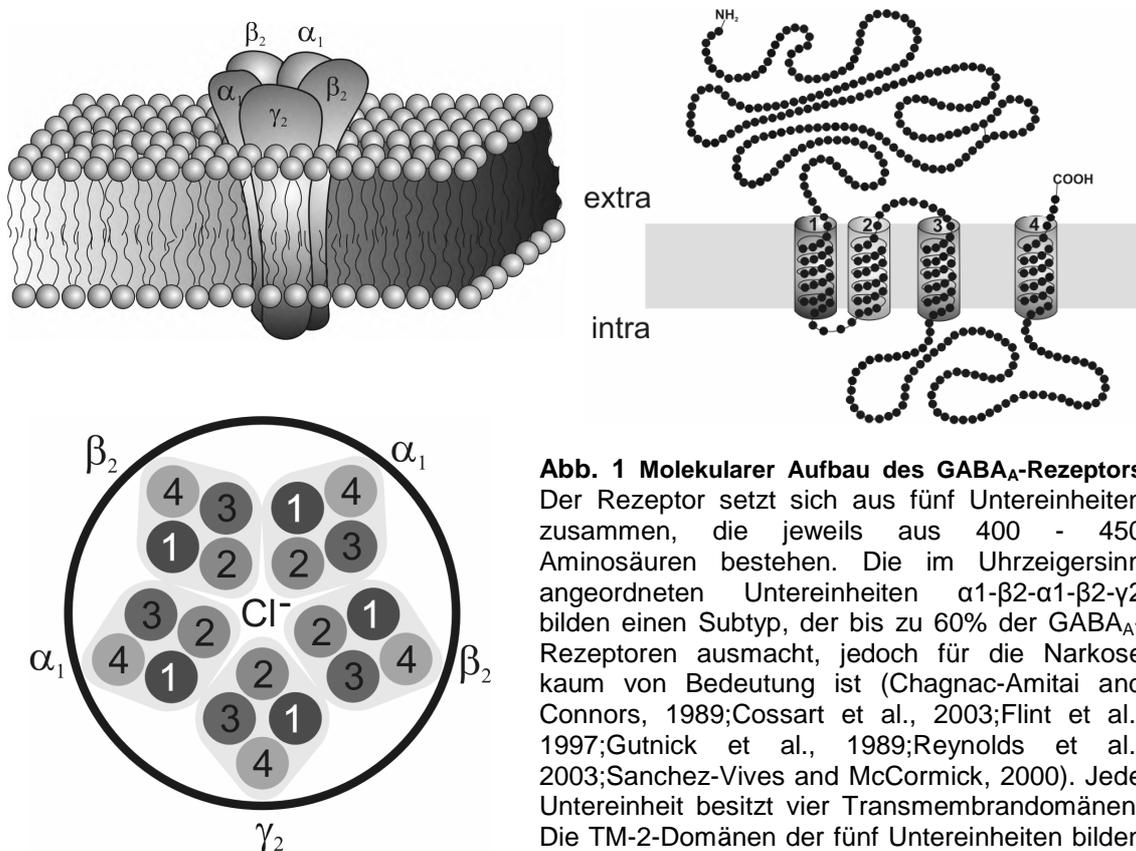


Abb. 1 Molekularer Aufbau des GABA_A-Rezeptors
Der Rezeptor setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen, die jeweils aus 400 - 450 Aminosäuren bestehen. Die im Uhrzeigersinn angeordneten Untereinheiten α_1 - β_2 - α_1 - β_2 - γ_2 bilden einen Subtyp, der bis zu 60% der GABA_A-Rezeptoren ausmacht, jedoch für die Narkose kaum von Bedeutung ist (Chagnac-Amitai and Connors, 1989; Cossart et al., 2003; Flint et al., 1997; Gutnick et al., 1989; Reynolds et al., 2003; Sanchez-Vives and McCormick, 2000). Jede Untereinheit besitzt vier Transmembrandomänen. Die TM-2-Domänen der fünf Untereinheiten bilden die Pore des Chloridkanals.

Als ligandengesteuerte Ionenkanäle (Abb. 1 und Abb. 2) weisen GABA_A-Rezeptoren zwei Bindungsstellen für GABA, sowie weitere Bindungsstellen für Anästhetika auf (Drexler et al., 2006;Grasshoff et al., 2005;Grasshoff et al., 2006). Besetzt ein Anästhetikum seine Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor, ohne dass gleichzeitig GABA am Rezeptor gebunden ist, bleibt der Ionenkanal geschlossen. Ist die Anästhetika-Bindungsstelle jedoch besetzt und bindet GABA an den Rezeptor, wird durch die Präsenz des Anästhetikums der durch GABA induzierte inhibitorische postsynaptische Strom (IPSC) verstärkt (Drexler et al., 2006). Man bezeichnet diesen für Anästhetika typischen Mechanismus als eine positiv modulatorische Wirkung am GABA_A-Rezeptor (Abb. 3). Da Anästhetika nur modulatorisch wirken und den GABA_A-Rezeptor nicht direkt aktivieren können, begrenzt die Verfügbarkeit von GABA die Wirksamkeit von Allgemeinanästhetika. Die Verfügbarkeit von GABA ist wiederum von zwei wesentlichen Faktoren abhängig. Zum einen von der Aktionspotenzialaktivität GABAerger Neurone, die den hemmenden Neurotransmitter freisetzen, sowie von der Aktivität von Wiederaufnahme-Transportern, die den Neurotransmitter GABA aus dem Extrazellulärraum entfernen. Für die Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse stehen vier Subtypen von GABA-Transportern (GAT-1, GAT-2, GAT-3 und BGT-1), die in der Ratte klassifiziert wurden, zur Verfügung (Borden, 1996). GAT-1 ist vor allem synaptisch auf Neuronen lokalisiert, wohingegen GAT-2 und GAT-3 überwiegend extrasynaptisch vorkommen (Borden, 1996;Conti et al., 2004) (Abb. 4). Besonders dem GAT-1, der über den Natriumgradienten

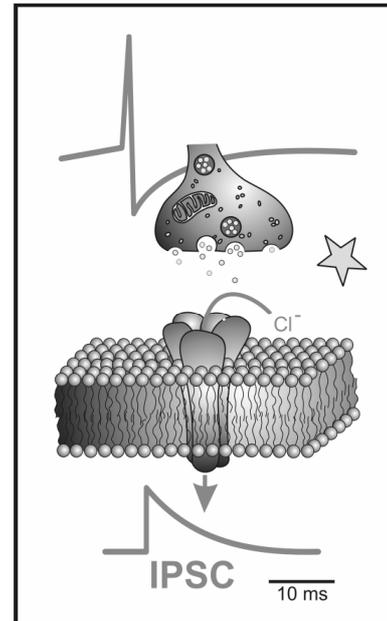


Abb. 2 Die Entstehung von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs)
 Erreicht ein im Soma ausgelöstes Aktionspotenzial das Ende des Axons eines GABAergen Neurons, wird GABA freigesetzt. Dieses bindet an postsynaptische GABA_A-Rezeptoren. Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren bewirkt den Einstrom von Chloridionen in die postsynaptische Zelle.

elektrogenen 1 GABA : 2 Na⁺ : 1 Cl⁻ transportiert, wird eine wichtige Rolle bei der Regulierung der extrasynaptischen GABA-Konzentration zugestanden (Frahm et al., 2001).

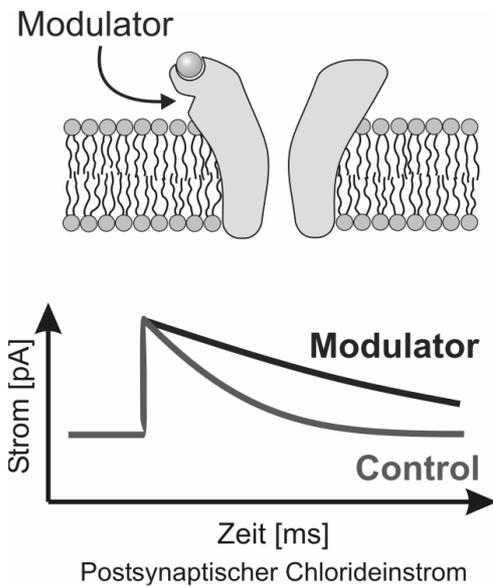


Abb. 3 Modulatoren des GABA_A-Rezeptors Viele Anästhetika wirken als Modulatoren der GABA_A-Rezeptoren und erhöhen den durch die GABA-GABA_A-Rezeptoren-Bindung erzeugten postsynaptischen Chlorideinstrom (Kontrolle), indem sie z.B. die IPSC-Abklingzeit verlängern (Modulator).

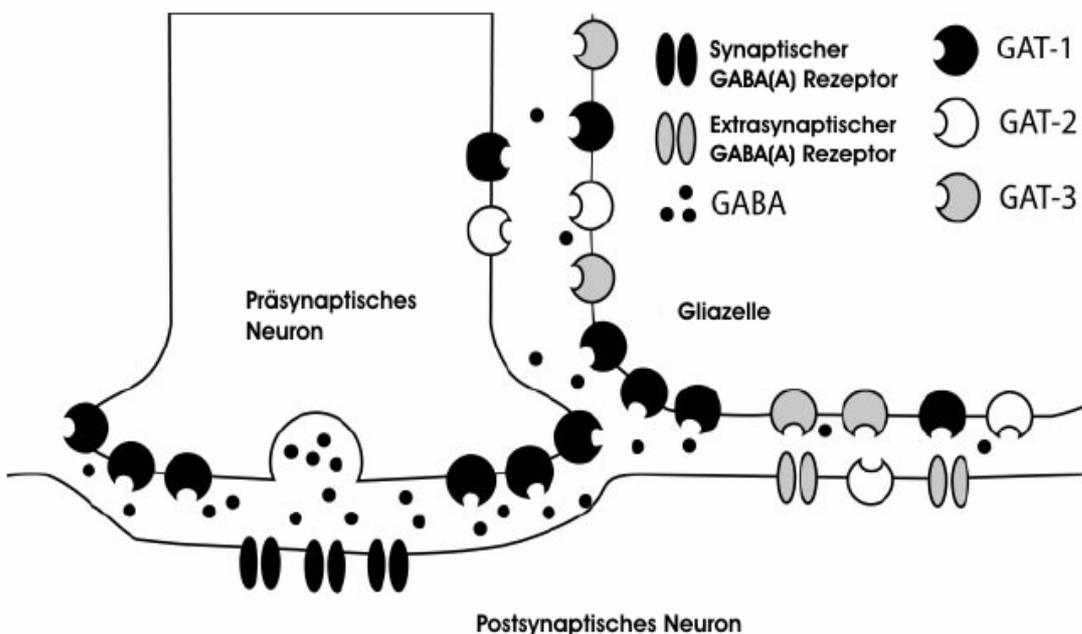


Abb. 4 Lokalisation der GAT-Subtypen Den größten Anteil der GABA-Transporter bildet der Subtyp GAT-1, der vorwiegend synaptisch auf Neuronen und Gliazellen lokalisiert ist. GAT-2/3 werden vor allem extrasynaptisch auf Gliazellen und Neuronen exprimiert. Sie nehmen das aus der Synapse diffundierende GABA in präsynaptische Neuronen und Gliazellen auf.

Was geschieht nach einer Phase der erhöhten GABA-Freisetzung, wenn GABA-Transporter pharmakologisch gehemmt wurden und deshalb weniger effizient arbeiten? Bei einer Hemmung der GABA-Wiederaufnahme wird es länger dauern, bis der überschüssige Neurotransmitter aus dem Extrazellulärraum entfernt ist. Treten Phasen der erhöhten GABA-Freisetzung im Gehirn häufig auf, stehen die Freisetzung und Wiederaufnahme von GABA in einem dynamischen Fließgleichgewicht. In diesem Fall wird es zu einer dauerhaften Erhöhung der extrazellulären GABA-Konzentration kommen, wenn GABA-Transporter gehemmt werden. Durch die Erhöhung der extrazellulären GABA-Konzentration sollten mehr GABA-Rezeptoren aktiviert werden, was eine Verminderung der neuronalen Aktivität und Erregbarkeit bewirkt. Der skizzierte Mechanismus kann die Wirkungsweise von Tiagabin erklären, einem Blocker von GABA-Transportern, der zur Behandlung von Epilepsiepatienten klinisch eingesetzt wird (Borden, 1996;Genton et al., 2001;Hoffman, 2005;Morimoto et al., 1997). Pharmaka wie Tiagabin, die GABA-Transporter blockieren und gebräuchliche Anästhetika wie Propofol und Etomidate unterscheiden sich demnach darin, dass erstere die extrazelluläre Präsenz von GABA erhöhen, während letztere die Wirkung von GABA am GABA_A-Rezeptor verstärken. Beiden Substanzgruppen ist gemeinsam, dass sie im zeitlichen Mittel dafür sorgen, dass mehr GABA_A-Rezeptoren geöffnet sind, wodurch die Erregbarkeit von Nervenzellen vermindert wird. Hieraus kann gefolgert werden, dass prinzipiell auch Blocker des GABA-Transports in der Anästhesie zur Ausschaltung von Bewusstsein und Schmerzreflexen eingesetzt werden können.

Welche potentiellen Vorteile bietet der Einsatz von Blockern der GABA-Transporter in der Anästhesie? Die heute klinisch verwendeten Anästhetika weisen schwerwiegende Nebenwirkungen auf (Schulte am Esch et al., 2007). Mit einiger Wahrscheinlichkeit zeigen Blocker der GABA-Transporter ein anderes Spektrum an Nebenwirkungen, was für einen Teil der Patientenkollektivs von Vorteil sein könnte. Eine andere Möglichkeit besteht in der gleichzeitigen Verabreichung von Anästhetika und GABA-Transporter-Blockern. Durch eine Hemmung der GABA-Wiederaufnahme werden, wie

weiter oben beschrieben, zusätzliche GABA_A-Rezeptoren durch den natürlichen Liganden GABA aktiviert, die dann zusätzlich für die positiv modulatorischen Wirkungen von Anästhetika verfügbar sind. Es ist zu erwarten, dass bei kombinierter Verabreichung von GABA-Transporter-Blockern und von Anästhetika ein Synergismus entsteht, der dazu führt, dass die für die Erzielung der klinisch gewünschten Effekte notwendigen Dosierungen deutlich vermindert werden können. Die positive Konsequenz wäre eine Abschwächung der Nebenwirkungen.

1.2. In welchem Umfang kann neuronale Aktivität durch eine Hemmung der GABA-Wiederaufnahme inhibiert werden?

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass Narkosemittel die Aktionspotenzialaktivität kortikaler Neurone um ca. 50% hemmen, wenn Anästhetika in einem Konzentrationsbereich appliziert werden, die bei der Hälfte der Patienten Bewusstlosigkeit verursacht (Antkowiak, 1999; Antkowiak and Helfrich-Förster, 1998; Hentschke et al., 2005). Es ist zurzeit völlig unklar, ob ein quantitativ vergleichbarer Effekt auch durch die Blockade von GABA-Transportern erreicht werden kann. So wird in einer publizierten tierexperimentellen Studie berichtet, dass eine hohe Dosis des spezifischen GABA-Transporter-Blockers NO-711 den Aufrichtreflex bei Mäusen, ein in verhaltenspharmakologischen Studien gängiges Korrelat für Bewusstsein, nicht zu unterdrücken vermag (Katayama et al., 2007). Zudem wurde nach intraperitonealer Injektion von NO-711 nur ein moderater Anstieg der extrazellulären GABA-Konzentration im Hippokampus beobachtet. In der gleichen Arbeit wird berichtet, dass nach Injektion des GABA-Transaminasehemmers Gabaculin die extrazelluläre GABA-Konzentration im Gehirn dramatisch anstieg und der Aufrichtreflex der Versuchstiere unterdrückt wurde. Dieses Ergebnis wiederum impliziert, dass über eine Erhöhung der extrazellulären GABA-Konzentration im Zentralnervensystem ein Zustand der Anästhesie tatsächlich induziert werden kann.

Die Ursachen für die in den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen beobachtete geringe Wirksamkeit von NO-711 sind nicht bekannt. Hierbei kann insbesondere die Pharmakokinetik dieses Wirkstoffes eine Rolle spielen. Doch auch die derzeit verfügbaren In-vitro-Studien zur Wirkung von NO-711 liefern kaum Hinweise, in welchem Umfang GABA-Transporter die neuronale Aktivität auf der Zell- und Netzwerkebene kontrollieren. Intrazelluläre Messungen in vitro haben zwar gezeigt, dass NO-711 an Neuronen inhibitorische Ströme hauptsächlich über die Akkumulation und Diffusion von GABA an extrasynaptische GABA-Rezeptoren steigert (González-Burgos et al., 2009; Keros and Hablitz, 2005; Nusser and Mody, 2002; Semyanov et al., 2003), doch fehlen entsprechende Experimente zur Frage, wie hierdurch die Erregbarkeit und Aktionspotenzialaktivität der Neurone verändert wird.

1.3. Fragestellungen und methodischer Ansatz

Nervenzellen des zerebralen Kortex sind für die sedierenden, hypnotischen und amnestischen Wirkungen gebräuchlicher Anästhetika von zentraler Bedeutung. Verschiedene klinisch gebräuchliche Anästhetika dämpfen die Aktivität dieser Nervenzellen, indem sie die durch GABA induzierte Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren potenzieren (Drexler et al., 2006). Anästhetika, die eine vergleichbare Wirkung durch eine Erhöhung der extrazellulären GABA-Konzentration erzielen, sind gegenwärtig nicht bekannt. Solche Wirkstoffe wären aber in der Anästhesie eine interessante therapeutische Option.

Die zentralen Fragen der vorliegenden Arbeit lauten: In welchem Umfang sind GABA-Transporter an der Kontrolle der Aktivität kortikaler Neurone beteiligt? Führt eine weitgehende Hemmung dieser Transporter zu einer deutlichen Unterdrückung der Aktionspotenzialaktivität oder sind diese Transporter für die Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit nur von untergeordneter Bedeutung? Von besonderem Interesse ist der direkte Vergleich der Wirkung von Blockern des GABA-Transports mit den Wirkungen gebräuchlicher Anästhetika: Lässt sich durch erstere die Erregbarkeit kortikaler

Neurone in einem Umfang hemmen, der quantitativ den Wirkungen gebräuchlicher Anästhetika entspricht, wenn diese in klinisch relevanten Konzentrationen eingesetzt werden? Da die vorliegende Arbeit an einer In-vitro-Präparation durchgeführt wurde, an der bereits die Effekte zahlreicher Anästhetika unter identischen experimentellen Bedingungen charakterisiert worden sind, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit direkt mit den Wirkungen dieser Anästhetika verglichen werden. Schließlich wurde in einer weiteren Serie von Experimenten die Frage aufgeworfen, durch welche Typen von GABA-Rezeptoren Änderungen des GABA-Transports in Änderungen der Aktionspotenzialaktivität kortikaler Neurone übersetzt werden. Hier kommen GABA_A-Rezeptoren ebenso in Frage wie GABA_B-Rezeptoren (González-Burgos et al., 2009). Letztere zählen zur Klasse der metabotropen Rezeptoren (Calver et al., 2002).

Zur pharmakologischen Modifikation der Effizienz des GABA-Uptakes in kultivierten neokortikalen Gewebeschnitten wurde NO-711 eingesetzt, ein hochspezifischer GAT-1-Blocker, der die synaptische Wiederaufnahme von GABA mit einer sehr niedrigen IC₅₀ (Konzentration eines Inhibitors, bei der die halbmaximale Inhibition auftritt) von 47 nM hemmt (Suzdak et al., 1992). Die Experimente wurden an kultivierten (organotypischen) Gewebeschnitten des Neokortex durchgeführt, da aufgrund einer hohen intrinsischen synaptischen Konnektivität (Abb. 5) in diesem Präparat spontane Aktionspotenzialaktivität auftritt und GABA beständig freigesetzt wird. Allerdings fehlen diesen Gewebekulturen im direkten Vergleich zur Situation in vivo die erregenden subkortikalen Eingänge, weshalb die mittlere Rate, mit der die kultivierten Neurone Aktionspotenzial generieren, vergleichsweise niedrig ist. Um in vivo-ähnliche Aktivitätsraten zu induzieren, wurde deshalb die extrazelluläre Magnesiumkonzentration vermindert, was zu einer NMDA-Rezeptor-abhängigen Depolarisierung und tonischen Aktivierung der Nervenzellen führt (Flint and Connors, 1996). Die Einstellung in vivo-ähnlicher Aktivitätsraten war ein kritischer Aspekt der Experimente, da erwartet wurde, dass unter der Bedingung geringer Aktivitätsraten, wie sie beispielsweise in akut isolierten Gewebeschnitten in aller Regel beobachtet werden, eine nur geringe

Freisetzung von GABA stattfindet. Wird aber nur wenig GABA freigesetzt, ist kaum zu erwarten, dass sich durch die pharmakologische Modifikation des GABA-Transports die Erregbarkeit der Neurone signifikant verändern lässt. Sind diese Überlegungen zutreffend, dann ist die Beseitigung von GABA aus dem Extrazellulärraum besonders dann ein kritischer Faktor, wenn viel GABA freigesetzt wird.

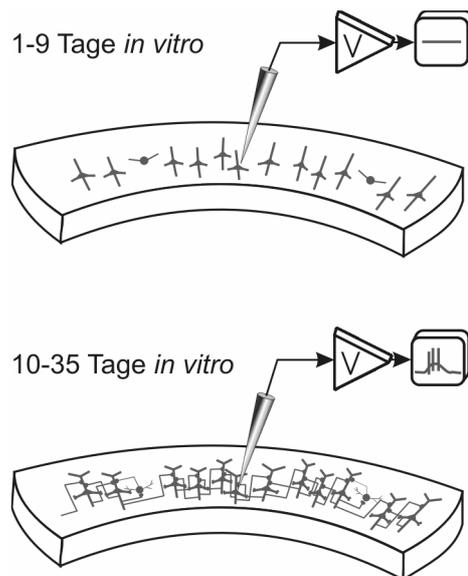


Abb. 5 Entwicklung von kultivierten Gehirnschnitten Zum Zeitpunkt der Organentnahme existieren nur wenige synaptische Verbindungen zwischen den Nervenzellen. Während der ersten 9 Tage ex vivo wachsen die Axone aus und es kommt zur Bildung zahlreicher Synapsen. Die wachsende Zahl an Synapsen führt dazu, dass die Neurone spontan Aktionspotenziale generieren.

1.4. Hypothesen zur Bedeutung von GABA-Transportern für die neuronale Aktivität in kultivierten Gewebeschnitten des Neokortex

Spontane Aktivität in neokortikalen Netzwerken in vitro besteht überwiegend aus einem Wechselspiel von „Up“ und „Down“ Zuständen (states), also Phasen hoher bzw. sehr niedriger neuronaler Aktivität (Shu et al., 2003). Up states sind durch schnelle Abfolgen von Aktionspotentialen gekennzeichnet, die üblicherweise als „Bursts“ bezeichnet werden; daher werden im Folgenden Up state und Burst synonym verwendet. Up states entstehen durch spontane, Aktionspotential-unabhängige synaptische Transmitterfreisetzung, die zunächst in einzelnen Neuronen überschwellige Erregung produziert, welche wiederum

nach wenigen Millisekunden Aktionspotenzialaktivität in weiten Bereichen des kortikalen Netzwerks zündet (Maeda et al., 1995;Robinson et al., 1993). Während eines Up states befinden sich die exzitatorischen und inhibitorischen Leitfähigkeiten im Gleichgewicht (Haider et al., 2006). Es ist anzunehmen, dass vor allem bei solch hoher Aktivität des neokortikalen Netzwerks die Hemmung des GABA-Transports durch NO-711 eine Akkumulation von freigesetztem GABA im synaptischen Spalt bewirkt. Bei ausreichender synaptischer Dichte könnte diffundierendes GABA die GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren umgebender Synapsen aktivieren, was als „cross talk“ bezeichnet wird (Clements, 1996;Mody et al., 1994;Overstreet and Westbrook, 2003). Auch könnte akkumulierendes GABA in den extrasynaptischen Raum diffundieren (Fink-Jensen et al., 1992) und extrasynaptische GABA-Rezeptoren aktivieren (Mody and Pearce, 2004;Scimemi et al., 2006;Semyanov et al., 2003;Semyanov et al., 2004). Auf der anderen Seite könnte die Akkumulation von GABA eine Reduktion inhibitorischer Ströme bewirken, falls aufgrund der hohen GABA-Konzentration synaptische GABA-Rezeptoren desensibilisieren würden (Keros and Hablitz, 2005;Overstreet et al., 2000)

Auf das gesamte Netzwerk übertragen, bedeutet dies, dass die Nettoeffekte einer Hemmung der GABA-Wiederaufnahme auf spontane neuronale Aktivität vielfältig und teilweise entgegengesetzt sein könnten. Eine leichte Hemmung des GABA-Uptakes mit NO-711 könnte nach Beginn eines Up states eine leichte Akkumulation von GABA im synaptischen Spalt und folglich eine Verstärkung der inhibitorischen Ströme (IPSCs) bewirken. Dies sollte die Feuerraten innerhalb der Up states reduzieren. Eine starke Hemmung der GABA-Wiederaufnahme könnte über verstärkte Akkumulation und Diffusion von GABA aus dem synaptischen Spalt cross talk erzeugen und extrasynaptische GABA-Rezeptoren aktivieren und auf diese Weise das neokortikale Netzwerk in einen weniger erregbaren Zustand bringen, so dass die Entstehung von Aktivität erschwert werden würde. Eine Konsequenz hieraus könnte eine Reduktion der Frequenz der Up states sein. Zusätzlich würden die Effekte von diffundierendem GABA mit einer zeitlichen Latenz in Erscheinung treten und sich möglicherweise in einer Burstverkürzung

widerspiegeln. Wenn jedoch eine Hemmung der GABA-Wiederaufnahme zu einer permanent erhöhten GABA-Konzentration führt, ist zu erwarten, dass synaptische Rezeptoren zumindest teilweise desensibilisieren und somit bei Ausschüttung von GABA zu Beginn eines Bursts nicht zur Verfügung stehen. Dies wiederum sollte, ohne zeitliche Verzögerung, inhibitorische Ströme verringern und somit Feuerraten erhöhen. Die Experimente der vorliegenden Arbeit – Messung spontaner Aktivität in kortikalen Netzwerken in vitro (organotypische Kulturen) – dienen der Überprüfung dieser Hypothesen.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation und Kultivierung

Für die Präparation des Neokortex wurden Ratten in einem postnatalen Alter von 3 Tagen (P3) ausgewählt und mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) anästhesiert bis keine Schmerzreflexe mehr auszulösen waren. Nach der Enthauptung wurde das Gehirn herausgenommen und in eine Petrischale mit eiskalter Gey's Balanced Salt Lösung (Sigma, Deutschland) überführt. Anschließend wurde die Dura vom Gehirn abgezogen. Das Gehirn wurde auf einen Teflonblock mit Sekundenkleber aufgeklebt und es wurden Schnitte mit einer Dicke von ca. 350 µm mit Hilfe eines Vibroslicers (Campden Instruments, Loughborough, England) angefertigt. Die kurzzeitige Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C bis die Schnitte mit 13 µl Plasma (Sigma) und

Tab. 1 Zusammensetzung des Nährmediums (406 ml)

Menge [ml]	Substanz
100	Pferdeserum (Gibco)
100	Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma)
4	Glukose 50 % (Sigma)
2	L-Glutamin (Sigma)
200	Basal Medium Eagle (Sigma)

13 µl Thrombin (Sigma) auf Deckgläsern (Kindler, Freiburg, Deutschland) fixiert werden konnten. Die Kulturen kamen in Kulturröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland), die danach mit 750 µl Nährmedium (Tab. 1)

befüllt und anschließend bei 36 °C mit Raumluft mit einem Anteil von 5 % Kohlenstoffdioxid begast wurden. Inkubiert wurden die Schnitte bei 36 °C in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei kontinuierlicher Drehung (ca. 10 U/h; „Roller-tube“-Technik) (Gähwiler, 1981). Zweimal wöchentlich erfolgte ein Medienwechsel mit wöchentlicher Zytostatikazugabe (10 µl) (5-Fluor-2-Deoxyuridin, Cytosin-b-D-Arabino-Furanosid, Uridin; Sigma). Nach jedem Medienwechsel wurden die Kulturen unter oben genannten Bedingungen begast (Abb. 6).

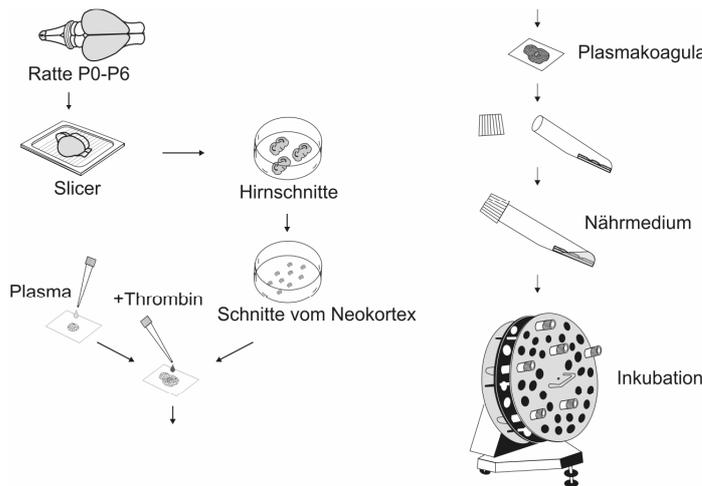


Abb. 6 Präparation und Kultivierung Unter tiefer Anästhesie wurde eine Ratte (P3) getötet um das Gehirn zu entnehmen. Mit Hilfe eines Slicers wurden 350 µm dicke neokortikale Schnitte angefertigt, die mit Plasma und Thrombin (je 13 µl) auf Deckgläsern fixiert wurden. Diese kamen in ein mit Nährmedium (750 µl) gefülltes Kulturröhrchen, um anschließend im Brutschrank bei kontinuierlicher Drehung begast zu werden (Raumluft mit 5 % CO₂ bei 37 °C). Das Nährmedium wurde zweimal pro Woche erneuert, bei wöchentlicher Zytostatikagabe (10 µl).

2.2. Elektrophysiologie

Extrazelluläre Ableitungen wurden an zwei verschiedenen Messapparaturen mit einem inversen (Axiovert 135M; Zeiss, Deutschland) oder einem aufrechten Mikroskop (Axioskop 2; Zeiss) durchgeführt. Gehirnschnitte, die sich in der

Badkammer der Messapparatur befanden, wurden über eine Peristaltikpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit artifizieller zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF, Tab. 2) mit einer Durchlaufrate von 1 ml/min umspült. Begast wurde die ACSF mit Carbogen (95 % Sauerstoff + 5 % Kohlenstoffdioxid). Die Temperatur in der

Tab. 2 Zusammensetzung der ACSF

Substanz (Sigma)	Konzentration [mmol/l]
NaCl	120,00
KCl	3,30
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1,13
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,20
NaHCO ₃	26,00
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,80
D-Glukose	11,00

Badkammer betrug 34 - 36 °C. Die Messelektroden hatten einen ohmschen Widerstand von 1 - 2 MΩ und waren mit ACSF befüllt. Die endgültige Positionierung von zwei Messelektroden im Gewebe richtete sich nach der

Stärke der neuronalen Signale, die mit Hilfe zweier Lautsprecher (ein Lautsprecher pro Elektrode) akustisch wiedergegeben wurden. Ebenso konnte die Signalstärke mit Hilfe von AxoScope 9 (Axon Instruments, USA) bzw. ClampEx (Axon Instruments) bewertet werden.

Diese Programme zeigten die Signale in Form von Aktionspotenzialen an, deren Amplitude mindestens ca. 100 μV betragen sollte. Da an zwei unterschiedlichen Messapparaturen gemessen wurde, kamen zwei verschiedene Verstärker zum Einsatz (Model 1800; A-M Systems, USA und Multi Clamp 700A, Axon Instruments). Die Signale wurden um den Faktor 1000 verstärkt und zwischen 1 Hz und 5 kHz gefiltert. Die Sampling-Rate betrug 10 kHz. Mit Hilfe des Programms AxoScope 9 (Axon Instruments) bzw. ClampEx (Axon Instruments) und der Digitalisierungskarte Digidata 1200 (Axon Instruments) konnten die gemessenen Signale digital aufgenommen werden.

2.3. Applikation der Testsubstanzen

Alle Substanzen und Substanzkombinationen wurden per Spritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), die von Spritzenpumpen (Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) angetrieben wurden, über Teflonschläuche appliziert. Die Durchlaufrate betrug 1 ml/min. Vor jeder Messung wurden die entsprechenden Substanzen ca. 15 min eingewaschen und vor jeder Auswaschmessung wurden sie mindestens 30 min mit ACSF ausgewaschen.

Um die Dosis-Wirkungs-Kurve für NO-711 (Sigma) erstellen zu können, wurde NO-711 (Abb. 7) in ansteigenden Konzentrationen appliziert. Des Weiteren wurde NO-711 in zwei weiteren Experimentreihen zusammen mit 100 μM Bicucullin (Sigma), einem GABA_A-Rezeptoren-Blocker, bzw. 10 μM CGP 55845, einem GABA_B-Rezeptoren-Blocker (Tocris/Biotrend), appliziert.

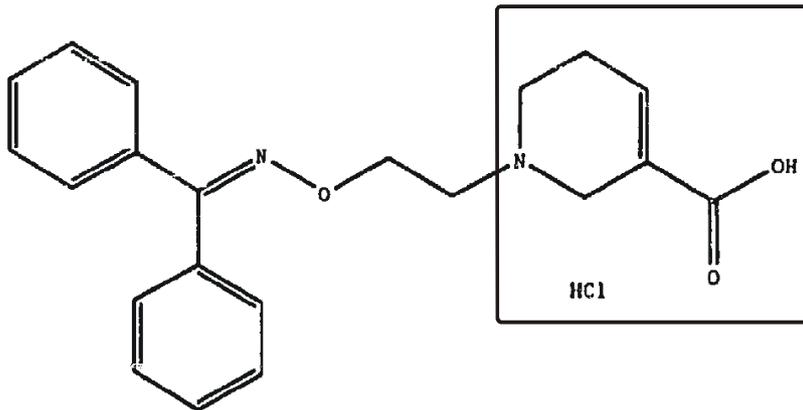


Abb. 7 Strukturformel von NO-711 Die Substanz Guvacin (Kasten) bildet das Grundgerüst von NO-711.

2.4. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe des Programms Matlab 6.5 (The MathWorks, Natick, USA) durchgeführt. Für die Feuerraten-Analyse wurden die Rohsignale zwischen 300 Hz und 3 kHz gefiltert. Durch das visuelle Festlegen eines bestimmten Schwellenwerts wurden nur diejenigen Signalausschläge als Aktionspotenziale klassifiziert, die diesen Schwellenwert auch erreichten. Aus der in einer Aufnahme detektierten Aktionspotenzialanzahl und der Aufnahmedauer wurde die mittlere Feuerrate berechnet.

Die detektierten Aktionspotenziale konnten für eine Burstanalyse herangezogen werden. Gruppen von Aktionspotenzialen wurden zu einem Burst zusammengefasst, wenn sie folgende Kriterien erfüllten: i) am Beginn eines Bursts mussten zwei Aktionspotenziale in weniger als 10-100 ms aufeinander erfolgen; ii) alle nachfolgenden Aktionspotenziale mussten in weniger als 300-1000 ms aufeinander folgen; iii) vor dem Beginn eines Bursts musste eine neuronale Ruhephase von 1000 ms Dauer mit maximal drei Aktionspotenzialen existieren; iv) die Dauer eines Bursts durfte 10 ms nicht unterschreiten. Über die Anzahl der so detektierten Bursts und die Aufnahmedauer wurde die Burstfrequenz in der jeweiligen Aufnahme berechnet. Auch wurde die mittlere Burstlänge, das mittlere Zeitintervall zwischen den Bursts ($\text{Zeitintervall}_{\text{interburst}}$) und der Anteil der Aufnahmedauer, in dem sich die

Netzwerke im aktiven Zustand befanden ($RelZeit_{aktiv}$), ermittelt. Des Weiteren wurden die Aktionspotenzial-Bursts zur Generierung der „Peri-Event-Time“-Histogramme (PETH) verwendet, in denen mit einer bestimmten Binbreite die zeitliche Verteilung der Aktionspotenziale (Spikes) innerhalb der Bursts ermittelt wurde. Zeitpunkt $t = 0$ ms war der erste Spike pro Burst und das Histogramm erstreckte sich von 0 - 500 ms. Die Histogramme wurden über alle Bursts einer Aufnahme gemittelt, um die mittlere Anzahl an Spikes pro Bin zu erhalten. Im letzten Schritt wurden die Bins von 0 - 40 ms und jene von 100 - 500 ms gemittelt, womit man eine „frühe“ Feuerrate (unmittelbar nach Beginn eines Bursts) und eine „späte“ Feuerrate erhielt.

Wurden die Rohsignale mit einem Tiefpass-Filter von 100 Hz gefiltert, kamen lokale Feldpotenziale (LFP) zum Vorschein. In Aufnahmen, in denen langsame, durch rhythmisch schwankende Badspiegel hervorgerufene Artefakte zu sehen waren, wurden die Signale mit einem Hochpass-Filter von 4 Hz gefiltert. Weiterhin wurden Interferenzen aus dem Stromnetz ("Netzbrummen") mit einem Sperrfilter (-3 dB Frequenzen 49 und 51 Hz) herausgefiltert und die Abtastrate um den Faktor 10 (auf 1000 Hz) reduziert. Die Detektion von Feldpotenzial-Bursts erfolgte analog zur Detektion von Aktionspotenzial-Bursts. Ein ausgewählter Schwellenwert entschied darüber, welche Feldpotenzialausschläge zu einem Burst zusammengefasst wurden (Abb. 8). Auch hier mussten die Feldpotenziale eine zuvor festgesetzte Mindestlänge erreichen, um als Bursts erfasst zu werden. Ein weiteres Kriterium war der Zeitabstand zwischen Feldpotenzial-Spitzen, die den Schwellenwert überschritten. Zur besseren Detektion wurden die Beträge der Feldpotenziale analysiert (bildlich gesprochen wurden die negativen Anteile der Feldpotenziale „hochgeklappt“, (Abb. 8). Auf diese Weise wurden die Burstfrequenz, die durchschnittliche Burstlänge, die $RelZeit_{aktiv}$ und das Zeitintervall $_{interburst}$ ermittelt. Die statistische Auswertung mit t-Tests erfolgte je nach Datenlage entweder über verbundene oder über unverbundene

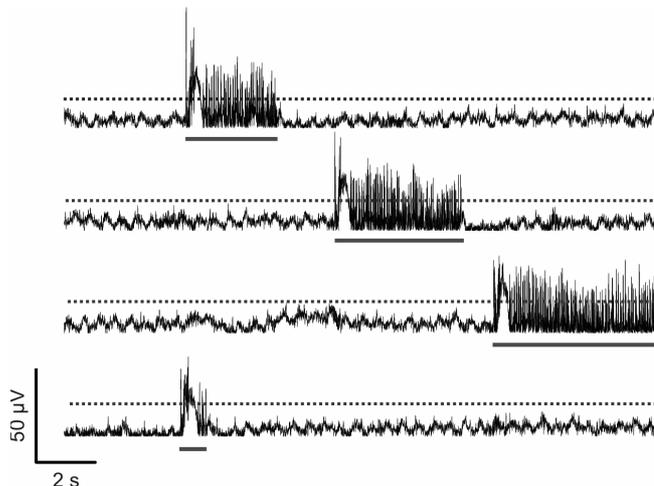


Abb. 8 Feldpotenziale (Filter: 1 - 100 Hz) Die negativen Anteile der Feldpotenziale wurden „hochgeklappt“. Die gestrichelte Linie bildete den Schwellenwert, der von Feldpotenzialen erreicht werden musste, damit diese als Bursts erkannt wurden. Detektierte Bursts wurden mit einem unter dem jeweiligen Burst befindlichen Balken versehen.

Stichproben. In allen Dosis-Wirkungs-Kurven und Säulendiagrammen sind die Standardabweichungen abgebildet. Um fest zu stellen, ob sich Stichprobenmittelwerte signifikant voneinander unterscheiden, wurde bei zwei Stichproben der t-Test und bei mehreren Stichproben ANOVA (Analysis Of Variance) angewendet. Post-Hoc-Tests schlossen sich der ANOVA an. Es wurden p-Werte bestimmt, das Signifikanzniveau lag durchgängig bei $\alpha=0,05$. Zur Quantifizierung von Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden alle dosisabhängigen Parameter (z.B. mittlere Feuerrate) normalisiert, so dass der Kontrollwert (jener am Beginn eines Experiments vor Einwaschen der Testsubstanz) 1 betrug. Die so erhaltenen Dosis-Wirkungsbeziehungen zeigten eine monoton abfallende, nichtlineare Abhängigkeit von der Substanzkonzentration (z.B. Abb. 14). Um die Sensitivität des jeweiligen Parameters von der Konzentration an NO-711 zu quantifizieren, wurde der EC_{50} bestimmt (die Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt erreicht wird). Hierzu wurden die Dosis-Wirkungsbeziehungen transformiert, um die Wirkung als Hemmung auszudrücken (d.h. der Wert 0 entsprach keinem Effekt, und der Wert 1 einer Hemmung von 100 %) und dann mittels Angleichung einer Hill-Kurve parametrisiert:

$$F = s \frac{[L]^n}{[L]^n + [EC_{50}]^n}$$

F ist der jeweilige Parameter (z.B. Aktionspotenzialrate), $[L]$ die Ligandenkonzentration (d.h. die Konzentration von NO-711) und n der Hill-Koeffizient. s ist ein Skalierungsfaktor, der als freier Parameter in die Kurvenangleichung einging, um dem Umstand einer Hemmung $< 100\%$ Rechnung zu tragen. Um Auskunft darüber zu erhalten, welcher Anteil der Streuung sich in den Daten durch das Regressionsmodell (hier: Dosis-Wirkungs-Kurven) erklären lässt, wurde das Bestimmtheitsmaß (R^2) bzw. das korrigierte Bestimmtheitsmaß (R^2_{adj}) berechnet.

Der Vergleich von Dosis-Wirkungskurven erfolgte mit Hilfe eines F-Tests (Motulsky and Christopoulos, 2003); es wurde die Nullhypothese getestet, dass Paare von Kurven aus ein- und derselben Grundgesamtheit von Daten stammen.

3. Ergebnisse

3.1. Kortikale Spontanaktivität unter Kontrollbedingungen

Neokortikale Spontanaktivität wurde in einer ACSF mit einer Magnesiumkonzentration von 0,2 mM gemessen, um ein Maß an Netzwerkaktivität zu erreichen, welches höher liegt als unter physiologischen Bedingungen (~1 mM) (Antkowiak and Hentschke, 1999; Canepari et al., 1997). Betrachtet man unter dieser Kontrollbedingung die kortikalen Rohsignale einer spontanaktiven Kultur, waren aktive Phasen (Up states) mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,17 Hz (SD: +/- 0,13 Hz) zu erkennen, die sich mit Phasen neuronaler Ruhe (Down states) abwechselten (Abb. 9). Das Rohsignal der Up states konnte in Potenzialänderungen langsamer und schneller Frequenz gefiltert werden (Abb. 10). Die langsameren Potenzialänderungen spiegelten Feldpotenziale wider, die durch synchrone synaptische Aktivität im Netzwerk erzeugt worden sind, die schnelleren waren auf lokale Aktionspotenziale zurückzuführen. Die Startphase eines Up states war durch eine hohe Aktionspotenzialdichte und insbesondere durch eine intensive Feldpotenzialänderung gekennzeichnet. Typisch war die schnelle Abnahme der Aktivität kurz nach der Startphase, die sich im Laufe eines Up states jedoch wieder aufgebaut hat und eine gewisse Zeit konstant geblieben ist. Dem Ende eines Up states konnte eine überschießende Aktivität vorausgehen. Unter Kontrollbedingungen trat eine hohe Rohsignal-Heterogenität im neokortikalen Netzwerk auf (Abb. 9). Sowohl die Länge der Up states als auch die der Down states (Interburst-Phasen) variierten erheblich (Mittelwert Up states: 3579 ms, SD: +/- 3436 ms; Mittelwert Down states: 8638 ms, SD: +/- 9686 ms). Das unterschiedliche Muster verschiedener Up states war durch ungleich hohe Feldpotenzialamplituden geprägt, was besonders in den Startphasen sichtbar war.

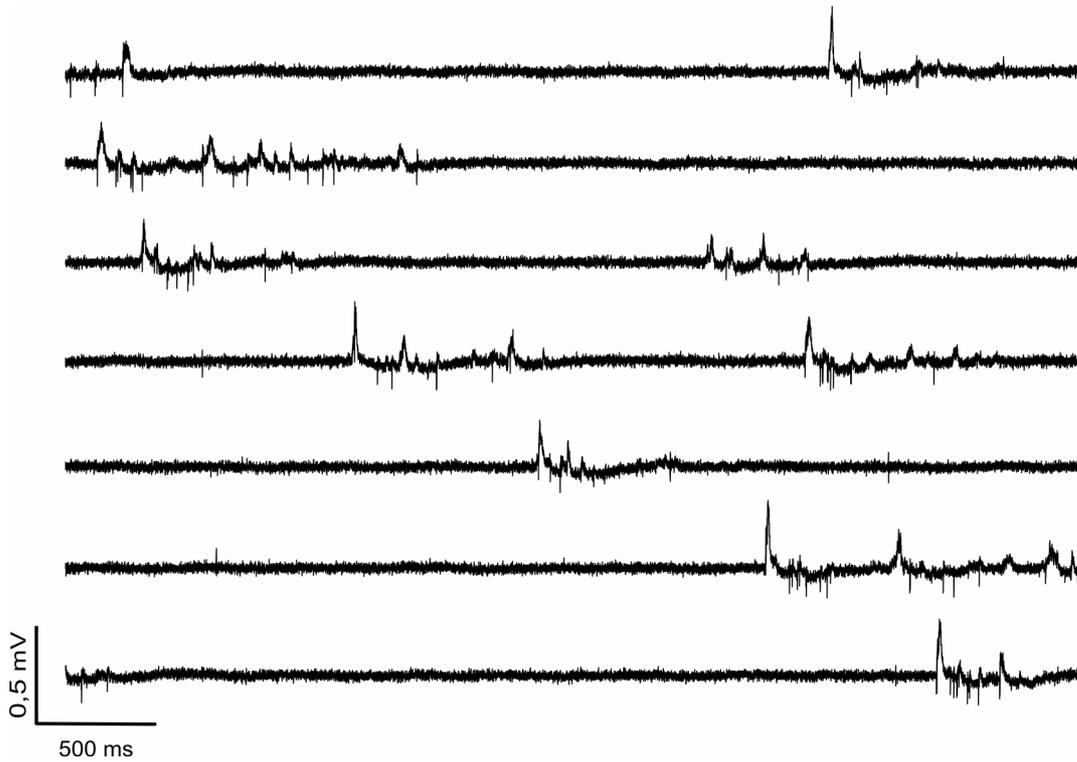


Abb. 9 Spontanaktivität, Rohsignal (Filter: 1 Hz - 5 kHz) Ein heterogenes Aktivitätsmuster bildete die Spontanaktivität in unbehandelten neokortikalen Schnittkulturen.

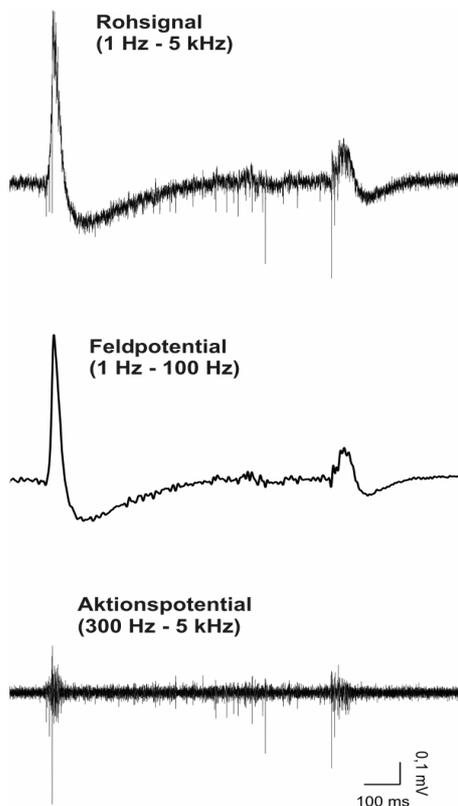


Abb. 10 Up state, gefiltert Rohsignale (oben) wurden Tiefpass (mitte) und Hochpass (unten) gefiltert, um sowohl Feldpotenziale als auch Aktionspotenziale analysieren zu können.

3.2. Kortikale Spontanaktivität unter Hemmung der GABA-Wiederaufnahme

Am Beginn der Analyse der Effekte von NO-711 stand die Frage, inwieweit Aktionspotenziale und Feldpotenziale redundante Information über die zeitliche Struktur spontaner Aktivität enthalten. Bei qualitativer Betrachtung von Rohdaten scheinen beide Signalkomponenten stets gleichzeitig aufzutreten (Rohsignale, Abb. 11). Eine quantitative Auswertung der Burstlänge und der $RelZeit_{aktiv}$ bestätigte diesen Eindruck. Bei beiden Parametern korrelierten die Aktionspotenzial- und Feldpotenzialdaten in einem hohen Maß (Korrelationskoeffizienten: 0,99 bzw. 0,96, Abb. 11). Beide Diagramme wurden doppelt-logarithmisch aufgetragen, damit insbesondere bei Kulturen mit kurzen Aktivitätsphasen bzw. geringer Aktivität genaue Aussagen über deren Aktionspotenzial-Feldpotenzial-Korrelationen gemacht werden konnten.

Dem Burstlängen-Diagramm (Abb. 11) ist zu entnehmen, dass die Feldpotenzial-Burstlängen im Bereich kurzer Aktivitätsphasen höhere Werte angenommen haben als die Burstlängen der Aktionspotenzialdaten. Diese Abweichung war auf die unterschiedliche Signalcharakteristik von Aktions- und Feldpotenzialen zurückzuführen. Feldpotenziale spiegeln synaptische Aktivität wider, die – wie in zahlreichen Untersuchungen des Neokortex *in vitro* und *in vivo* gezeigt wurde – häufig auch unerschwellig existiert und zur Auslösung von Aktionspotenzialen führen kann (Berger et al., 2007; Kawaguchi, 2001; Léger et al., 2005; Margrie et al., 2002; Petersen et al., 2003; Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Steriade et al., 1993). Dies bedeutet, dass viele Neurone eines Netzwerks nicht während der gesamten Dauer eines Up states Aktionspotenziale „feuern“ und dass daher Aktionspotenzial-Bursts tendenziell kürzer sind als Up-Zustände, die über Feldpotenziale ermittelt werden. Die relative Abweichung zwischen Aktionspotenzial- und Feldpotenzial-Burstlängen wurde mit steigender Burstdauer niedriger und die Korrelation somit höher. Der große Vorteil der Feldpotenziale gegenüber Aktionspotenzialen liegt darin, dass Feldpotenziale die Aktivität des gesamten Netzwerks besser widerspiegeln (Léger et al., 2005). Aus diesem Grund und um teilweise redundante

Information zu vermeiden, beschränke ich mich bei der Darstellung von Burstlänge, $RelZeit_{aktiv}$ und $Zeitintervall_{interburst}$ auf Feldpotenziale.

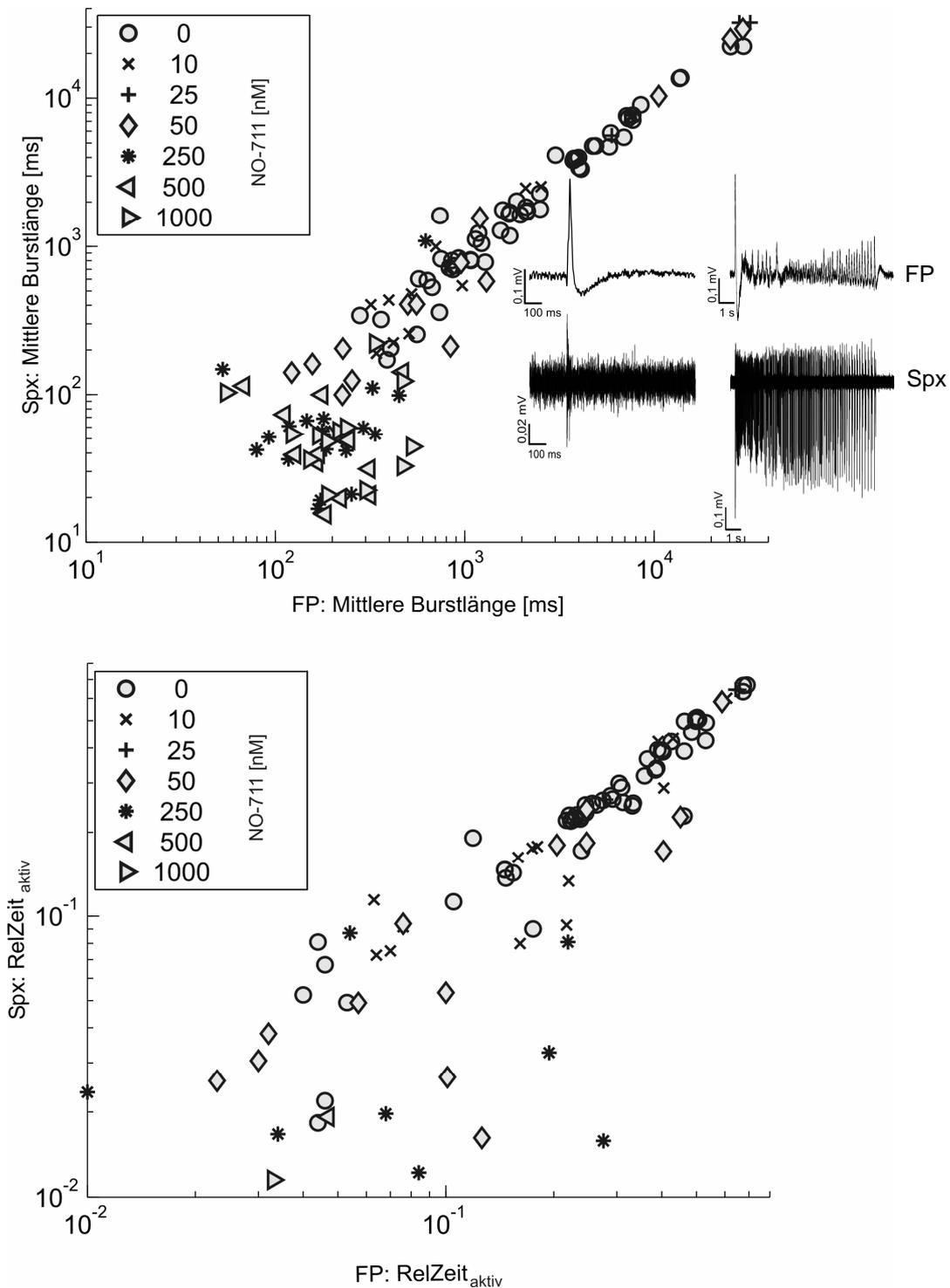


Abb. 11 Die Korrelation von Feldpotenzialen (FP) und Aktionspotenzialen (Spx) In den doppelt-logarithmisch aufgetragenen Diagrammen der Burstlänge und der $RelZeit_{aktiv}$ besteht eine positive Korrelation zwischen den Aktions- und Feldpotenzialen (Korrelationskoeffizient: 0,99 bzw. 0,96). Zusätzlich sind im oberen Diagramm zwei Bursts unterschiedlicher Länge in Form von FP und Spx dargestellt.

Schon nach Zugabe einer geringen Konzentration von NO-711 (10 nM), war aus den Rohdaten eine deutliche Abnahme der Burstlänge ersichtlich. Noch eindeutiger trat dieser Effekt bei 250 nM NO-711 auf (Abb. 12).

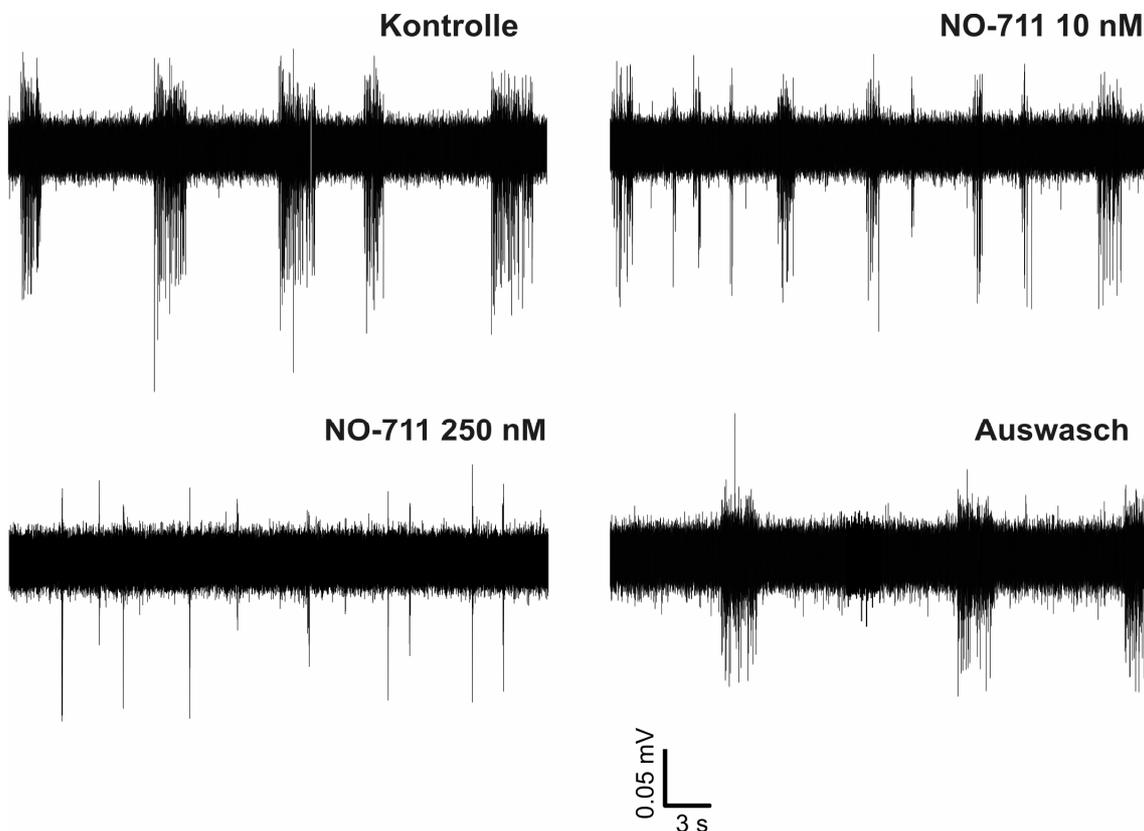


Abb. 12 Rohdaten bei Applikation von NO-711 Repräsentatives Beispiel aus einer Reihe von Experimenten mit ansteigender NO-711-Konzentration. Die Effekte von NO-711 waren mit dem Auswasch reversibel.

Die auf die mittlere Feuerrate der Kontrollbedingung (0 nM NO-711) normalisierte Dosis-Wirkungs-Beziehung weist eine konzentrationsabhängige, in erster Näherung exponentielle Abnahme der mittleren Feuerrate auf (Abb. 13). NO-711 unterdrückte die mittlere Feuerrate bis zur maximal applizierten Konzentration von 1 μM nicht vollständig (der asymptotische Grenzwert der Hill-Kurve, die „Restfeuerrate“, betrug 0,13), doch trat der halbe Maximaleffekt schon bei einer geringen NO-711-Konzentration auf ($\text{EC}_{50} = 34,07 \text{ nM}$) (Abb. 13). Diese Effekte, wie alle weiteren Effekte in der Arbeit, waren mit dem Auswasch größtenteils reversibel.

Gleichzeitig verkürzte NO-711 mit steigender Konzentration sowohl die $RelZeit_{aktiv}$ (Abb. 14), als auch die mittlere Burstlänge (Abb. 15). Auch wenn sich die maximalen NO-711-Effekte in allen drei Parametern wenig voneinander unterschieden, war die Burstlänge der sensitivste Parameter. Des Weiteren war die Messwert-Streubreite aller drei Parameter bei niedrigen NO-711-Konzentrationen ausgeprägter als bei höheren (Abb. 13 – Abb. 15).

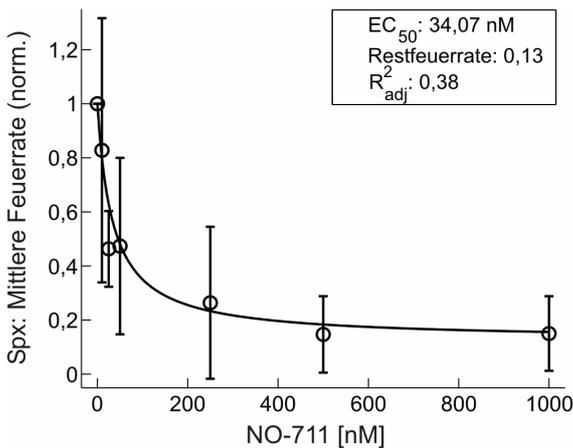


Abb. 13 Mittlere Feuerrate Die mittlere Feuerrate nahm mit steigender NO-711-Konzentration ab, jedoch ohne vollständige Hemmung ($n = 6 - 34$). Normalisiert wurde auf die Kontrollbedingung (0 nM NO-711).

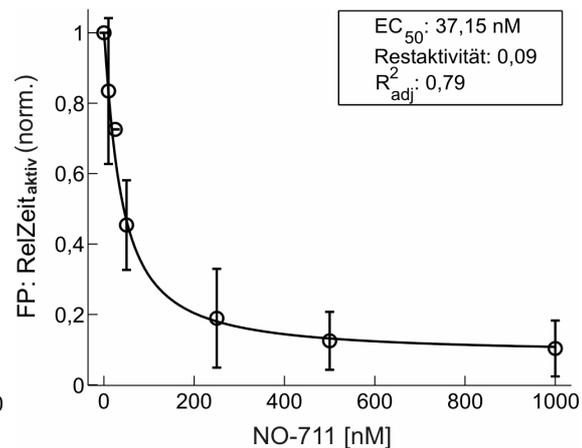


Abb. 14 $RelZeit_{aktiv}$ Die EC_{50} unterschied sich nicht wesentlich von jener der mittleren Feuerrate ($n = 5 - 23$). Normalisiert wurde auf die Kontrollbedingung.

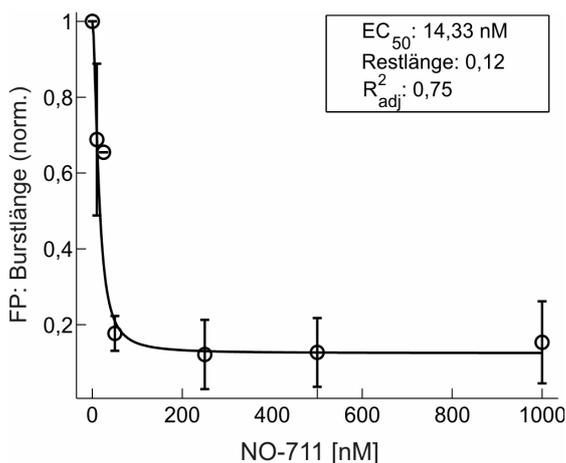


Abb. 15 Burstlänge Mit einer EC_{50} von 14 nM war die Burstlänge der empfindlichste Parameter ($n = 2 - 22$). Normalisiert wurde auf die Kontrollbedingung.

Betrachtet man die Burstlänge und das $Zeitintervall_{interburst}$ gemeinsam in Abhängigkeit von der NO-711-Konzentration, erkennt man einen biphasischen Verlauf (Abb. 16): Mit steigender NO-711-Konzentration nahm die Burstlänge kontinuierlich ab, doch das $Zeitintervall_{interburst}$ sank nur bis zu einer NO-711-Konzentration von ca. 50 nM. Bei höheren Konzentrationen stieg das

Zeitintervall_{interburst} deutlich an. Dies bedeutet, dass niedrige NO-711-Konzentrationen die Burstfrequenz durch eine Verkürzung der Up states erhöhten, diese jedoch durch höhere NO-711-Konzentrationen heruntergeschraubt wurde, da die Down states länger wurden.

Wie bereits erwähnt, tritt im Neokortex neuronale Aktivität nicht kontinuierlich auf, sondern in Phasen, die im Allgemeinen abrupt beginnen und enden. Zu Beginn der Aktivitätsphasen geht das neuronale Netzwerk von (relativer) Ruhe zu hoher Aktivität über, so dass binnen Millisekunden viel Neurotransmitter ausgeschüttet wird,

möglicherweise in den extrasynaptischen Raum gelangt und dort potenziell extrasynaptische Rezeptoren aktiviert. Es ist daher von Interesse, den Verlauf der Feuerraten während der Aktivitätsphasen („Peri-Event“-Feuerraten), also während der Bursts zu charakterisieren. An den Histogrammen ist zu erkennen, dass mit steigender NO-711-Konzentration die Feuerraten innerhalb der Bursts abnahmen (Abb. 17). Dabei sanken die Feuerraten pro Bin vor allem in den letzten 400 ms der Histogramme (späte Phase) und blieben in den ersten 40 ms (frühe Phase) nahezu unverändert. Dieser Unterschied wird deutlich, werden die Veränderungen der Feuerraten in der frühen ($FR_{\text{früh}}$) und der späten Phase ($FR_{\text{spät}}$) getrennt betrachtet (Abb. 18). Klar ist zu erkennen, dass mit steigender NO-711-Konzentration nur die Feuerraten in der späten Phase abfielen.

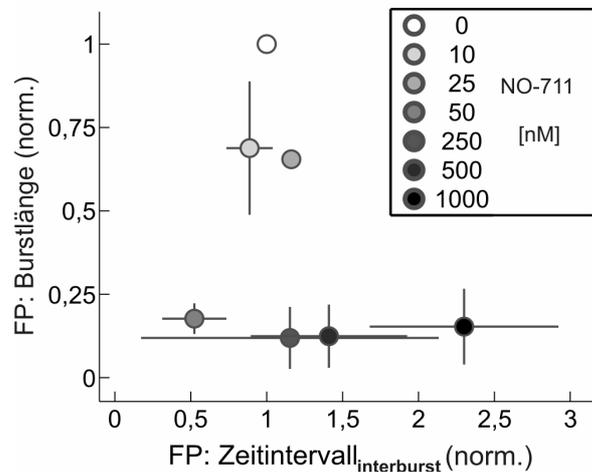


Abb. 16 Zeitintervall_{interburst} vs. Burstlänge
Mit steigender NO-711 Konzentration wurden die Bursts kontinuierlich verkürzt, wohingegen das Zeitintervall_{interburst} erst abnahm, um ab 50 nM NO-711 wieder anzusteigen (n = 2 – 21).

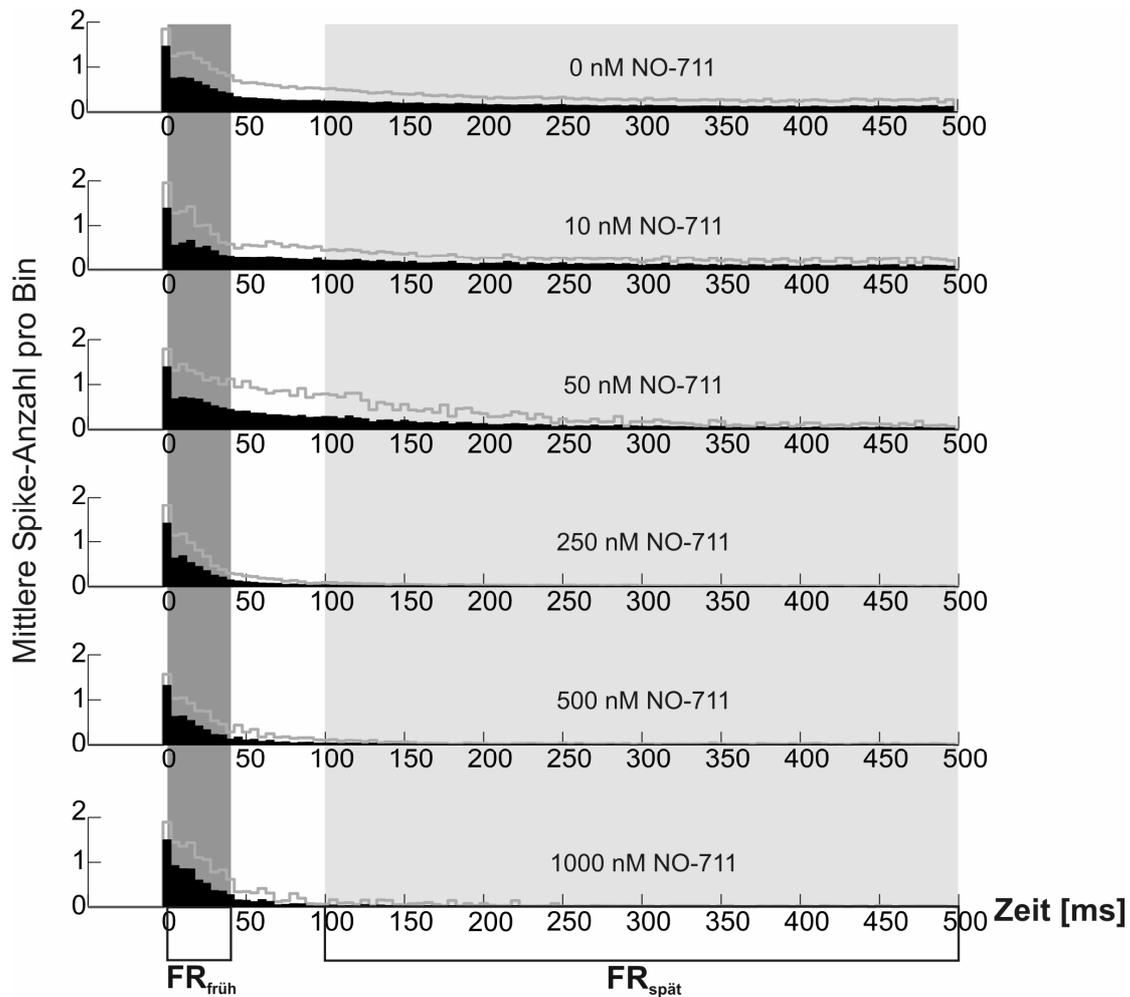


Abb. 17 PETH NO-711 Die Wirkung von NO-711 während der Up states. Die dunkelgraue Fläche stellt das Zeitintervall der $FR_{\text{früh}}$, die hellgraue Fläche das Zeitintervall der $FR_{\text{spät}}$ dar. Die grauen gezackten Linien geben Standardabweichungen wider.

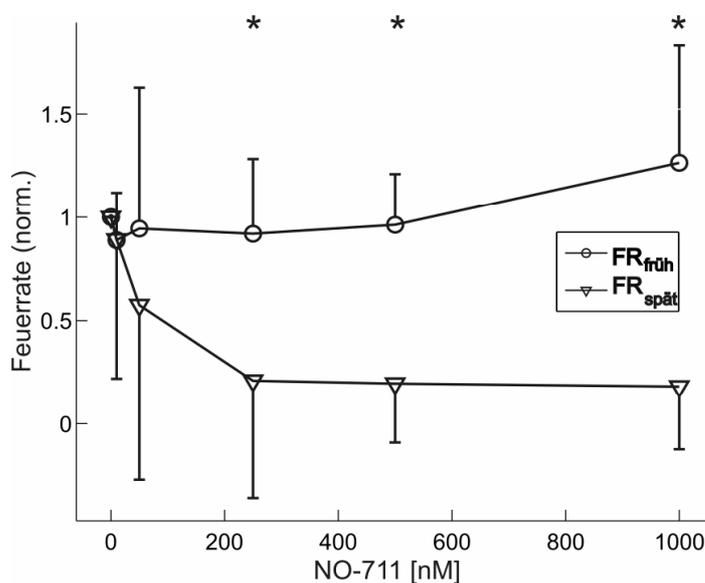


Abb. 18 Die Abbildung wurde auf die Feuerraten der Kontrollbedingung (0 nM NO-711) normalisiert. Die $FR_{\text{früh}}$ und $FR_{\text{spät}}$ sind nur bei NO-711-Konzentrationen von 250, 500 und 1000 nM signifikant* verschieden voneinander ($p < 0,05$). ($n = 18 - 29$)

3.3. Kortikale Spontanaktivität unter Hemmung der Wiederaufnahme von GABA und zusätzlicher Blockade der GABA_A-Rezeptoren

Die bisher dargestellten Ergebnisse zur Wirkung von NO-711 haben gezeigt, dass eine Hemmung der Wiederaufnahme von GABA kortikale Spontanaktivität über GABA-Rezeptoren moduliert. Im Neokortex existieren neben GABA_A- auch GABA_B-Rezeptoren. Da GABA_B-Rezeptoren infolge prä- und postsynaptischer Lokalisation sowohl einen Einfluss auf die Transmitterfreisetzung ausüben als

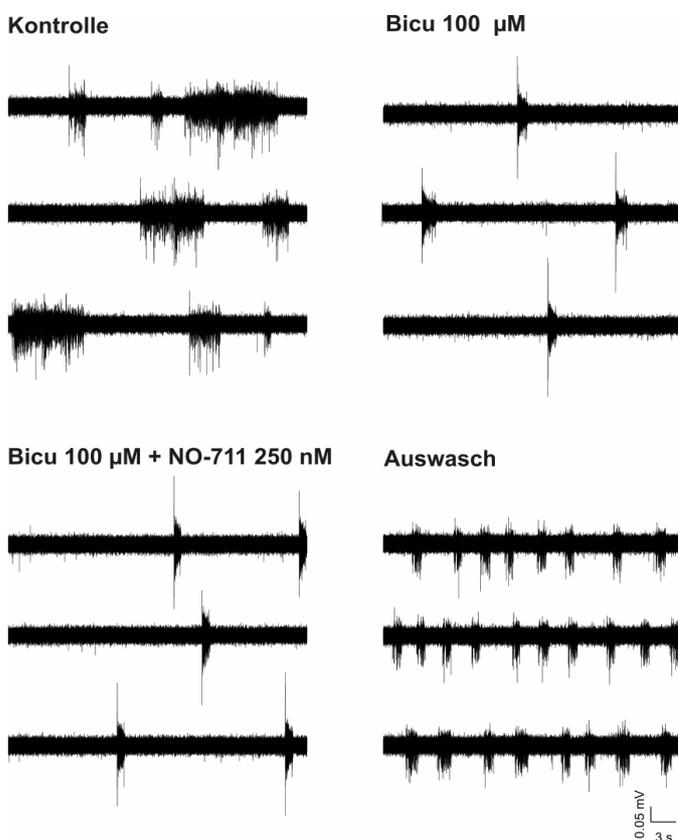


Abb. 19 Neuronale Aktivität bei Applikation von Bicucullin (+ NO-711) Repräsentatives Beispiel aus der Bicucullin-Experimentreihe. Nach alleiniger Applikation von Bicucullin wurde Bicucullin mit NO-711 koappliziert. Die Effekte waren mit dem Auswasch reversibel.

auch IPSCs hervorrufen (Bennett et al., 1997; Calver et al., 2002), war es wichtig herauszufinden, welchen Stellenwert diese Rezeptoren bei den Effekten von NO-711 haben. So wurde in einer separaten Experimentreihe der kompetitive GABA_A-Rezeptoren-Antagonist Bicucullin (Sigma) in einer Konzentration von 100 µM zuerst alleine und in der zweiten Einwaschphase zusammen mit 250 nM NO-711 appliziert. Die gemessenen Effekte von NO-711 wurden somit unter Blockade der GABA_A-

Rezeptoren ermittelt. Der Unterschied zwischen der Wirkung von NO-711 in Gegenwart und Abwesenheit von Bicucullin brachte Erkenntnisse über den Einfluss der nicht blockierten GABA_B-Rezeptoren auf die Spontanaktivität.

Die Auswertung der Rohdaten ergab, dass durch Bicucullin die Länge der einzelnen Bursts verkürzt wurde (Abb. 19). Des Weiteren wurde im Vergleich zur Kontrolle das Muster der Bursts homogener: Einem FP-Ausschlag hoher Amplitude zum Anfang eines Bursts folgten nach einer kurzen Latenz drei bis sechs FP-Spitzen, deren Amplituden bis zum Burstende hin kontinuierlich anwuchsen. Im Gegensatz dazu veränderten sich unter Kontrollbedingungen die Feldpotenziale im Anschluss an den initialen FP-Ausschlag nicht nach einer erkennbaren Ordnung (Abb. 20).

Setzte man die Aktivitätsmuster während alleiniger Bicucullin-Applikation als Referenzzustand fest (im normalisierten Säulendiagramm in Abb. 21 Wert 1), war eine Veränderung der Burstlänge durch zusätzliche Applikation von 250 μM NO-711 am Säulendiagramm (Abb. 21), aber auch an den Rohdaten (Abb. 19) nicht zu erkennen. Gleichfalls änderte zusätzliches NO-711 das Muster der Bursts nicht (Abb. 20).

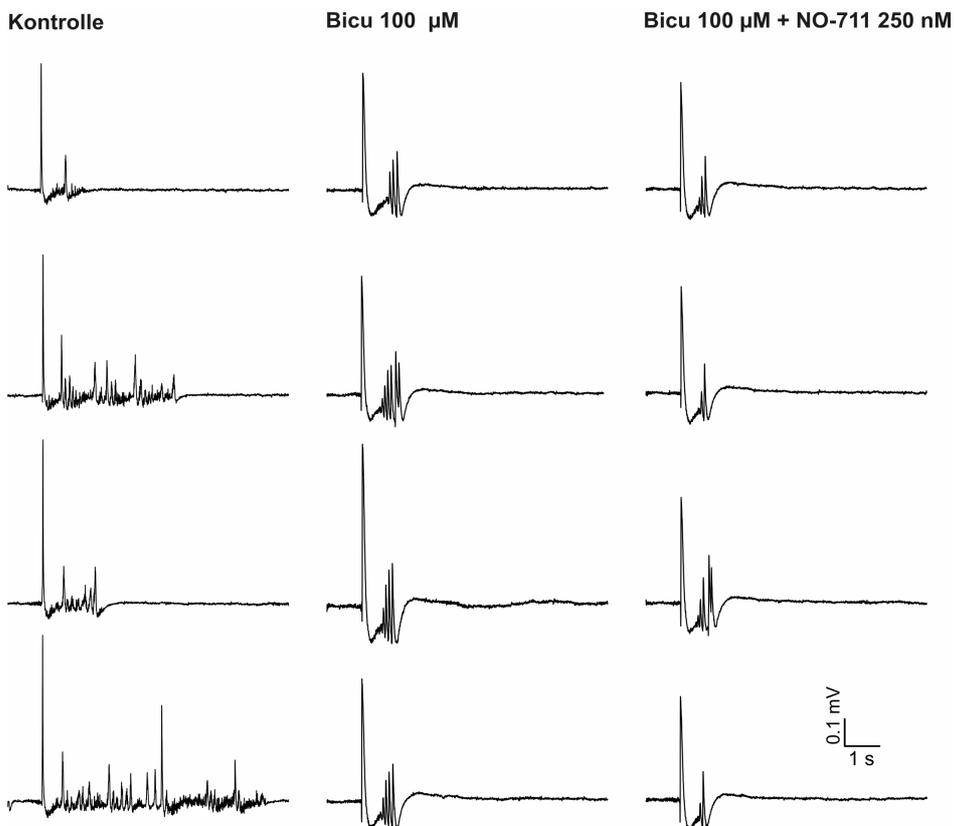


Abb. 20 FP bei Applikation von Bicucullin (+ NO-711) Dargestellt sind pro Bedingung vier Burstaufzeichnungen. Das homogene Burstmuster unter 100 μM Bicucullin wurde durch 250 nM NO-711 nicht verändert.

Jedoch reduzierte zusätzliches NO-711 die $RelZeit_{aktiv}$ und verlängerte das $Zeitintervall_{interburst}$. Beide Effekte waren statistisch signifikant. Die Zunahme der mittleren Feuerrate und die Abnahme der Burstlänge erreichten hingegen keine Signifikanz (Abb. 21). Dies zeigt, dass auch $GABA_B$ -Rezeptoren die durch NO-711 hervorgerufene Veränderung der $RelZeit_{aktiv}$ bzw. des $Zeitintervalls_{interburst}$ vermittelten, jedoch deren alleinige Aktivierung die mittlere Feuerrate und Burstlänge nicht signifikant beeinflusste. Die geringe Änderung aller Parameter durch NO-711 weist darauf hin, dass eine Hemmung der Wiederaufnahme von GABA nicht zu einer massiven Aktivierung von $GABA_B$ -Rezeptoren führte, und/oder dass diese Rezeptoren nur einen schwachen Einfluss auf kortikale Spontanaktivität ausübten, zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen.

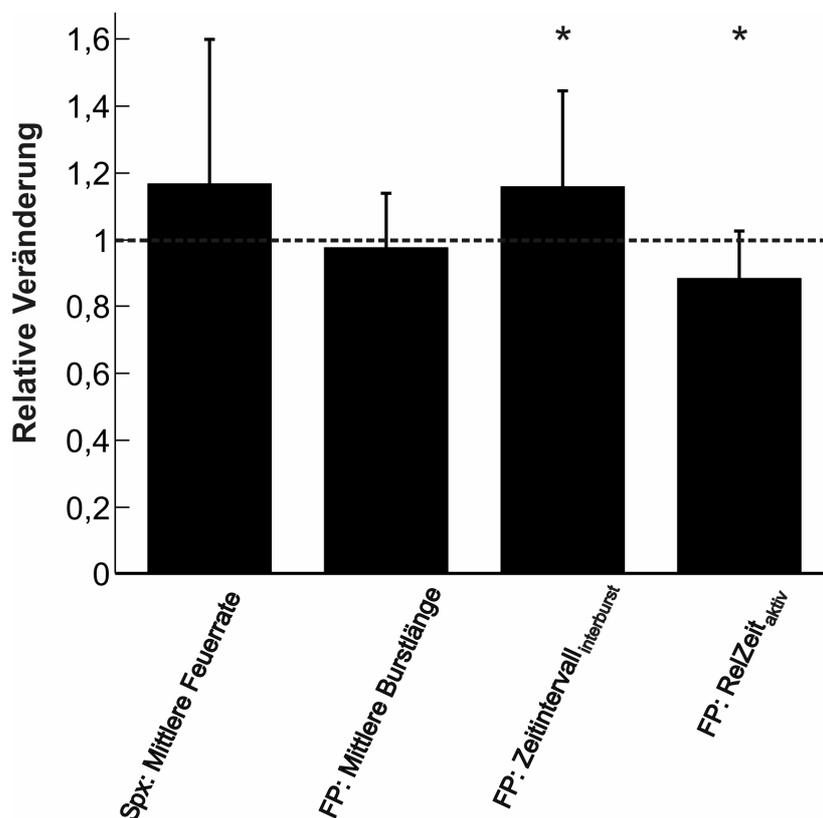


Abb. 21 Relative Veränderung nach Applikation von 250 nM NO-711 Der Ordinatenwert 1 fasst die Aktivität alleiniger Bicucullin-Applikation zusammen. 250 nM NO-711 reduzierte die $RelZeit_{aktiv}$ signifikant* ($p = 0,041$; SD: $\pm 14\%$) auf 89 % und verlängerte signifikant* ($p = 0,046$; SD: $\pm 29\%$) das $Zeitintervall_{interburst}$ auf 116 %. Die Veränderungen der mittleren Feuerrate ($p = 0,144$) und der mittleren Burstlänge ($p = 0,339$) zeigten hingegen keine Signifikanz.

3.4. Kortikale Spontanaktivität unter Hemmung der Wiederaufnahme von GABA und zusätzlicher Blockade der GABA_B-Rezeptoren

Der im letzten Abschnitt dokumentierte geringe modulatorische Einfluss von GABA_B-Rezeptoren auf die Aktionspotenzialaktivität könnte auf die extremen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Eine vollständige Blockade der GABA_A-Rezeptoren beraubt kortikale Netzwerke ihrer wichtigsten inhibitorischen Eingänge und könnte sie in einen Zustand versetzen, in dem andere inhibitorische Einflüsse nicht zum Tragen kommen. Es erschien daher angebracht, eine komplementäre Messreihe durchzuführen, in der initial GABA_B-Rezeptoren blockiert wurden, um danach NO-711 zu applizieren. Ein Vergleich der Aktivitätsmuster unter diesen Bedingungen mit den Aktivitätsmustern bei alleiniger Gegenwart von NO-711 (Abb. 13 – Abb. 15) sollte weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren geben.

Der spezifische GABA_B Rezeptor-Blocker CGP 55845 (10 µM) rief eine deutliche Veränderung des Burstmusters hervor (Abb. 22). Die Bursts „zerfielen“ nach einer anfänglichen Phase kontinuierlichen Feuerns in kleinere Einzelbursts, deren Trennung auf das Burstende hin eindeutiger wurde. Ebenso war eine Verlängerung der gesamten Aktivitätsphasen (kontinuierliches Feuern gefolgt von Einzelbursts) sowie der Phasen neuronaler Ruhe zu erkennen. Während zusätzlicher Applikation von 250 µM NO-711 trat das Zerfallen in Einzelbursts früher auf, was die anfängliche Phase kontinuierlicher Aktivität verkürzte. Bei der Auswertung dieser Daten wurden die Kriterien für die Detektion von Bursts so angepasst, dass immer gesamte Aktivitätsphasen zu Bursts zusammengefasst wurden (siehe auch Abschnitt 4.6. in der Diskussion).

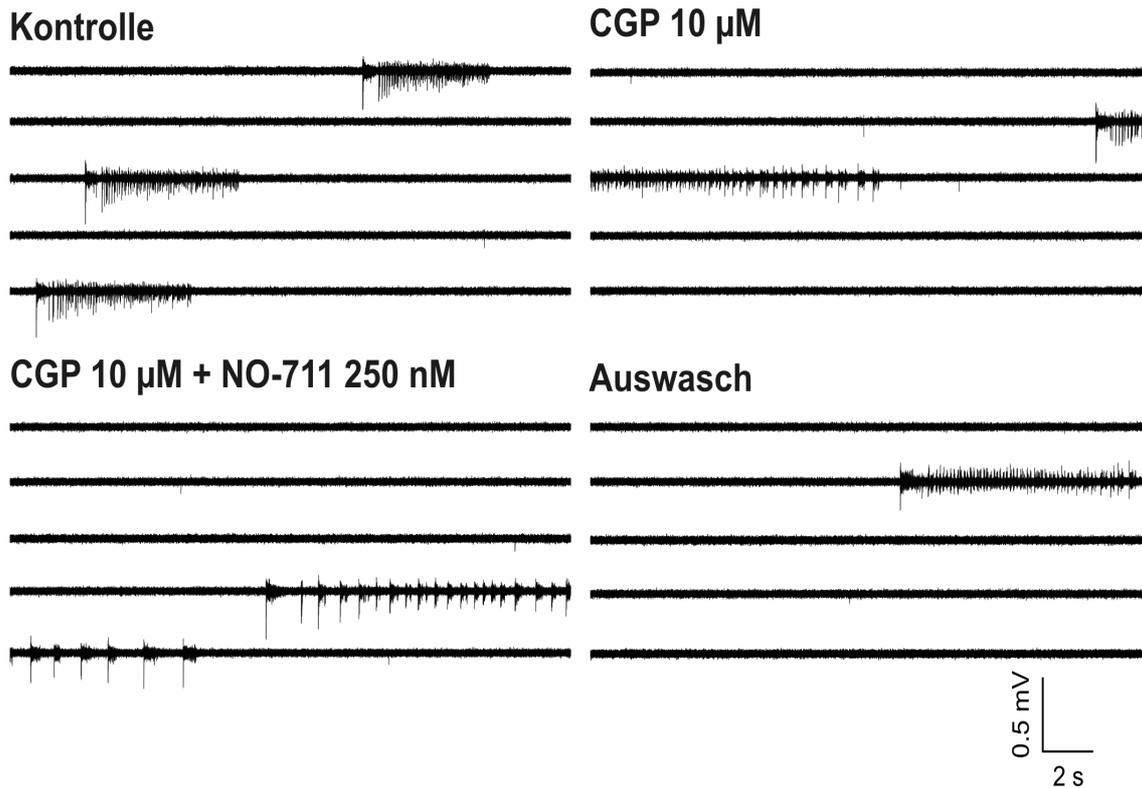


Abb. 22 Die Wirkung von CGP und NO-711 auf die Aktivitätsmuster kortikaler Neurone
 Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel aus der Messreihe mit CGP und zusätzlicher Applikation von NO-711. Der Auswasch zeigt die Reversibilität der Substanzwirkung.

In den normalisierten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (10 μM CGP 55845 + x nM NO-711, Abb. 23 und Abb. 24) entsprach der Ordinatenwert 1 den Messwerten bei der alleinigen Applikation von 10 μM CGP 55845. CGP 55845 veränderte die konzentrationsabhängige Wirkung von NO-711 auf die mittlere Feuerrate nur gering (Abb. 23). Im Gegensatz dazu fiel die NO-711-Dosis-Wirkungs-Kurve der $\text{RelZeit}_{\text{aktiv}}$ in Anwesenheit von CGP 55845 flacher ab (Abb. 24). Auch unter GABA_B -Rezeptor-Blockade fiel die $\text{FR}_{\text{spät}}$ mit steigender NO-711-Konzentration ab, wohingegen auch hier die $\text{FR}_{\text{früh}}$ keine Abnahme zeigte (Abb. 25, Abb. 26).

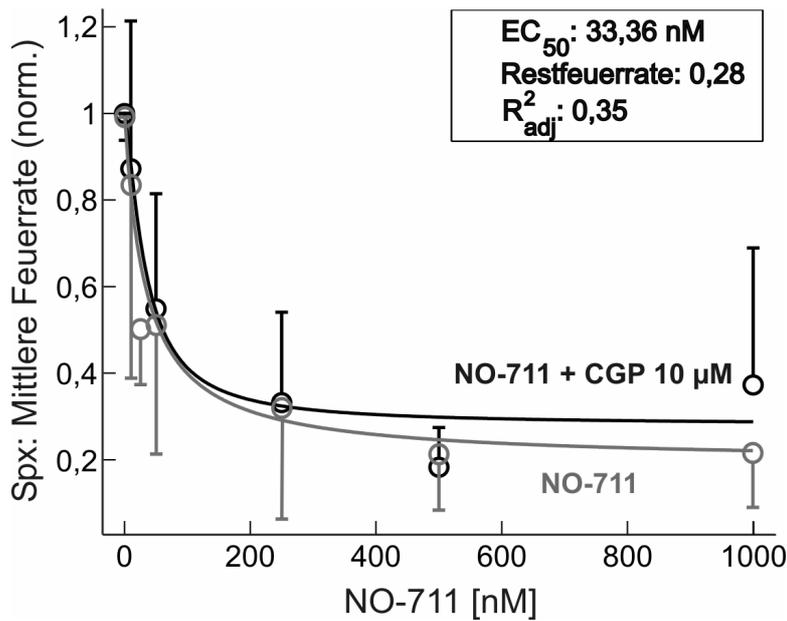


Abb. 23 Die Wirkung von NO-711 auf die mittlere Feuerrate mit und ohne Blockade der GABA_B-Rezeptoren durch CGP
 Die EC₅₀ der schwarzen Dosis-Wirkungs-Kurve ist im Kasten abgebildet (n = 2 - 14). Die Kurve wurde auf die mittlere Feuerrate der Bedingung 10 µM CGP normalisiert. Der Unterschied zur EC₅₀ (34,07 nM) der grauen Kurve ist minimal. Beide Kurven sind nicht signifikant verschieden voneinander (p = 0,194).

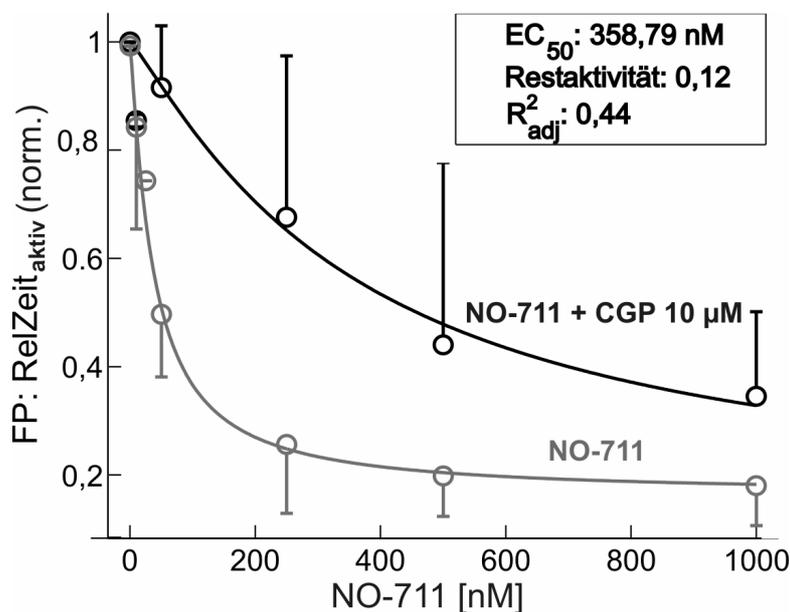


Abb. 24 Die Wirkung von NO-711 auf die anteilige aktive Zeit (RelZeit_{aktiv}) mit und ohne CGP
 Die EC₅₀ (358,79 nM) der schwarzen Kurve (n = 3 - 16) übersteigt die EC₅₀ (37,14 nM) der grauen Kurve um das Zehnfache. Normalisiert wurde die schwarze Kurve auf die RelZeit_{aktiv} der Bedingung 10 µM CGP. Die zwei Kurven sind signifikant verschieden voneinander (p << 0,001).

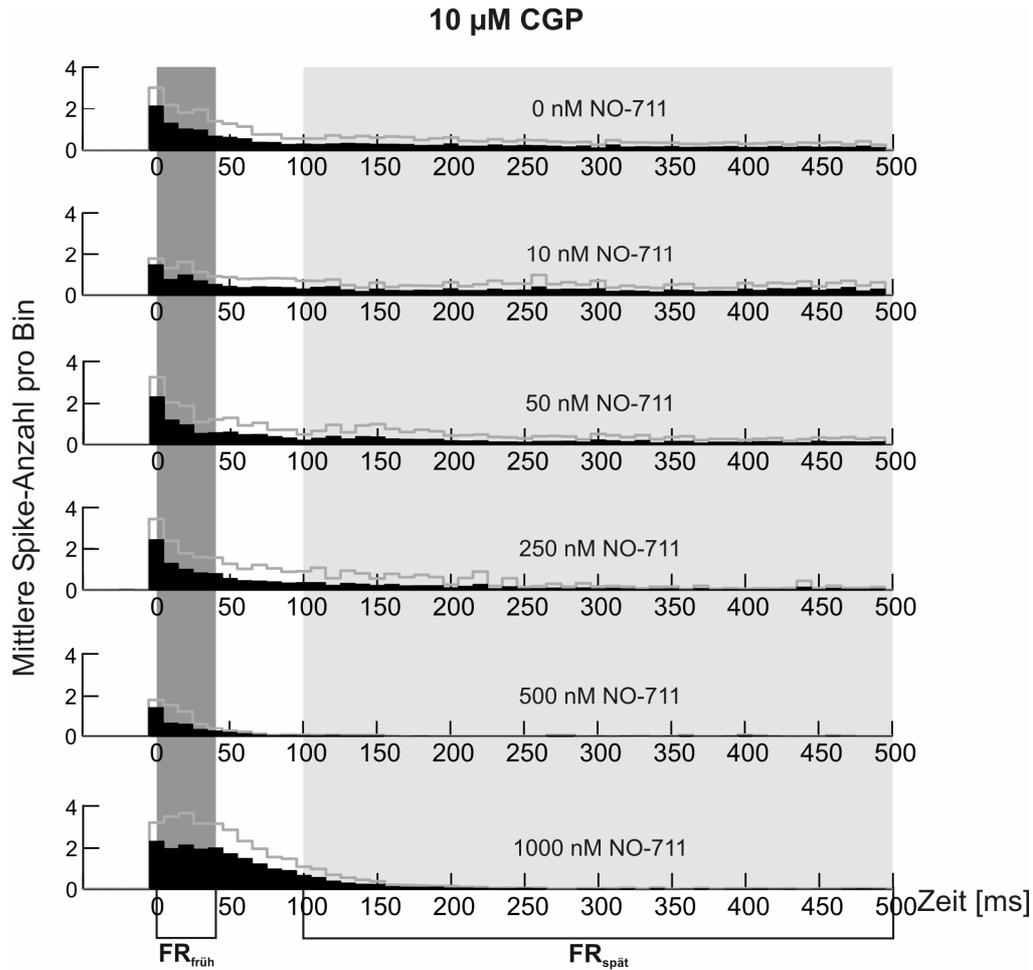


Abb. 25 PETH CGP(+NO-711) Die Dosis-Wirkungs-Daten von NO-711 in Anwesenheit von CGP ergeben das PETH. Die dunkelgraue Fläche spiegelt das Zeitintervall der $FR_{früh}$ wider, die hellgraue Fläche das der $FR_{spät}$.

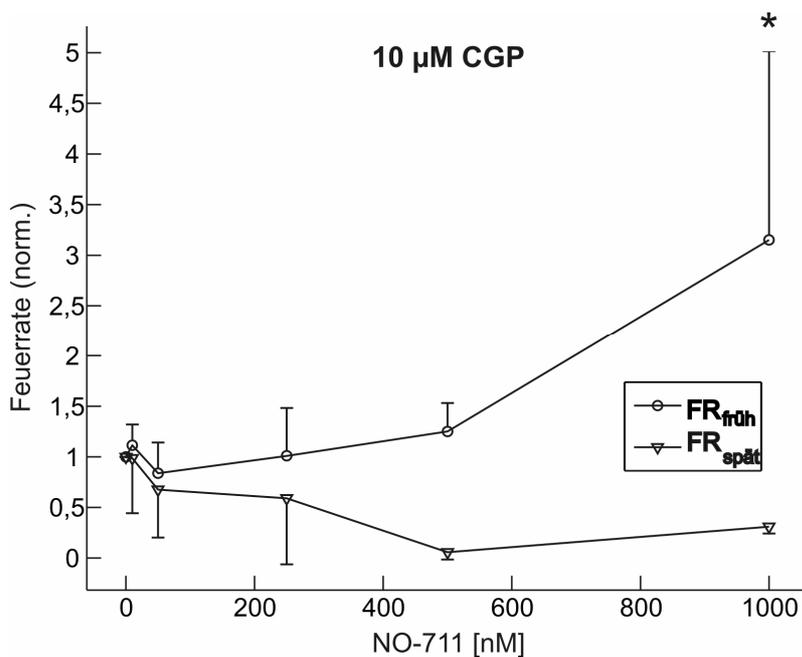


Abb. 26 Die Kurven wurden auf die Feuerraten der Bedingung 10 μ M CGP normalisiert. Die Daten der $FR_{früh}$ und $FR_{spät}$ sind nur bei einer NO-711-Konzentration von 1000 nM signifikant* verschieden voneinander ($p < 0,05$).

Um zu erfahren, ob die Effekte von GABA-Uptake-Blockade auf die frühen und die späten Feuerraten durch GABA_B-Blockade beeinflusst werden, wurden die Effekte von 250 nM NO-711 mit den Effekten von 250 nM NO-711 in Anwesenheit von 10 µM CGP 55845 miteinander verglichen. CGP 55845 beeinflusste die NO-711-Effekte auf die FR_{früh} nicht, doch verminderte CGP 55845 eindeutig den Abfall der FR_{spät}, den NO-711 herbeiführte (Abb. 27). Die Resultate zeigen auf, dass auch GABA_B-Rezeptoren einen Anteil an der Reduktion der FR_{spät} durch NO-711 hatten.

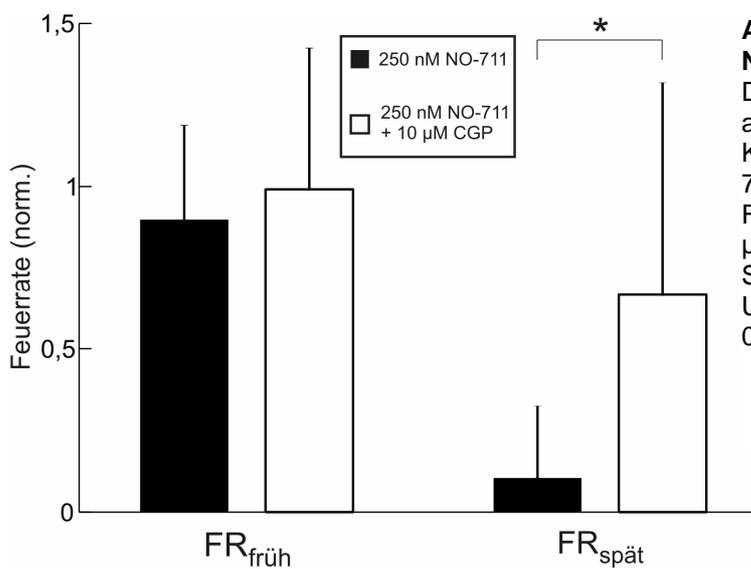


Abb. 27 Beeinflussung der NO-711-Effekte durch CGP

Die schwarzen Säulen wurden auf die Feuerraten der Kontrollbedingung (0 nM NO-711), die weißen Säulen auf die Feuerraten der Bedingung 10 µM CGP normalisiert. Signifikant* ist nur der Unterschied der FR_{spät} ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben eine erste Antwort auf die Frage, in welchem Umfang GABA-Transporter an der Kontrolle der spontanen Aktivität kortikaler Neurone beteiligt sind. Eine Hemmung der Wiederaufnahme von GABA, schon durch geringe Konzentrationen des Wiederaufnahme-Blockers NO-711, beeinflusst die neuronale Aktivität signifikant. An den Effekten von NO-711 wirken sowohl GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptoren mit, die den GABA_A-Rezeptoren von größerer Bedeutung sind.

4.1. Kortikale Spontanaktivität entsteht durch das Zusammenspiel von synaptischer Erregung und Hemmung

Das extrazellulär registrierte Muster eines Up states unter Kontrollbedingungen spiegelt Vorgänge an Synapsen und Neuronen in kortikalen Netzwerken in vitro wider. Die hohen Feldpotenzialamplituden am Anfang der Up states (Abb. 10) entstehen infolge exzitatorischer „Kettenreaktionen“ des Netzwerks, durch die viele Neurone innerhalb kürzester Zeit erregt werden (Maeda et al., 1995; Robinson et al., 1993). Die hohe Aktivität im Netzwerk kann zu einem kurzzeitigen Depolarisationsblock einzelner Neurone führen; dies könnte die anschließende temporäre Aktivitätsminderung im Netzwerk erklären (Gutnick et al., 1989; Kawaguchi, 2001; Thomson and West, 1986; Ziburkus et al., 2006), die in manchen Experimenten zu sehen war (Abb. 10). Nach der Repolarisation dieser Neurone kann sich Aktivität wieder aufbauen. Die Up states werden durch das Überwiegen inhibitorischer Ströme, die durch freigesetztes GABA entstehen, beendet. Ein Grund für das Überwiegen inhibitorischer Ströme ist, dass sich während eines Up states inhibitorische Neurone nach synaptischer Aktivierung durchschnittlich länger im aktivierten Zustand befinden als exzitatorische (Shu et al., 2003).

4.2. Kortikale Spontanaktivität reagiert sensitiv auf eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition

Die durch NO-711 herbeigeführte Abnahme der mittleren Feuerrate (Abb. 13), der $RelZeit_{aktiv}$ (Abb. 14) und der Burstlänge (Abb. 15), sowie die Zunahme des Zeitintervalls $_{interburst}$ ab einer NO-711-Konzentrationen von 50 nM (Abb. 16) implizieren eine deutliche Verschiebung des Erregungszustandes kortikaler Neurone in Richtung Inhibition. Die verstärkte Inhibition im neokortikalen Netzwerk ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die in der Einleitung postulierte Akkumulation von GABA zurückzuführen: Wächst die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt an, kann dieser Transmitter infolge reduzierter Wiederaufnahme nicht wieder in die Präsynapse aufgenommen werden. Zwar wurde spekuliert, dass eine Blockade der GABA-Wiederaufnahme über den Anstieg der synaptischen GABA-Konzentration eine Desensibilisierung synaptisch lokalisierter $GABA_A$ -Rezeptoren (Keros and Hablitz, 2005; Overstreet et al., 2000) in den spontanaktiven Kulturen verursachen. Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die durch NO-711 begünstigte $GABA_A$ -Rezeptoren-Desensibilisierung würde IPSCs in den Frühphasen der Bursts reduzieren, was sich in einem Anstieg der $FR_{früh}$ niederschlagen müsste. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Um die Vermutung der fehlenden Desensibilisierung zu erhärten, bedarf es in Zukunft intrazellulärer Messungen in spontanaktiven Kulturen, denn eine Desensibilisierung würde sich in einer Veränderung der IPSC-Kinetik äußern (Keros and Hablitz, 2005; Overstreet et al., 2000).

Ebenso ist davon auszugehen, dass synaptisch akkumulierendes GABA Inhibition nicht über die Besetzung zusätzlicher $GABA_A$ -Rezeptoren aktiver Synapsen verstärkt (Mody et al., 1994). Dieser Effekt würde durch eine Verstärkung der IPSCs (Hájos et al., 2000) eine Reduktion der $FR_{früh}$ bewirken. Doch da diese ausbleibt, ist anzunehmen, dass schon unter Kontrollbedingungen $GABA_A$ -Rezeptoren aktiver Synapsen vollkommen gesättigt sind. Wie ist also die Zunahme der Inhibition zu erklären?

Der biphasische Verlauf des Zeitintervalls_{interburst} (Abb. 16) lässt vermuten, dass bei höheren NO-711-Konzentrationen (> 50 nM) ein anderer inhibitorischer Mechanismus eine Rolle spielt als bei niedrigen. Schon sehr niedrige Konzentrationen an NO-711 beeinträchtigen den GABA-Uptake ($IC_{50} = 47$ nM; (Suzdak et al., 1992)) und führen nach dem Start eines Bursts wahrscheinlich zu einer verstärkten Akkumulierung von GABA im synaptischen Spalt, was eine erhöhte GABA-Diffusion aus der aktiven Synapse bedeutet. Geht man von einer ausreichenden Synapsendichte in den hier verwendeten organotypischen Kulturen aus, besteht die Möglichkeit, dass diffundiertes GABA synaptische GABA-Rezeptoren umgebender, bis dahin noch inaktiver Synapsen aktiviert und sich so im neokortikalen Netzwerk der schon in der Einleitung hypothesierte cross talk benachbarter Synapsen ausbildet (Clements, 1996; Overstreet and Westbrook, 2003). An Nervenzellen, die cross talk erfahren, nehmen inhibitorische Ströme zu. Sie üben einen hyperpolarisierenden Effekt auf diese Nervenzellen aus, die jetzt eine höhere Spannungsänderung erfahren müssen, damit weitere Aktionspotenziale entstehen können (Eccles, 1964). Ebenfalls führen die offenen GABA_A-Kanäle und die dadurch gestiegene Leitfähigkeit („shunting inhibition“) dazu, dass der Einfluss von erregenden postsynaptischen Potenzialen (EPSPs) auf das Membranpotenzial abnimmt (Ulrich, 2003). Die daraus resultierende verringerte Erregbarkeit (Eccles, 1964; Ulrich, 2003) vor allem exzitatorischer Neurone senkt die mittlere Feuerrate (Abb. 13) und führt, wie eingangs vermutet, zu früheren Abbrüchen von Up states (Abb. 15).

Auf den ersten Blick mag es paradox erscheinen, dass der durch niedrige NO-711-Konzentrationen entstandene inhibitorische cross talk das Zeitintervall_{interburst} verkürzt (Abb. 16), doch liegt es nahe, dass dieser im Netzwerk die „Regeneration“ der Neurone, vor allem des exzitatorischen Systems, fördert. Während eines Up states erfahren Neurone depolarisierende Kalziumeinströme über NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängige Kalziumkanäle. Ab einer bestimmten intrazellulären Kalziumkonzentration öffnen sich Kalzium-gesteuerte Kaliumkanäle, die Repolarisation und (Nach-)Hyperpolarisation vermitteln (Madison and Nicoll, 1984; Sah, 1996; Schwandt et

al., 1988). Diese Kaliumkanäle schließen, wenn die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf ein bestimmtes Niveau abgesunken ist, was $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpen herbeiführen. Solange diese Kaliumkanäle geöffnet sind, ist die Entstehung überschwelliger Depolarisationen und somit neuer Up states im Netzwerk beeinträchtigt (Compte et al., 2003; Tabak et al., 2001). Hier könnte sich der cross talk auswirken, indem er durch einen frühen Abbruch der Up states Kalziumeinströme verringert. Infolgedessen akkumuliert während eines Up states intrazellulär weniger Kalzium. Dies verkürzt die Zeitspanne, bis die intrazelluläre Kalziumkonzentration mit Hilfe der Austauscher und Pumpen auf das Niveau abgesunken ist, bei dem Kalzium-gesteuerte Kaliumkanäle wieder schließen und neue Depolarisationen überschwellig werden, so dass Up states früher eintreten, sichtbar am reduzierten Zeitintervall_{interburst}. Nun tritt aber der genannte Mechanismus mit steigender NO-711-Konzentration (> 50 nM) wahrscheinlich in den Hintergrund und andere inhibitorische Vorgänge im Netzwerk verkürzen das Zeitintervall_{interburst} nicht weiter (Abb. 16), sondern üben einen gegenteiligen Effekt aus.

Wie schon in der Einleitung vermutet, sollte eine hohe NO-711-Konzentration über synaptisch akkumulierendes GABA die Diffusion von GABA in den extrasynaptischen Raum begünstigen (Fink-Jensen et al., 1992; Frahm et al., 2001), so dass u.a. nicht-desensitisierende extrasynaptische GABA_A -Rezeptoren besetzt werden (Semyanov et al., 2003; Semyanov et al., 2004). Die dadurch entstehenden tonisch-inhibitorischen Ströme (Mody and Pearce, 2004; Scimemi et al., 2006; Stell and Mody, 2002) hyperpolarisieren im Vergleich zu den kurzen (phasischen) IPSCs, die an synaptischen GABA_A -Rezeptoren entstehen, die Membranen über eine längere Zeitdauer (Farrant and Nusser, 2005) und verstärken zudem shunting inhibition (Ulrich, 2003). Es ist also denkbar, dass die an exzitatorischen Neuronen somit abnehmende Eintrittswahrscheinlichkeit aktionspotenzialerzeugender EPSPs eine weitere Senkung der mittleren Feuerrate (Abb. 13), der $\text{RelZeit}_{\text{aktiv}}$ (Abb. 14) und der Burstlänge (Abb. 15) herbeigeführt hat. Auf diese Weise könnten ab einer NO-711-Konzentration von ca. 50 nM tonisch-inhibitorische Ströme ebenso die

einem Up state folgende Zeitspanne (Zeitintervall_{interburst}) (Abb. 16) verlängert haben.

Sowohl cross talk als auch tonische Inhibition erfordern eine ausreichende Menge an diffundiertem GABA. Da die Diffusion von GABA in umliegende Synapsen und in den extrasynaptischen Raum eine bestimmte Zeit in Anspruch nimmt, sollten sich die Effekte von NO-711 nicht schon in der Anfangsphase eines Bursts bemerkbar machen. Mit dieser Hypothese decken sich die Ergebnisse, dass NO-711 zwar die $FR_{\text{spät}}$, aber nicht die $FR_{\text{früh}}$ reduziert (Abb. 17 und Abb. 18).

Im Vergleich zu Experimenten an akuten Schnitten, die NO-711-Effekte im mikromolaren Bereich aufzeigen (Drasbek and Jensen, 2006; Keros and Hablitz, 2005), treten in den spontanaktiven Kulturen der vorliegenden Arbeit schon deutliche Effekte im nanomolaren Bereich auf (EC_{50} : mittlere Feuerrate = 34,07 nM, $RelZeit_{\text{aktiv}} = 37,15$ nM, $Burstlänge = 14,33$ nM). Der geringe Unterschied zwischen EC_{50} in organotypischen Kulturen und $IC_{50} = 47$ nM in Synaptosomen (Suzdak et al., 1992) ist ein Beleg dafür, dass GAT-1 eine aktivitätsbestimmende Bedeutung zukommt. Aufgrund der überwiegend synaptischen Lokalisation der GAT-1 (Borden, 1996; Conti et al., 2004) haben Effekte, die durch NO-711 ausgelöst werden, ihre Grundlage höchstwahrscheinlich überwiegend in der synaptischen GABA-Ausschüttung. Da in spontanaktiven Schnittkulturen pro Zeiteinheit mehr GABA ausgeschüttet wird als in akuten Schnitten, reichen vermutlich geringere Mengen an NO-711 aus, um sichtbare Auswirkungen zu erzeugen.

Die große Streuung der mittleren Feuerrate bei der niedrigsten NO-711-Konzentration (10 nM) (Abb. 13) könnte damit zu erklären sein, dass sich einige Neurone unter Kontrollbedingungen bei Beginn eines Bursts kurzfristig im Depolarisationsblock befinden. Eine geringe Verstärkung der Inhibition durch niedrige Konzentrationen an NO-711 könnte dem Depolarisationsblock jener Neurone entgegenwirken und – scheinbar paradoxerweise – die Aktionspotenzialrate in dieser Phase erhöhen. Somit würde sich auch die Streuung der mittleren Feuerrate bei niedrigen NO-711-Konzentrationen vergrößern. Durch steigenden inhibitorischen Einfluss infolge zunehmender

NO-711-Konzentration erhöht sich der Anteil jener Neuronen, deren Aktivität abnimmt, was sich schließlich in der niedrigeren Streuung widerspiegelt.

Doch wieso kann NO-711 in den hier applizierten Konzentrationen keine vollständige Inhibition bewirken (Abb. 13 bis Abb. 15)? Die Ursache liegt vermutlich in der Abhängigkeit der GABA-Ausschüttung von der Netzwerkaktivität. Mit nachlassender neokortikaler Aktivität, hervorgerufen durch NO-711, nimmt die GABA-Freisetzung und somit auch die Grundlage für die Effekte von NO-711 ab. So kann die Inhibition mit steigender NO-711-Konzentration nur so lange intensiviert werden, bis ein neokortikales Aktivitätsniveau erreicht ist, das durch unzureichende GABA-Ausschüttung eine weitere Steigerung der von NO-711 herbeigeführten Inhibition verhindert.

4.3. Ein Vergleich der Wirkung von NO-711 und gebräuchlichen Anästhetika

Im Folgenden soll der eingangs gestellten Frage nachgegangen werden, in wie weit sich die Hemmung der Netzwerkaktivität durch NO-711 von jener Hemmung unterscheidet, die durch gebräuchliche Anästhetika herbeigeführt wird. Dieser Aspekt ist im Hinblick auf einen möglichen Einsatz von GABA-Transporter-Blockern in der klinischen Anästhesiologie von großem Interesse.

Vergleicht man die In-vitro-Effekte von NO-711 mit Effekten der volatilen Anästhetika Isofluran und Enfluran, fällt auf, dass die mittleren Feuerraten durch Isofluran bzw. Enfluran im Gegensatz zu NO-711 (Abb. 13) vollständig gehemmt werden (Antkowiak and Helfrich-Förster, 1998). Dieser Unterschied könnte auf das breite Wirkspektrum volatiler Anästhetika zurückzuführen sein. Diese vermitteln Hemmung im ZNS nicht nur über die Modulation von GABA_A-, sondern u.a. auch von Glutamat- und Glycin-Rezeptoren sowie spannungsabhängigen Leitfähigkeiten (Grasshoff et al., 2005; Grasshoff et al., 2006; Patel and Honoré, 2001; Rudolph and Antkowiak, 2004), wohingegen die Wirkung von NO-711 ausschließlich GABA-Rezeptoren zuzuschreiben ist. Ebenso können die intravenösen Anästhetika und spezifische GABA_A-Rezeptor-Modulatoren Propofol, Pentobarbital und Etomidate keine vollständige

Hemmung der mittleren Feuerrate bewirken (Antkowiak, 1999;Grasshoff et al., 2007), da sie in klinisch gebräuchlichen Konzentrationen lediglich GABA_A-Rezeptoren modulieren. Womöglich reicht eine aktivitätsabhängige Modulation von GABA-Rezeptoren nicht aus, um kortikale Netzwerkaktivität vollkommen zu supprimieren.

Isofluran, Enfluran und Propofol senken die mittlere Feuerrate ausschließlich über eine Reduktion der Burstfrequenz (Antkowiak, 1999). Im Gegensatz dazu reduzieren Pentobarbital und Etomidate die mittlere Feuerrate ausschließlich über eine Depression der Feuerrate innerhalb der Bursts (Antkowiak, 1999;Drexler et al., 2005). Hier unterscheidet sich NO-711 von den genannten volatilen und intravenösen Anästhetika, indem es die mittlere Feuerrate sowohl über eine Reduktion der Feuerrate innerhalb der Bursts (Abb. 17 und Abb. 18) als auch über die Senkung der Burstfrequenz bei Konzentrationen über 50 nM (Abb. 16) verringert. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass nur unter NO-711, aber unter keinem der oben genannten volatilen und intravenösen Anästhetika, eine Verkürzung der Burstlänge beobachtet wurde (Abb. 15). Somit stellt sich die Frage, was die Ursachen für die Effektunterschiede zwischen NO-711 und den oben genannten Anästhetika sein könnten.

Hierbei ist der zentrale Punkt die Akkumulation von GABA im System durch NO-711. Vermutlich erschwert eine hohe (> 50 nM) Konzentration an NO-711 über die Induktion tonischer Ströme auch während der Down states die Generierung von Up states. Solch eine tonische Komponente, wie sie auch bei Propofol und Isofluran beobachtet wurde (Bai et al., 2001;Caraiscos et al., 2004;Drasbek et al., 2007), kann umso mehr als Ursache für die Reduktion der Burstfrequenz gesehen werden, als die Applikation von 50 µM GABA das „Feuermuster“ in gleicher Weise verändert (Antkowiak, 1999). Zusätzlich öffnen Isofluran und Enfluran spannungsabhängige Kaliumkanäle und führen somit zur Hyperpolarisierung von Neuronen (Patel and Honoré, 2001).

Dass NO-711 im Gegensatz zu den meisten untersuchten Anästhetika auch die Burstlänge verkürzt, liegt vermutlich am progressiven Charakter der Inhibition durch akkumulierendes GABA: Je länger das kortikale Netzwerk aktiv

ist, desto mehr GABA_A-Rezeptoren sollten aktiviert werden, da mehr Transmitter ausgeschüttet als abtransportiert wird. Dies steht in scharfem Kontrast zum inhibitorischen Mechanismus von GABAergen Anästhetika wie Pentobarbital und Etomidate: Diese Substanzen verlangsamen die Abklingzeit von IPSCs und hemmen somit in Abhängigkeit von der Feuerrate inhibitorischer Neurone, jedoch weitestgehend unabhängig vom Zeitpunkt innerhalb eines Bursts. Auf der Basis dieser unterschiedlichen Mechanismen ist zu erklären, dass Pentobarbital und Etomidate die Dichte an Aktionspotenzialen pro Burst verringern ohne die Burstlänge zu beeinflussen, unter NO-711 hingegen die Bursts progressiv „ausdünnen“, bis hin zum früheren Abbruch.

4.4. Kortikale Aktivität unter Blockade GABAerger Rezeptoren

Zur Überprüfung der Hypothese, inwieweit die beobachteten Effekte von NO-711 auf kortikale Feuermuster über GABA_A-Rezeptoren vermittelt wurden, kam in einer separaten Serie von Experimenten der GABA_A-Rezeptoren-Blocker Bicucullin zum Einsatz.

Als kompetitiver allosterischer Inhibitor von GABA_A-Rezeptoren reduziert Bicucullin inhibitorische Ströme (Ueno et al., 1997) und senkt somit einen wichtigen Teil des hemmenden Inputs im System, was als Disinhibition bezeichnet werden kann. Disinhibition synchronisiert Aktivität im Netzwerk und führt auf diese Weise zu paroxysmalen Entladungen im Neokortex (Connors, 1984). Unter bestimmten Bedingungen erzeugt Disinhibition in spontanaktiven Kulturen einfache oszillatorische Aktivität (Castro-Alamancos, 2000; Castro-Alamancos and Rigas, 2002) oder in akuten Schnitten nach Stimulation sogar epileptiforme Entladungsmuster (Hwa et al., 1991). Die durch 100 µM Bicucullin disinhibierten organotypischen Kulturen erzeugten Spontanaktivität, deren Up states sich in Länge und Muster nur minimal voneinander unterschieden (Abb. 19 und Abb. 20). Dies könnte daran liegen, dass die Neurone infolge der Blockade inhibitorischer Eingänge nach Beginn der Up states sofort massiv „losfeuern“ und folglich auch viel exzitatorischen Neurotransmitter ausschütten. Der darauf folgende enorme Kalziumeinstrom in die Zellen öffnet rasch

kalziumabhängige Kaliumkanäle (Madison and Nicoll, 1984; Sah, 1996; Schwandt et al., 1988), was zu einem frühen Abbruch der Erregung führt. Ebenso könnte synaptische Erschöpfung glutamaterger Neurone (Staley et al., 1998) die frühzeitige Beendigung der Up states herbeiführen. In der Summe engt Disinhibition somit den ursprünglichen „Spielraum“ für die Generierung verschiedener Aktivitätsmuster ein, erkennbar am monotonen Muster der Up states.

4.5. GABA_A-Rezeptoren sind entscheidend für die Wirkungen von NO-711

Die Effekte von NO-711 unter GABA_A-Rezeptor-Blockade waren im Vergleich zu Kontrollbedingungen stark abgeschwächt. Zwar veränderte NO-711 die $RelZeit_{aktiv}$ und das $Zeitintervall_{interburst}$, jedoch nicht die mittlere Feuerrate und die Burstlänge signifikant (Abb. 21). Daraus lässt sich schließen, dass NO-711 über eine Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren die mittlere Feuerrate kortikaler Neurone senkt und Up states verkürzt.

Welche Mechanismen sind für die Verlängerung der neuronalen Ruhephasen zwischen den Bursts und die daraus resultierende Absenkung der $RelZeit_{aktiv}$ verantwortlich? Es ist davon auszugehen, dass für die Verlängerung der neuronalen Ruhephasen GABA_B-Rezeptoren von Bedeutung sind. Hierzu zählen einerseits die postsynaptischen GABA_B-Rezeptoren, die überwiegend extrasynaptisch lokalisiert sind und andererseits präsynaptische GABA_B-Rezeptoren, die auf erregenden Zellen zu finden sind (Calver et al., 2002). Die Aktivierung postsynaptischer GABA_B-Rezeptoren erhöht die Kaliumleitfähigkeit erregender Neurone (Gähwiler and Brown, 1985; Otis et al., 1993) und induziert ein verzögertes langsames inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP_B) (Connors et al., 1988; Davies et al., 1990).

Falls auch präsynaptische GABA_B-Rezeptoren exzitatorischer Neurone aktiviert werden, vermindert sich die Ausschüttung von exzitatorischem Transmitter und die hierdurch bewirkte Erregung an postsynaptischen Membranen nimmt ab. Am Ende steht der reduzierte exzitatorische Input im

neokortikalen Netzwerk, was die Zeit verlängert, die das Netzwerk braucht, um den Schwellenwert zum „Zünden“ eines Up states zu erreichen.

4.6. Die Blockade von GABA_B-Rezeptoren verändert die Wirkung von NO-711

Die Blockade von GABA_B-Rezeptoren führt zu einer deutlichen Veränderung der Aktivitätsmuster kortikaler Neurone. Einerseits verlängern sich Aktivitätsphasen und –pausen, andererseits besitzen die Aktivitätsphasen klarer abgegrenzte Einzelbursts (Abb. 22).

Durch die Blockade von GABA_B-Rezeptoren verliert NO-711 Teilaspekte seiner hemmenden Wirkung. Der Anteil der Zeit ($RelZeit_{aktiv}$), den die Netzwerke aktiv sind, sinkt mit Applikation von NO-711 weniger deutlich (Abb. 24). Dies ist ein Hinweis auf eine maßgebliche Beteiligung von GABA_B-Rezeptoren an der Kontrolle spontaner kortikaler Aktivität, wenn die Wiederaufnahme von GABA vermindert wird (siehe jedoch weiter unten). Die mittleren Feuerraten hingegen werden mit blockierten GABA_B-Rezeptoren genauso stark gehemmt wie mit funktional intakten GABA_B-Rezeptoren (Abb. 23). Dieses Ergebnis steht in sehr guter Übereinstimmung mit dem Befund, dass mittlere Feuerraten über GABA_A-Rezeptoren reguliert werden (Abb. 21). Zusammengenommen führen beide Beobachtungen zu dem Schluss, dass bei gehemmter GABA-Wiederaufnahme Disinhibition (via Blockade von GABA_B-Rezeptoren) die mittlere Dichte an Aktionspotenzialen in Phasen neuronaler Aktivität (Up states) senkt. Dies erscheint paradox, wenn lediglich ein Effekt des Blockers auf postsynaptische GABA_B-Rezeptoren angenommen wird. Wie bereits erwähnt kommen GABA_B-Rezeptoren jedoch auch präsynaptisch sowohl auf hemmenden wie erregenden Synapsen vor (Calver et al., 2002). Es ist daher denkbar, dass eine Disinhibition inhibitorischer Neurone – d.h. ein Mehr an Inhibition – durch CGP 55845 andere, erregende Effekte des Blockers mehr als kompensiert und so die Ausdünnung der Aktionspotenziale verursacht. Ein alternativer, wahrscheinlicherer Grund liegt in der qualitativen Änderung der Aktivitätsmuster durch CGP 55845. Die teilweise sehr langen und komplexen

Aktivitätsphasen in Gegenwart von CGP 55845 enthielten Einzelbursts, die durch Pausen neuronaler Aktivität getrennt waren. Sowohl Einzelbursts als auch Pausen wurden zum Ende der Aktivitätsphasen meist länger (Abb. 22 zeigt dies exemplarisch). Da aufgrund dieser Dynamik eine Auftrennung der Aktivitätsmuster in Bursts wie unter Kontrollbedingungen arbiträr gewesen wäre – je nach Abbruchkriterium (ii), wie in den Methoden beschrieben, hätte dies in vielen kurzen oder wenigen langen Bursts resultiert – wurden die sehr langen Aktivitätsphasen, inklusive langer Pausen am Ende, zusammengefasst und als ein Burst betrachtet. Es ist daher möglich, dass bei einer alternativen Quantifizierung der $RelZeit_{aktiv}$ (z.B. auf der Basis des Membranpotenzials in intrazellulären Messungen) die Unterschiede in diesem Aspekt spontaner Aktivität mit und ohne Blockade von GABA_B-Rezeptoren geringer ausfallen.

Das zeitliche Auftreten von Aktionspotenzialen innerhalb von Bursts untermauert jedoch die Hypothese einer Beteiligung von GABA_B-Rezeptoren an der hemmenden Wirkung von NO-711: In der Gegenwart von CGP 55845 ist nach Applikation von 250 nM NO-711 die Dichte an Aktionspotenzialen im Vergleich zu NO-711 ohne CGP 55845 höher (Abb. 27), doch dies erst 100 - 500 ms nach Beginn eines Bursts ($FR_{spät}$). Wie schon im Falle des synaptischen cross talks und der tonischen Inhibition argumentiert wurde, resultiert diese Latenz wahrscheinlich aus der GABA-Diffusion aus dem synaptischen Spalt zu extra- und präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren, die Zeit in Anspruch nimmt (Calver et al., 2002). Sie ist wahrscheinlich auch auf die langsame Kinetik der IPSC_{BS} zurückzuführen, die maßgeblich von der Signaltransduktion GABA_B-Rezeptor→G-Proteine→K⁺-Kanal bestimmt wird (Otis et al., 1993).

4.7. Hemmung von GABA-Transportern im klinischen Kontext: Heterotransport und tonische Ströme

In der bisherigen Erörterung der Ergebnisse wurde angenommen, dass GAT-1 GABA vom extrazellulären Raum ins Zellinnere transportiert. Der Transport in die umgekehrte Richtung, genannt GABA-Heterotransport, kann auftreten,

wenn neuronale Aktivität extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen kurzfristig verschiebt (Gaspary et al., 1998; Richerson and Wu, 2003; Wu et al., 2001; Wu et al., 2007). Dies bedeutet, dass GABA-Transporter eine neuronal hemmende Wirkung haben können, indem sie einen extrazellulären GABA-Spiegel aufrechterhalten. Eine Beeinträchtigung des GABA-Transports sollte demzufolge eine neuronal *erregende* Wirkung haben, wie im Gyrus Dentatus von Ratten mit induzierter Epilepsie und im Temporallappen epilepsiekranker Menschen gezeigt wurde (Patrylo et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit gab es jedoch keine Hinweise auf eine erregende Wirkung des GAT-1-Blockers NO-711. Dies ist im Einklang mit anderen In-vitro-Studien, die gezeigt haben, dass eine Blockade der GABA-Wiederaufnahme durch GAT-1 die extrazelluläre GABA-Konzentration erhöht, dadurch tonische GABAerge Ströme induziert werden und diese Blockade daher hemmend wirkt (Frahm et al., 2001; Jensen et al., 2003; Keros and Hablitz, 2005; Semyanov et al., 2003). Auch die klinische Verwendung von Blockern der GABA-Wiederaufnahme bei Krankheitsbildern, die durch exzessive neuronale Aktivität gekennzeichnet sind, spricht für eine insgesamt zentralnervös dämpfende Wirkung dieser Substanzen (Genton et al., 2001).

Wie die Manipulation an GABA-Transportern, so wirken sich ebenso diverse Pharmaka auf tonische Ströme aus, nachdem sie an extrasynaptische GABA-Rezeptoren gebunden haben, was sich in einer Veränderung der Feuermuster äußern kann (Semyanov et al., 2004). Im klinischen Alltag eingesetzte Medikamente wie die intravenösen Anästhetika Propofol und Etomidate oder das volatile Anästhetikum Isofluran beeinflussen wie schon erwähnt neben der phasischen auch die tonische Inhibition signifikant (Bai et al., 2001; Caraiscos et al., 2004; Drasbek et al., 2007). Auch Benzodiazepine wie Midazolam oder Zolpidem können tonische Ströme erhöhen, wie im Hippokampus (Caraiscos et al., 2004; Semyanov et al., 2003) und Neokortex (Yamada et al., 2006) gezeigt wurde. Das schlafinduzierende Medikament THIP setzt infolge seiner Präferenz für δ -Untereinheiten an extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren des Neokortex an und induziert dort tonische Ströme.

Die Unterschiede im klinischen Einsatzspektrum GABAerger Pharmaka könnten unter anderem auf ihre Potenz, tonische Ströme zu beeinflussen, zurückzuführen sein (Bai et al., 2001). Als Beispiel sei das Medikament Propofol erwähnt, das Patienten im Status epilepticus (Grand mal) zur Narkoseeinleitung verabreicht wird, mit dem Ziel, den Krampfanfall zu „durchbrechen“, wenn dies mit Benzodiazepinen nicht gelingt (Miller and Drislane, 2008). Doch ist es sicherlich nicht korrekt, diesen Effekt nur auf die höhere Potenz von Propofol gegenüber Benzodiazepinen, tonische Ströme zu verstärken, zurückzuführen (Bai et al., 2001). Ebenso spielt bei dem klinischen Wirkungsspektrum die Spezifität dieser Substanzen für bestimmte Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren eine Rolle, sowie die Verteilung dieser Untereinheiten im Zentralen Nervensystem (Grasshoff et al., 2006; Rudolph and Antkowiak, 2004).

Eine Auswirkung tonischer Ströme auf Feuermuster (Semyanov et al., 2004) hängt nicht nur von deren Stärke, sondern auch davon ab, an welchen Neuronen im Netzwerk die Ströme ausgeprägt werden. Nicht nur Pyramidenzellen, sondern auch Interneurone erfahren im ZNS tonische Ströme (Scimemi et al., 2006; Semyanov et al., 2003). Im Neokortex ist die Stärke tonischer Ströme in Interneuronen von der Schichtlokalisation und vom Interneuronentyp abhängig (Drasbek et al., 2007; Drasbek and Jensen, 2006; Vardya et al., 2008). So kann eine Erhöhung tonischer Ströme unter Umständen über Disinhibition auch fördernd auf neokortikale Aktivität wirken, was die Komplexität der Signalverarbeitung in den Netzwerken des ZNS verdeutlicht.

4.8. Ausblick

Der GABA Transporter GAT-1 ist für die Wiederaufnahme von GABA und somit für die Regulation der extrazellulären GABA-Konzentration von zentraler Bedeutung (Borden, 1996;Conti et al., 2004;Keros and Hablitz, 2005). In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass GAT-1 an der Kontrolle neokortikaler Spontanaktivität beteiligt ist. Es erscheint interessant, in weiterführenden Experimenten zu klären, inwiefern andere GABA-Transporter wie GAT-2 und GAT-3 kortikale Spontanaktivität beeinflussen. Sowohl elektrophysiologische Studien (Keros and Hablitz, 2005;Kinney, 2005) als auch der anatomische Befund einer eher synapsenfernen Lokalisation dieser Transporter (Borden, 1996;Conti et al., 2004) lassen vermuten, dass sie kortikale Aktivität in anderer Weise beeinflussen als GAT-1.

Als Spekulation sei am Ende nochmals erwähnt, dass eine Kombination von GAT-Blockern und Anästhetika, die über GABA_A-Rezeptoren wirken, möglicherweise einen großen Vorteil in sich birgt, indem beispielsweise über eine stärkere Aktivierung extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren und einen induzierten cross talk durch GAT-Blocker eine Reduktion der klinischen Dosierung bestimmter Anästhetika erreicht werden könnte. Dies würde die Eintrittswahrscheinlichkeit bekannter Nebenwirkungen solcher Anästhetika senken. So könnte der nächste Schritt sein, herauszufinden, wie sich die Wirkungen von schon untersuchten Anästhetika (z.B. Propofol) verändern, wenn zusätzlich die Wiederaufnahme von GABA durch NO-711 gehemmt wird.

5. Zusammenfassung

Viele klinisch gebräuchliche Anästhetika vermindern die Aktivität von Nervenzellen in Gehirn und Rückenmark, indem sie GABA_A-Rezeptoren, Zielstrukturen des hemmenden Botenstoffs γ -Aminobuttersäure (GABA), positiv modulieren. Ein anderer, bisher jedoch kaum untersuchter Mechanismus, zentralnervöse Hemmung zu verstärken, besteht darin, die Wiederaufnahme von GABA zu hemmen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie eine Hemmung der Wiederaufnahme von GABA durch NO-711 spontane neuronale Aktivität im Neokortex *in vitro* beeinflusst und inwieweit sich diese Effekte von den in der Literatur beschriebenen Wirkungen gebräuchlicher Anästhetika unterscheiden.

Extrazelluläre Messungen in organotypischen Schnittkulturen, deren Spontanaktivität durch Zustände hoher (Up states) und niedriger (Down states) Aktivität charakterisiert ist, zeigten mit steigender NO-711-Konzentration eine Reduktion der mittleren Feuerrate ($EC_{50} = 34,07$ nM), der relativen Zeitdauer, in der sich der Neokortex im aktiven Zustand befand ($RelZeit_{aktiv}, EC_{50} = 37,15$ nM) und der mittleren Länge aktiver Phasen (Burstlänge, $EC_{50} = 14,33$ nM). Die Feuerraten innerhalb der späten Phase der Up states (100 – 500 ms nach Beginn eines Up states) nahmen konzentrationsabhängig ab, nicht jedoch die Feuerraten in der frühen Phase (0 – 50 ms nach Beginn eines Up states). Die durch NO-711 induzierten Feuermuster wiesen Parallelen zu jenen mit klinisch gebräuchlichen Anästhetika auf, unterschieden sich jedoch von diesen durch eine außerordentlich starke Verkürzung der Aktivitätsphasen.

Der Stellenwert von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren als Vermittler der Effekte von NO-711 wurde durch pharmakologische Blockade ermittelt. 100 μ M des GABA_A-Rezeptoren-Blockers Bicucullin bewirkte, dass NO-711 (250 nM) die mittlere Feuerrate und Burstlänge nicht zu reduzieren vermochte. Blockade der GABA_B-Rezeptoren durch 10 μ M CGP 55845 änderte die NO-711-Dosis-Wirkungs-Kurve der mittleren Feuerrate ($EC_{50} = 33,36$ nM) nicht signifikant ($p = 0,194$), jedoch signifikant ($p < 0,001$) die Kurve der $RelZeit_{aktiv}$ ($EC_{50} = 358,79$ nM). CGP 55845 reduzierte den durch NO-711 herbeigeführten Abfall der

Feuerraten innerhalb der späten Phase der Up states. Diese Ergebnisse zeigen, dass GABA_A-Rezeptoren zwar die entscheidende Rolle bei den Effekten von NO-711 zukommt, jedoch der Einfluss der GABA_B-Rezeptoren hierbei nicht zu vernachlässigen ist.

In der Summe erwies sich NO-711 als eine hocheffizient aktivitätsdämpfende Substanz, die aufgrund putativer Synergismen mit Modulatoren des GABA_A-Rezeptors möglicherweise in Zukunft eine Anwendung in der Anästhesie finden könnte.

6. Quellenverzeichnis für Abbildungen

- Abb. 1** modifiziert nach Drexler et al., 2006
- Abb. 2** Drexler et al., 2006
- Abb. 3** freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Antkowiak
- Abb. 4** modifiziert nach Keros and Hablitz, 2005
- Abb. 5** freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Antkowiak
- Abb. 6** modifiziert nach Gähwiler et al., 1997
- Abb. 7** modifiziert nach Suzdak et al., 1992

7. Literaturverzeichnis

1. Antkowiak B (1999) Different actions of general anesthetics on the firing patterns of cortical neurons mediated by the GABA_A receptor. *Anesthesiology* 91: 500-511.
2. Antkowiak B, Helfrich-Förster C (1998) Effects of small concentrations of volatile anesthetics on action potential firing of neocortical neurons in vitro. *Anesthesiology* 88: 1592-1605.
3. Antkowiak B, Hentschke H (1999) Zentralnervöse Wirkungen von Schlaf- und Narkosemitteln. In: *Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft (Generalverwaltung der Max-Planck-Gesellschaft, ed)*, pp 227-237. München.
4. Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, Macdonald JF (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 59: 814-824.
5. Bennett BD, Huguenard JR, Prince DA (1997) Adrenoreceptor-mediated elevation of ambient GABA levels activates presynaptic GABA(B) receptors in rat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 78: 561-566.
6. Berger T, Borgdorff A, Crochet S, Neubauer FB, Lefort S, Fauvet B, Ferezou I, Carleton A, Lüscher H-R, Petersen CCH (2007) Combined voltage and calcium epifluorescence imaging in vitro and in vivo reveals subthreshold and suprathreshold dynamics of mouse barrel cortex. *J Neurophysiol* 97: 3751-3762.
7. Borden LA (1996) GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* 29: 335-356.
8. Calver AR, Davies CH, Pangalos M.N. (2002) GABA(B) receptors: from mongamy to promiscuity. *Neurosignals* 11: 299-314.
9. Canepari M, Bove M, Maeda E, Cappello M, Kawana A (1997) Experimental analysis of neuronal dynamics in cultured cortical networks and transitions between different patterns of activity. *Biol Cybern* 77: 153-162.
10. Caraiscos VB, Newell JG, You T, Elliott EM, Rosahl TW, Wafford KA, Macdonald JF, Orser BA (2004) Selective enhancement of tonic GABAergic inhibition in murine hippocampal neurons by low concentrations of the volatile anesthetic isoflurane. *J Neurosci* 24: 8454-8458.
11. Castro-Alamancos MA (2000) Origin of synchronized oscillations induced by neocortical disinhibition in vivo. *J Neurosci* 20: 9195-9206.

12. Castro-Alamancos MA, Rigas P (2002) Synchronized oscillations caused by disinhibition in rodent neocortex are generated by recurrent synaptic activity mediated by AMPA receptors. *J Physiol* 542: 567-581.
13. Chagnac-Amitai Y, Connors BW (1989) Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol* 62: 1149-1162.
14. Clements JD (1996) Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19: 163-171.
15. Compte A, Sanchez-Vives M, McCormick DA, Wang X-J (2003) Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) and wave propagations in a cortical network model. *J Neurophysiol* 89: 2707-2725.
16. Connors BW (1984) Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature* 310: 685-687.
17. Connors BW, Malenka RC, Silva LR (1988) Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABA(A) and GABA(B) receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *J Physiol* 406: 443-468.
18. Conti F, Minelli A, Melone M (2004) GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research Reviews* 45: 196-212.
19. Cossart R, Aronov D, Yuste R (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423: 283-288.
20. Davies CH, Davies SN, Collingridge GL (1990) Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J Physiol* 424: 513-531.
21. Drasbek KR, Hoestgaard-Jensen K, Jensen (2007) Modulation of extrasynaptic THIP conductances by GABA(A) receptor modulators in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 97: 2293-2300.
22. Drasbek KR, Jensen K (2006) THIP, a hypnotic and antinociceptive drug, enhances an extrasynaptic GABA(A) receptor-mediated conductance in mouse neocortex. *Cereb Cortex* 16: 1134-1141.
23. Drexler B, Grasshoff C, Rudolph U, Unertl K, Antkowiak B (2006) Die GABA(A)-Rezeptor-Familie. *Der Anaesthetist* 55: 287-295.
24. Drexler B, Roether CL, Jurd R, Rudolph M, Antkowiak B (2005) Opposing actions of etomidate on cortical theta oscillations are mediated by different γ -aminobutyric acid type A receptor subtypes. *Anesthesiology* 102: 346-352.

25. Eccles JC (1964) *The physiology of synapses*. Canberra, Australia: Springer-Verlag.
26. Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA receptors. *Nat Rev Neurosci* 6: 215-229.
27. Fink-Jensen A, Suzdak PD, Swedberg MDB, Judge ME, Hansen L, Nielsen PG (1992) The gamma-aminobutyric acid (GABA) uptake inhibitor, tiagabine, increases extracellular brain levels of GABA in awake rats. *Eur J Pharmacol* 220: 197-201.
28. Flint AC, Connors BW (1996) Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *J Neurophysiol* 75: 951-956.
29. Flint AC, Maisch US, Kriegstein AR (1997) Postnatal development of low $[Mg^{2+}]$ Oscillations in neocortex. *J Neurophysiol* 78: 1990-1996.
30. Frahm C, Engel D, Draguhn A (2001) Efficacy of background GABA uptake in rat hippocampal slices. *NeuroReport* 12: 1593-1596.
31. Gähwiler BH (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4: 329-342.
32. Gähwiler BH, Brown DA (1985) GABA(B)-receptor-activated K^+ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1558-1562.
33. Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20: 471-477.
34. Gaspary HL, Wang W, Richerson GB (1998) Carrier-mediated GABA release activated GABA receptors on hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 80: 270-281.
35. Genton P, Guerrini R, Perucca E (2001) Tiagabine in clinical practise. *Epilepsia* 42: 42-45.
36. González-Burgos G, Rotaru DC, Zaitsev AV, Povysheva NV (2009) GABA transporter GAT1 prevents spillover at proximal and distal GABA synapses onto primate prefrontal cortex neurons. *J Neurophysiol* 101: 533-547.
37. Grasshoff C, Drexler B, Rudolph U, Antkowiak B (2006) Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects. *Curr Pharm Des* 12: 1-15.

38. Grasshoff C, Jurd R, Rudolph U, Antkowiak B (2007) Modulation of presynaptic β -containing GABAA receptors limits the immobilizing actions of GABAergic anesthetics. *Mol Pharmacol* 72: 780-787.
39. Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B (2005) Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanism' concept. *Curr Opin Anaesthesiol* 18: 386-391.
40. Gutnick MJ, Wolfson B, Baldino F Jr (1989) Synchronized neuronal activities in neocortical explant cultures. *Exp Brain Res* 76: 131-140.
41. Haider B, Duque A., Hasenstaub A, McCormick DA (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J Neurosci* 26: 4535-4545.
42. Hájos N, Nusser Z, Rancz EA, Freund TF, Mody I (2000) Cell type- and synapse-specific variability in synaptic GABA_A receptor occupancy. *Eur J Neurosci* 12: 810-818.
43. Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B (2005) Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA_A receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* 21: 93-102.
44. Hoffman DA (2005) Tiagabine for rage, aggression and anxiety. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17: 2.
45. Hwa GG, Avoli M, Oliver A, Villemure JG (1991) Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp Brain Res* 83: 329-339.
46. Jensen K, Chiu C, Sokolova I, Lester HA, Mody I (2003) GABA transporter-1 (GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABA(A) versus GABA(B) receptors in the hippocampus. *J Neurophysiol* 90: 2690-2701.
47. Katayama S, Irifune M, Kikuchi N, Takarada T, Shimizu Y, Endo C, Takata T, Dohi T, Sato T, Kawahara M (2007) Increased gamma-aminobutyric acid levels in mouse brain induce loss of righting reflex, but not immobility, in response to noxious stimulation. *Anesth Analg* 104: 1422-9, table.
48. Kawaguchi Y (2001) Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. *J Neurosci* 21: 7261-7272.
49. Keros S, Hablitz JJ (2005) Subtype-specific GABA transporter antagonist synergistically modulate phasic and tonic GABA(A) conductances in rat neocortex. *J Neurophysiol* 94: 2073-2085.

50. Kinney GA (2005) GAT-3 transporters regulate inhibition in the neocortex. *J Neurophysiol* 94: 4533-4537.
51. Léger J-F, Stern EA, Aertsen A, Heck D (2005) Synaptic integration in rat frontal cortex shaped by network activity. *J Neurophysiol* 93: 281-293.
52. Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354: 319-331.
53. Maeda E, Robinson HPC, Kawana A (1995) The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *J Neurosci* 15: 6834-6845.
54. Margrie TW, Brecht M, Sakmann B (2002) In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Arch* 444: 491-498.
55. Miller LC, Drislane FW (2008) Treatment of status epilepticus. *Expert Rev Neurother* 8: 1817-1827.
56. Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17: 517-525.
57. Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27: 569-575.
58. Morimoto K, Sato H, Yamamoto Y, Watanabe T, Suwaki H (1997) Antiepileptic effects of tiagabine, a selective GABA uptake inhibitor, in the rat kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 38: 966-974.
59. Motulsky HJ, Christopoulos A (2003) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. San Diego, CA: GraphPad Software Inc.
60. Nusser Z, Mody I (2002) Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 87: 2624-2628.
61. Otis TS, Koninck YD, Mody I (1993) Characterization of synaptically elicited GABA(B) responses using patch-clamp recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol* 463: 391-407.
62. Overstreet LS, Jones MV, Westbrook GL (2000) Slow desensitization regulates the availability of synaptic GABA(A) receptors. *J Neurosci* 20: 7914-7921.
63. Overstreet LS, Westbrook GL (2003) Synapse density regulates independence at unitary inhibitory synapses. *J Neurosci* 23: 2618-2626.
64. Patel AJ, Honoré E (2001) Anesthetic-sensitive 2P domain K⁺ channels. *Anesthesiology* 95: 1013-1021.

65. Patrylo PR, Spencer DD, Williamson A (2001) GABA uptake and heterotransport are impaired in the dentate gyrus of epileptic rats and humans with temporal lobe sclerosis. *J Neurophysiol* 85: 1533-1542.
66. Petersen CCH, Hahn TTG, Mehta M, Grinvald A, Sakmann B (2003) Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13638-13643.
67. Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, Hadingham KL, Hutson PH, Belelli D, Lambert JJ, Dawson GR, McKernan R, Whiting PJ, Wafford KA (2003) Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA_A receptor isoforms. *J Neurosci* 23: 8608-8617.
68. Richerson GB, Wu Y (2003) Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J Neurophysiol* 90: 1363-1374.
69. Robinson HPC, Kawahara M, Jimbo Y, Torimitsu K, Kuroda Y, Kawana A (1993) Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons. *J Neurophysiol* 70: 1606-1616.
70. Rudolph U, Antkowiak B (2004) Molecular and neuronal substrates for general anesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5: 709-720.
71. Sah P (1996) Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19: 150-154.
72. Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3: 1027-1034.
73. Schulte am Esch J, Bause H, Kochs E, Scholz J, Standl T, Werner C, . (2007) Allgemeinanästhesie. In: *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* pp 93-207. Stuttgart: Thieme.
74. Schwindt PC, Spain WJ, Foehring RC, Stafstrom CE, Chubb MC, Crill WE (1988) Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J Neurophysiol* 59: 424-449.
75. Scimemi A, Andersson A, Heeroma JH, Strandberg J, Rydenhag B, McEvoy AW, Thom M, Asztely F, Walker MC (2006) Tonic GABA(A) receptor-mediated currents in human brain. *Eur J Neurosci* 24: 1157-1160.

76. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM (2003) GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* 6: 484-490.
77. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonic active GABA(A) receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27: 262-269.
78. Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced activity. *Nature* 423: 288-293.
79. Staley KJ, Longacher M, Bains JS, Yee A (1998) Presynaptic modulation of CA3 network activity. *Nat Neurosci* 1: 201-209.
80. Stell BM, Mody I (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22: 1-5.
81. Steriade M, Nunez A, Amzica F (1993) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci* 13: 3252-3265.
82. Suzdak PD, Frederiksen K, Andersen KE, Sorensen PO, Knutsen LJ, Nielsen EB (1992) NNC-711, a novel potent and selective gamma-aminobutyric acid uptake inhibitor: pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol* 224: 189-198.
83. Tabak J, Rinzel J, O'Donovan MJ (2001) The role of activity-dependent network depression in the expression and self-regulation of spontaneous activity in the developing spinal cord. *J Neurosci* 21: 8966-8978.
84. Thomson AM, West DC (1986) N-methylaspartate receptors mediate epileptiform activity evoked in some, but not all, conditions in rat neocortical slices. *Neuroscience* 19: 1161-1177.
85. Ueno S, Bracamontes J, Zorumski C, Weiss DS, Steinbach JH (1997) Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA_A receptor. *J Neurosci* 17: 625-634.
86. Ulrich D (2003) Differential arithmetic of shunting inhibition for voltage and spike rate in neocortical pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 18: 2159-2165.
87. Vardya I, Drasbek KR, Dósa Z, Jensen K (2008) Cell type-specific GABA(A) receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 100: 526-532.
88. Wu Y, Wang W, Diez-Sampedro A, Richerson GB (2007) Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron* 56: 851-865.

89. Wu Y, Wang W, Richerson GB (2001) GABA transaminase inhibition induces spontaneous and enhances depolarization-evoked GABA efflux via reversal of the GABA transporter. *J Neurosci* 21: 2630-2639.
90. Yamada J, Furukawa T, Ueno S, Yamamoto S, Fukuda A (2006) Molecular basis for the GABA(A) receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex*.
91. Ziburkus J, Cressman JR, Barreto E, Schiff SJ (2006) Interneuron and pyramidal cell interplay during in vitro seizure-like events. *J Neurophysiol* 95: 3948-3954.

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. rer. nat. B. Antkowiak, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, theoretische Kenntnisse und praktische Fähigkeiten des wissenschaftlichen Arbeitens zu erlernen, sondern mit konstruktiver Kritik am Gelingen der Doktorarbeit beteiligt war.

Auch möchte ich meinem Betreuer Dr. rer. nat. H. Hentschke meinen Dank aussprechen. Mit seiner Fachkenntnis lenkte er maßgeblich den praktischen und theoretischen Teil meiner Arbeit und war stets ein hilfsbereiter Wegbegleiter, der auch bei Rückschlägen mit seiner Gelassenheit dafür sorgte, dass ein kühler Kopf bewahrt und gemeinsam nach Lösungen gesucht wurde.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei den anderen Mitarbeitern der Sektion „Experimentelle Anästhesiologie“, deren Ratschläge mein Wissen und meine Fähigkeiten in großem Maße bereicherten. Vor allem schufen sie mit ihrer Anwesenheit eine Arbeitsatmosphäre, die meine Motivation und die Freude an der Doktorarbeit außerordentlich förderte.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Daniel Simon Razik
Geburtsdatum	16.12.1983
Geburtsort	Hindenburg/Polen

Schulbildung

09/1990 - 07/1992	Grundschule (Lutherschule) in Albstadt-Tailfingen
09/1992 - 07/1994	Lammerberg-Grundschule in Albstadt-Tailfingen
09/1994 - 06/2000	Lammerberg-Realschule in Albstadt-Tailfingen Abschluss: Mittlere Reife
09/2000 - 06/2003	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Balingen Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

04/2004 – 11/2010	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität zu Tübingen
03/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2009 – 07/2010	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen
03.11.2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung