

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

Der Einfluss des Inhalationsanästhetikums Xenon  
auf die neuronale Aktivität  
im hippocampalen und thalamokortikalen  
Schnittpräparat

Corinna Mattusch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. H. Luksch

Prüfer der Dissertation: 1. Univ. - Prof. Dr. M. Schemann

2. apl. Prof. G. K. Rammes, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 18.04.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.07.2012 angenommen.

*Meinen Eltern gewidmet*

**Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

Originalarbeit:

**Xenon attenuates hippocampal long-term potentiation by diminishing synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor currents**

Corinna Mattusch, M.Sc.\*, Stephan Kratzer M.D.\*, Eberhard Kochs, M.D., Matthias Eder, Ph.D.,  
Rainer Haseneder, M.D., Gerhard Rammes, Ph.D.

Anesthesiology. 2012 Mar; 116(3): 673-82

# 1 Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Anästhesie .....	1
1.2	Xenon – ein Edelgas als Anästhetikum .....	2
1.2.1	Physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften .....	2
1.2.2	Klinischer Einsatz als Anästhetikum .....	2
1.2.3	Molekulare Wirkmechanismen von Xenon.....	3
1.3	Synaptische Übertragung .....	4
1.3.1	Glutamat-Rezeptoren .....	5
1.3.2	AMPA-Rezeptoren .....	9
1.3.3	GABA-Rezeptoren .....	10
1.4	Hippocampus .....	12
1.4.1	Struktur und Funktion des Hippocampus.....	12
1.4.2	Synaptische Plastizität .....	13
1.4.3	Hippocampale Langzeitpotenzierung .....	13
1.4.4	Spannungsabhängige Kalziumkanäle und deren Rolle bei der LTP .....	16
1.5	Der Thalamus, das „Tor zum Bewusstsein“ .....	16
1.5.1	Das thalamokortikale Netzwerk .....	18
1.5.2	Konstitution des Membranpotentials.....	21
1.5.3	Intrinsische Eigenschaften von TC-Neuronen.....	24
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Herstellung der <i>in vitro</i> Hirnschnittpräparate.....	27
2.1.1	Präparation der Hirnschnitte.....	27
2.2	Zellkultur .....	28
2.2.1	Verwendete Zelllinie .....	28
2.2.2	Nährmedium .....	29
2.2.3	Kultur .....	29
2.2.4	Poly-L-Lysin Beschichtung .....	30
2.3	Elektrophysiologische Methoden.....	30

2.3.1	Versuchsaufbau .....	30
2.3.2	Konzentrationsbestimmung des Anästhetikums Xenon .....	30
2.3.3	Bildgebendes Verfahren .....	31
2.3.4	Ganzzelleableitung .....	33
2.3.5	Messprotokolle .....	37
2.3.6	Feldpotentiale .....	43
2.3.7	Intrazelluläre Kalzium Messung .....	45
2.3.8	Auswertung und Statistik .....	47
2.4	Molekularbiologische Methoden .....	50
2.4.1	ELISA .....	50
2.4.2	Fluoreszenzfärbung .....	51
3	Ergebnisse .....	52
3.1	Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus .....	52
3.1.1	Xenon reduziert die Feldpotentiale im Hippocampus .....	52
3.1.2	Xenon hemmt die hippocampale Langzeitpotenzierung .....	53
3.1.3	Xenon reduziert NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme im Hippocampus .....	54
3.1.4	Xenon reduziert AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme im Hippocampus .....	55
3.1.5	Xenon reduziert den intrazellulären Kalziumeinstrom während der hochfrequenten Stimulation .....	56
3.1.6	Xenon hat keinen Einfluss auf spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle .....	57
3.1.7	Passive Membraneigenschaften .....	58
3.2	Beeinflusst Xenon die synaptische Transmission thalamokortikaler Schaltneurone (TC-Neurone)? .....	59
3.2.1	Charakterisierung von TC-Neuronen .....	59
3.2.2	Xenon reduziert die exzitatorische glutamaterge Transmission .....	60
3.2.3	Xenon hat keine Wirkung auf die inhibitorische GABAerge Transmission .....	62
3.3	Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen? .....	64
3.3.1	TASK-Rezeptor vermittelte Ströme .....	64
3.3.2	Durch native HCN-Rezeptoren vermittelte Ströme .....	65

3.3.3	Durch heterolog exprimierte mHCN2-Rezeptoren vermittelte Ströme.....	67
3.3.4	Wirkung von Xenon auf native cAMP-modulierte HCN-Kanal vermittelte Ströme 69	
3.3.5	Wirkung von Xenon auf cAMP-modulierte mHCN2-Rezeptor vermittelte Stromantworten in HEK-Zellen .....	71
3.3.6	Xenon senkt die basale intrazelluläre cAMP Menge.....	72
3.3.7	Wirkung von Xenon auf HCN-Rezeptor vermittelte Stromantworten in Anwesenheit des Adenylatzyklase-Inhibitors SQ5236 in TC-Neuronen.....	73
3.3.8	Wirkung von Xenon auf mHCN2-Rezeptor vermittelte Stromantworten in Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ5236 in HEK-Zellen .....	75
3.3.9	HCN Kanal vermittelter „voltage sag“ .....	76
3.4	Stehender Auswärtsstrom in TC-Neuronen .....	77
3.5	Beeinflusst Xenon die Erregbarkeit von TC-Neuronen? .....	79
3.5.1	Die Wirkung von Xenon auf die Frequenz der tonischen Generierung von Aktionspotentialen und das Ruhemembranpotential in TC-Neuronen.....	79
3.5.2	Niederschwelliges Ca <sup>2+</sup> -Aktionspotential in TC-Neuronen .....	80
3.5.3	Xenon zeigt keinen Einfluss auf spannungsabhängige T-Typ-Kalziumkanäle .	81
3.6	Beeinflusst Xenon die Erregbarkeit von Retikulariszellen (RTN-Neuronen)? .....	82
3.6.1	Charakterisierung von RTN-Neuronen .....	82
3.6.2	Niederschwelliges Ca <sup>2+</sup> -Aktionspotential in RTN-Neuronen.....	83
3.6.3	Die Wirkung von Xenon auf die Frequenz der tonischen Generierung von Aktionspotentialen und das Ruhemembranpotential in RTN-Neuronen .....	84
4	Diskussion.....	85
4.1	Klinische Relevanz der Xenon-Konzentration.....	85
4.2	Xenon blockiert die synaptische LTP im Hippocampus .....	86
4.2.1	Xenon senkt den Kalziumeinstrom während des HFS .....	86
4.2.2	Wirkung von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission .....	87
4.2.3	Wirkung von Xenon auf L-Typ-Kalziumkanäle.....	87
4.2.4	Wirkung von Xenon auf extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren .....	88
4.2.5	Klinische Relevanz der Ergebnisse .....	90
4.3	Der Einfluss von Xenon im thalamokortikalen Netzwerk.....	91

4.3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der TC- und RTN-Neurone .....	91
4.3.2	Wirkung von Xenon auf die synaptische Transmission im thalamokortikalem Netzwerk .....	91
4.3.3	Beeinflusst Xenon die neuronale Erregbarkeit von TC-Neuronen.....	94
4.3.4	Xenon erhöht die Erregbarkeit und das Feuerverhalten in RTN-Neurone.....	101
4.3.5	Klinische Relevanz der Ergebnisse .....	102
5	Zusammenfassung.....	104
6	Literaturverzeichnis .....	105
7	Anhang.....	1
	Abkürzungsverzeichnis .....	1
	Verwendete Substanzen.....	3
	Danksagung .....	7
	Verzeichnis eigener Publikationen .....	8

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.3.1: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes.....	7
Abb. 1.3.2: Struktur und Funktion des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors .....	11
Abb. 1.4.1: : Laminaer Aufbau des Hippocampus und trisynaptischer Schaltkreis .....	12
Abb. 1.4.2: NMDA-Rezeptor-abhängiger Mechanismus der LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus (vereinfacht).....	15
Abb. 1.5.1: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Schaltkreises .....	17
Abb. 1.5.2: Aktivitätsmuster im thalamokortikalen Netzwerk bei Wachheit und Schlaf .....	19
Abb. 1.5.3: Schematische Darstellung eines Zwei-Poren Domänen K <sup>+</sup> -Kanäle (K <sub>2</sub> P).....	21
Abb. 1.5.4: Struktur der HCN-Kanäle .....	23
Abb. 1.5.5: T-Typ-Kalziumkanal Aktivität kontrolliert das neuronale Feuerverhalten der TC-Neurone	25
Abb. 2.3.1: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops mit IR-gelenkter Photostimulation.....	31
Abb. 2.3.2: Schematische Darstellung der Laser-Photostimulation von CNB-caged-Glutamat .....	32
Abb. 2.3.3: Die „Whole-cell“ Konfiguration der Patch-Clamp-Technik .....	35
Abb. 2.3.4: Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung .....	35
Abb. 2.3.5: Schematische Darstellung der zwei unterschiedlichen Stimulationsarten.....	36
Abb. 2.3.6: Spannungsprotokoll zur Charakterisierung TC-Neuronen.....	39
Abb. 2.3.7: Spannungsprotokoll Itask.....	39
Abb. 2.3.8: Spannungsprotokoll I <sub>h</sub> .....	40
Abb. 2.3.9: Spannungsprotokoll I <sub>T</sub> , I <sub>L</sub> .....	41
Abb. 2.3.10: Protokoll der Strom-Spannungsbeziehung .....	43
Abb. 2.3.11: Experimentelle Vorgehensweise der LTP Induktion .....	45
Abb. 2.3.12: Strukturformel Fluo-4-AM.....	46
Abb. 2.3.13: Berechnung der Messgrößen aus dem abgeleiteten Stromzeitverlauf.....	48
Abb. 3.1.1: Xenon reduziert fEPSPs in der CA1-Region des Hippocampus. ....	52
Abb. 3.1.2: Xenon hemmt die Auslösung von LTP im Hippocampus. ....	53
Abb.3.1.3: Xenon reduziert NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten in der CA1-Region .....	55
Abb.3.1.4: Xenon vermindert die AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Transmission .....	56
Abb.3.1.5: Einfluss von Xenon auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration während der HFS-Stimulation .....	57
Abb. 3.1.6 Xenon zeigt hat keinen Einfluss auf L-Typ-Kalziumkanäle.....	58
Tabelle 3.1-1: Die elektrophysiologischen Eigenschaften der abgeleiteten Neurone werden durch Xenon nicht verändert. ....	58
Abb. 3.2.1: Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften von TC-Neuronen .....	59
Abb. 3.2.2 Xenon reduziert NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten bei elektrischer und photolytischer Stimulation gleichermaßen.....	61
Abb. 3.2.3 Xenon reduziert AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten bei elektrischer und photolytischer Stimulation gleichermaßen.....	62
Abb. 3.2.4 Xenon beeinflusst die Amplitude von GABA <sub>A</sub> -Rezeptor vermittelter IPSCs nicht. ....	63
Tab. 3.2-1: Das Inhalationsanästhetikum Xenon verändert die Deaktivierungszeitkonstanten und den Ladungstransfer nicht. ....	63



Abb. 3.3.1 Das Inhalationsanästhetikum Xenon zeigt keinen Einfluss auf TASK-Rezeptor vermittelte Ströme. ....	64
Abb. 3.3.2: In TC-Neuronen führt Xenon zu einer Reduktion der Amplitude des $I_h$ und zu einer Verschiebung der Spannungsaktivierungskurve in hyperpolarisierende Bereiche des Membranpotentials, bei unveränderter Aktivierungskinetik.....	67
Abb.3.3.3: In heterolog exprimierten mHCN2-Kanälen führt Xenon zu einer Reduktion der Amplitude des $I_h$ und zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in hyperpolarisierende Bereiche des Membranpotentials, bei unveränderter Aktivierungskinetik....	68
Abb.3.3.4: In TC-Neuronen bewirkt Xenon keine Veränderung der $I_h$ -Amplitude, der Spannungsaktivierungskurve sowie der Aktivierungszeitkonstanten auf native cAMP-modulierte HCN-Rezeptor vermittelte Ströme.....	70
Abb. 3.3.5: An heterolog exprimierten mHCN2-Kanälen bewirkte Xenon keine Veränderung der Stromamplitude des $I_h$ , der Spannungsabhängigkeit, sowie der Kinetik in cAMP-modulierten mHCN2-Rezeptor vermittelten Stromantworten in HEK-Zellen. ....	72
Abb. 3.3.6 Xenon senkt die intrazelluläre cAMP-Menge in mHCN2-HEK Zellen.....	73
Abb. 3.3.7: In Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ55236 zeigte Xenon keine Wirkung auf die Amplitude der $I_h$ -Ströme, die Spannungsabhängigkeit und die Aktivierungszeitkonstanten in TC-Neuronen. ....	74
Abb. 3.3.8: In Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ55236 zeigte Xenon keine Wirkung auf die Amplitude der $I_h$ -Ströme, die Spannungsabhängigkeit und der Aktivierungszeitkonstanten in mHCN2 HEK Zellen. ....	76
Abb. 3.3.9: Xenon bewirkt eine Verminderung der Potentialdifferenz unter Kontrollbedingungen. Unter erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration, sowie unter Präinkubation der Schnittpräparate mit dem AC Inhibitor SQ55236 wird die Wirkung von Xenon auf die Amplitude der Potentialdifferenz in TC-Neuronen aufgehoben.....	77
Abb. 3.4.1: Die Xenon induzierte Reduktion der basalen synaptische Transmission ist unabhängig vom stehenden Auswärtsstrom. ....	78
Abb.3.5.1: Xenon beeinträchtigte nicht die mittlere Frequenz von Aktionspotentialen in TC-Neuronen abgeleitet in „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Messungen bei einem Haltepotential von -65 mV und das Ruhemembranpotential abgeleitet in „Brücken“-Modus.....	79
Abb. 3.5.2: Xenon verzögert die Auslösung des LTS unter Kontrollbedingungen. Unter erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration sowie unter AC-Inhibition durch SQ55236 wird die Xenon-bedingte Verzögerung des LTS in TC-Neuronen aufgehoben.....	80
Abb. 3.5.3: Das Inhalationsanästhetikum Xenon zeigte keinen Einfluss auf die Amplitude der T-Typ Kalziumkanäle. ....	81
Abb. 3.6.1: Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften von RTN-Neuronen.....	82
Abb. 3.6.2: Xenon führt zu einer geringeren Verzögerung des LTS in RTN-Neuronen.....	83
Abb.3.6.3: Xenon erhöht die mittlere Frequenz von Aktionspotentialen in RTN-Neuronen abgeleitet in „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Messungen bei einem Haltepotential von -65 mV ohne das Ruhemembranpotential abgeleitet im „Brücken“-Modus zu beeinflussen. ....	84

# 1 Einleitung

## 1.1 Anästhesie

Die Narkose (Allgemeinanästhesie) beschreibt einen dem Tiefschlaf ähnlichen Zustand, in dem medikamentös kontrolliert sowohl die Schmerzwahrnehmung als auch das Bewusstsein ausgeschaltet wird. Im Gegensatz zum Schlafenden ist der Anästhesierte nicht weckbar. Die Allgemeinanästhesie beruht auf vier Komponenten: Hypnose, Amnesie, Immobilität und Analgesie (Eger und Sonner 2006). Dieser Zustand wird durch eine Kombination verschiedener Medikamente erreicht. Dazu gehören neben den eigentlichen Anästhetika Analgetika, wie z.B. Opioide, die die Schmerzempfindung des Patienten vermindern und Muskelrelaxanzien, die eine kontrollierte Beatmung erleichtern. Anästhetika lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: intravenös-verabreichte und inhalative Anästhetika. Letztere können gasförmig (Xenon oder Lachgas) oder dampfförmig (flüchtig = volatil; Sevofluran, Isofluran u. a.) sein.

Trotz einer Vielzahl von durchgeführten Anästhesien sind die molekularen und zellulären Mechanismen der Allgemeinanästhesie noch nicht erschöpfend geklärt (Rudolph und Antkowiak 2004). Nach neueren Erkenntnissen gelten Proteine, vor allem membrangebundene Rezeptoren und Ionenkanäle, als molekulare Angriffspunkte von Anästhetika (Franks und Lieb 1994). Unterschiedlichste Stoffklassen modulieren selektiv Ionenkanäle und haben teilweise verschiedene Angriffspunkte in unterschiedlichen ZNS-Strukturen (Grasshoff et al. 2005). Auf molekularer Ebene modulieren sie selektiv Ionenkanäle, die an den Mechanismen der exzitatorischen glutamatergen und der inhibitorischen GABAergen synaptischen Transmission beteiligt sind (Lukatch und MacIver 1997). Eine daraus resultierende Unterdrückung der Erregbarkeit zentraler Neurone gilt als entscheidender Mechanismus, der insbesondere der hypnotischen Komponente einer Allgemeinanästhesie zugrunde liegen könnte.

Für die Vermittlung der Komponenten der Anästhesie werden verschiedene neuronale Zielstrukturen diskutiert (Kortex und Thalamus, Rückenmark, Hippocampus). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der *in vitro*-Wirkung des gasförmigen Inhalationsanästhetikums Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus der Maus, welche an der amnestischen Wirkung von Xenon beteiligt sein könnte. Darüber hinaus soll die neuronale Wirkung von Xenon im thalamokortikalen Netzwerk untersucht werden, welches mutmaßlich an der Vermittlung der hypnotischen Komponente beteiligt ist.

## **1.2 Xenon – ein Edelgas als Anästhetikum**

Das Edelgas Xenon wurde 1898 von Sir William Ramsay und Morris Travers als Restsubstanz bei der Zerlegung von Luft entdeckt und bildet zusammen mit Helium, Neon, Argon, Krypton und Radon die chemische Gruppe der Edelgase. Es ist das einzige Edelgas, das unter normobaren Bedingungen anästhetische Eigenschaften aufweist. 1938 wurden erstmals die anästhetischen Eigenschaften Xenons beschrieben (Behnke 1939), der erste klinische Einsatz als Narkosegas erfolgte 1951 (Cullen und Gross 1951). Nicht zuletzt wegen der hohen Produktionskosten und geringen Ressourcen konnte sich Xenon trotz guter Wirksamkeit nicht als Anästhetikum durchsetzen. Die Entwicklung moderner geschlossener Narkosesysteme sowie Bemühungen Recyclingverfahren zu entwickeln, scheinen den Einsatz von Xenon unter wirtschaftlichen Aspekten zu ermöglichen. 2005 wurde Xenon in Deutschland als Anästhetikum zugelassen. Randomisierte Multicenterstudien mit einem großen Patientenkollektiv bestätigten einen sicheren Anästhesieverlauf mit deutlich schnellerer Erholung der Patienten (Rossaint et al. 2003).

### **1.2.1 Physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften**

Xenon ist ein farbloses, nicht entflammbares, nicht explosives, geruchs- und geschmackloses Gas, dessen Anteil in der Atmosphäre 0,0000087 % beträgt. Es wird durch fraktionierte Destillation der Luft gewonnen (Sanders et al. 2003). Die chemische Dichte ist viermal höher als die von Luft und 3,4 mal höher als die von Lachgas (Reyle-Hahn 2000). Xenon ist sehr reaktionsträge, weshalb es nur eine geringe Neigung aufweist mit anderen Molekülen zu reagieren oder kovalente Bindungen einzugehen. Der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient, der das Verhältnis der Konzentration des Anästhetikums im Blut zur Konzentration in der Alveolarluft beschreibt, ist mit 0,14 für Xenon extrem gering, was die vorteilhafte Pharmakokinetik erklärt (Boomsma et al. 1990; Luttrupp et al. 1993; Goto et al. 1997).

### **1.2.2 Klinischer Einsatz als Anästhetikum**

Als Anästhetikum erfüllt Xenon viele Kriterien eines idealen Narkosegases. Neben einer hohen anästhetischen Potenz konnten in einigen Studien analgetische Eigenschaften beschrieben werden (Lachmann et al. 1990; Marx et al. 1997; Nakata et al. 2001). Die analgetische Potenz wäre möglicherweise auf neuronaler Ebene durch die antagonistische Wirkung an den NMDA-Rezeptor zu erklären. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Ausschüttung von Stresshormonen wie Adrenalin und Cortisol (Boomsma et al. 1990). Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen hämodynamischen Beeinflussung des Patienten, die sich durch konstante Herzfrequenz und nahezu keinen Blutdruckabfall zeigt (Cullen und Gross 1951; Boomsma et al. 1990; Lachmann et al. 1990; Rossaint et al. 2003). In

verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Studien wurden neuroprotektive Eigenschaften beschrieben (de Sousa et al. 2000; Dingley et al. 2006).

Den zahlreichen Vorteilen Xenons bei der Verwendung als Narkosegas stehen nur wenige Nachteile gegenüber: Xenon führt aufgrund seiner hohen Dichte und Viskosität tierexperimentell zu einer Erhöhung des Atemwegswiderstandes (Zhang et al. 1995), wobei die klinische Relevanz dieses Phänomens eher gering zu sein scheint (Lachmann et al. 1990; Baumert et al. 2007). Das Verhalten des zerebralen Blutflusses unter Xenonanästhesie wird kontrovers diskutiert: einige Studien zeigen eine Erhöhung (Hartmann et al. 1987; Schmidt et al. 2001), andere eine Erniedrigung (Yao et al. 1992; Fink et al. 2000). Derzeit ist der entscheidende limitierende Faktor für den Einsatz der hohe Preis, bedingt durch die teure Herstellung und das geringe Vorkommen.

Ein wesentlicher pharmakologischer Kennwert von Inhalationsanästhetika ist die minimale alveoläre Konzentration (MAC). Die MAC ist definiert als die alveolare Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, bei der 50 % der Patienten auf einen definierten Schmerzreiz keine motorische Abwehrreaktion zeigen. Die MAC variiert je nach Spezies und Art des Anästhetikums. Die MAC von Xenon wurde mit Werten zwischen 63 % und 71 % angegeben (Cullen et al. 1969; Nakata et al. 2001). Als MAC-Äquivalent von Xenon in wässriger Lösung ergibt sich unter Verwendung eines Löslichkeitskoeffizienten von 0,0887 bei 37°C eine Konzentration von 2,2 mM oder 2,5 mM.

### **1.2.3 Molekulare Wirkmechanismen von Xenon**

Die Wirkmechanismen von Anästhetika sind trotz intensiver Forschung bislang noch nicht vollständig verstanden. Angriffspunkte für Anästhetika können verschiedene Transmittersysteme sowie spannungsunabhängige- und spannungsabhängige Ionenkanäle und Ionentransporter sein. Ein möglicher Wirkmechanismus von Anästhetika ist die Hemmung des erregenden glutamatergen Neurotransmittersystems. Für Xenon wurde zunächst ein Antagonismus des glutamatergen NMDA-Rezeptors als Hauptmechanismus beschrieben. Ein NMDA-Rezeptorantagonismus konnte in Autapsen bildenden Zellkulturen (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000), in heterologen Expressionssystemen (Yamakura und Harris 2000) sowie in vitalen Schnittpräparaten (Haseneder 2008, Haseneder 2009) gezeigt werden. In neueren Studien wurde zusätzlich eine inhibierende Wirkung von Xenon auf Glutamat-Rezeptoren des non-NMDA-Typ (Kainat-, AMPA-Rezeptoren) gezeigt werden (Plested et al. 2004; Dinse et al. 2005; Haseneder et al. 2008; Haseneder et al. 2009).

Die meisten intravenös verabreichten und inhalativen Anästhetika potenzieren das hemmende GABA-( $\gamma$ -Aminobuttersäure)-erge Transmittersystem (Campagna et al. 2003; Rudolph und Antkowiak 2004). Für Xenon konnte kein oder nur ein sehr geringer Einfluss auf

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und damit keine Verstärkung der inhibitorischen synaptischen Transmission gezeigt werden (Franks und Lieb 1998; de Sousa et al. 2000; Haseneder et al. 2008; Haseneder et al. 2009). Einzig an heterolog transfizierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bei Applikation niedriger GABA-Konzentrationen konnte eine Potenzierung der Stromantworten durch Xenon beobachtet werden (Hapfelmeier et al. 2000; Yamakura und Harris 2000).

Untersuchungen an weiteren Neurotransmittersystemen sind kaum vorhanden. In einigen Studien wurde für Xenon eine Potenzierung an heterolog exprimierten Glycin-Rezeptoren (Daniels und Roberts 1998; Yamakura und Harris 2000) sowie eine Inhibition an heterolog exprimierten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (Suzuki et al. 2002) und nACh-Rezeptoren (Yamakura und Harris 2000; Suzuki et al. 2003) beschrieben.

Ein weiterer möglicher Angriffspunkt von Anästhetika sind auswärtsrektifizierende zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K<sub>2</sub>P-Kanäle; Twin Pore-K<sup>+</sup>(TWIK)-Kanäle), die das Membranpotential modulieren. Für Xenon wurde eine Aktivierung des heterolog exprimierten K<sub>2</sub>P-Subtyps TREK beschrieben (Gruss et al. 2004). Die Aktivierung der TREK-Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation und trägt damit zur Verminderung der neuronalen Erregbarkeit bei (Coburn et al. 2008).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Xenon die Freisetzung des second messenger Ca<sup>2+</sup> in neuronalem Gewebe moduliert. An humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene wurde ein inhibitorischer Effekt auf die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transmitterfreisetzung beschrieben (Petzelt et al. 1999). Die Adenosintriphosphat (ATP)-gesteuerte Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> wird gehemmt, was zu einer Beeinträchtigung der CaMK (Calmodulinabhängige Proteinkinase II) und somit zur Beeinflussung der Signaltransduktion und Neurosekretion beiträgt. Im Hirngewebe von Ratten wurde eine Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in synaptische Plasmavesikel nachgewiesen (Franks et al. 1995). Darüber hinaus wurde in einigen Studien eine hemmende Wirkung auf die Ca<sup>2+</sup>-ATPase (P-Typ-ATPase) beschrieben (Franks et al. 1995; Horn et al. 1995; Singh et al. 1995), die daraus resultierende Erhöhung der second messenger Konzentration könnte zu einer veränderten neuronalen Signalverarbeitung führen.

### **1.3 Synaptische Übertragung**

Die Übertragung und Weiterleitung von Informationen innerhalb des ZNS erfolgt überwiegend durch Neurotransmitter. Diese Kommunikation zwischen Neuronen findet an spezifischen Kontaktstellen, den elektrischen und den weitaus häufiger auftretenden chemischen Synapsen statt. Elektrische Synapsen sind über Connexin-Hexamere, sogenannte „gap junctions“ mit benachbarten Neuronen verbunden, was zu einer direkten elektrischen Kopplung beider Zellen führt (Kumar und Gilula 1996; Roerig und Feller 2000).

Die chemische Signalübertragung erfolgt indirekt und unidirektional durch Ausschüttung von Transmittern. Die Transmitter werden in den präsynaptischen Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert. Ein ankommendes Aktionspotential depolarisiert die Nervenendigung,  $\text{Ca}^{2+}$  strömt über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Terminale und löst damit einen komplexen Mechanismus, die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt, aus (Augustine et al. 1987; Schneggenburger und Neher 2000). Die Aktivierung der postsynaptischen Rezeptoren durch eine Transmitter-Rezeptor-Interaktion führt zu einer Potentialveränderung der postsynaptischen Membran. Eine Depolarisation führt zu einer Erregung, eine Hyperpolarisation zu einer Hemmung der postsynaptischen Nervenzelle. Die chemische Information der Transmitter wird in ein elektrisches Signal zurückverwandelt. Die wichtigsten Rezeptoren im ZNS sind die Glutamat-Rezeptoren, welche die exzitatorische glutamaterge Transmission (Monaghan et al. 1989) und die GABA-Rezeptoren, die die inhibitorische GABAerge Transmission vermitteln (Fahn und Cote 1968).

### 1.3.1 Glutamat-Rezeptoren

Die Aminosäure L-Glutamat ist eine wichtige Komponente verschiedener klassischer Stoffwechselwege und zudem auch der am häufigsten vorkommende exzitatorische Neurotransmitter (Mayer und Westbrook 1987) im Gehirn. Die Biosynthese findet hauptsächlich in den neuronalen Terminalen statt. Das Enzym Glutamatdehydrogenase katalysiert Glutamat direkt aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Ammoniumionen. In Vesikeln der Terminalen wird Glutamat gespeichert und steht zur Freisetzung in den synaptischen Spalt bereit. Präsynaptisch freigesetztes Glutamat wird einerseits durch spezifische Glutamattransporter (EAAT; *excitatory amino acid transporter*; Hertz 2006) in die Terminale aufgenommen, andererseits in Gliazellen transportiert. Dort wird es in Glutamin umgewandelt und kann so der Terminale zur Resynthese von L-Glutamat zugeführt werden. Glutamat-Rezeptoren lassen sich gemäß ihres Aufbaus und ihrer Funktionalität in zwei verschiedene Gruppen einteilen, die ionotropen sowie die metabotropen Glutamat-Rezeptoren. Die ionotropen Glutamatrezeptoren werden bezugnehmend auf ihre spezifischen Agonisten in NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat) und Non-NMDA-Rezeptoren gegliedert, wobei letztere in AMPA-( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalolpropionat) und Kainat-Rezeptoren unterteilt werden (Mori und Mishina 1995). Die liganden-aktivierten Rezeptor-Kanal-Komplexe ändern durch Bindung des Glutamats ihre Konformation und verursachen einen Natriumeinstrom, der eine schnelle Depolarisation des postsynaptischen Neurons zur Folge hat. Metabotrope Glutamat-Rezeptoren leiten Signale über „second messenger“ Kaskaden wie z.B. Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine in das Zellinnere. Im Vergleich zur Signaltransduktion ionotroper Rezeptoren bedingt dieser indirekte Mechanismus Ionenströme mit längeren Latenzen.

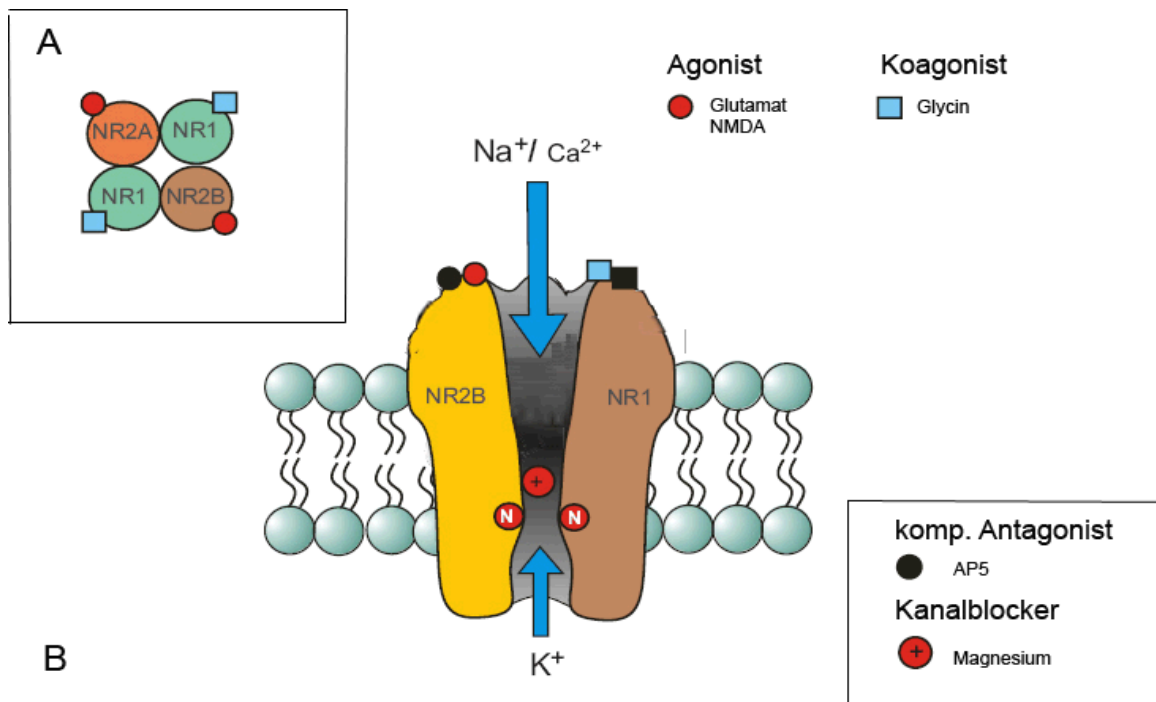
### 1.3.1.1 NMDA-Rezeptoren

Glutamaterge Rezeptoren auf der Oberfläche eines Neurons lassen sich aufgrund ihrer Lokalisation in zwei Populationen einteilen: Synaptisch lokalisierte Rezeptoren, die innerhalb der sog. postsynaptischen Dichte vorhanden sind, und extrasynaptisch lokalisierte Rezeptoren, die außerhalb der synaptischen Bereiche auftreten und unter normalen Bedingungen nicht durch synaptisch freigesetzte Transmitter aktiviert werden.

#### Synaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren

Der NMDA-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität, der neuronalen Entwicklung und bei pathophysiologischen Prozessen (Monaghan et al. 1989; Bliss und Collingridge 1993; Scatton 1993). Funktionell besteht der NMDA-Rezeptor aus vier Untereinheiten (Cull-Candy 2001). Man unterscheidet die essentielle NR1-Untereinheit, von der insgesamt acht unterschiedliche Splice-Varianten kloniert wurden (Zukin und Bennett 1995; Dingledine et al. 1999), die NR2-Untereinheit, welche sich aus vier Subtypen (NR2A-NR2D) zusammensetzt, sowie die NR3 (A und B) Untereinheit. Die NR2-Untereinheiten bilden nur zusammen mit NR1 funktionelle NMDA-Rezeptoren. Die Zusammensetzung dieser Untereinheiten bestimmt die biophysikalischen Eigenschaften der Rezeptoren und in unterschiedlichem Umfang die Pharmakologie (Seeburg 1993; Mori und Mishina 1995). Für NMDA-Rezeptoren, die vorwiegend die NR2A-Untereinheit enthalten, wird eine Lokalisation innerhalb der postsynaptischen Dichte zugesprochen. NMDA-Rezeptoren weisen 4 hydrophobe Domänen (M1-M4) auf, von denen lediglich drei Segmente die Membran vollständig durchspannen. An der Bildung der Ionenpore sind jeweils die M2-Domänen der Untereinheiten beteiligt. Besondere Merkmale im Vergleich zu nonNMDA-Rezeptoren sind neben der hohen Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen eine hohe Durchlässigkeit für Kalziumionen. Dadurch werden Signale nicht nur über Membrandepolarisation weitergeleitet, sondern mit Hilfe des Kalziumstroms verschiedene Second-Messenger-Systeme aktiviert. Bei Überaktivierung können diese allerdings zytotoxisch wirken (Lynch und Guttman 2002). Spannungsabhängig wird der Ionenkanal von extrazellulären Magnesiumionen blockiert (Mayer und Westbrook 1987; Sobolevskii und Khodorov 2002). Bei einer Vordepolarisation der Membran durch z.B. AMPA Rezeptoren auf  $-40$  mV oder positiver können die  $Mg^{2+}$ -Ionen aufgrund der verringerten intrazellulären negativen Spannung die Kanalpore verlassen, und Kationen können den Kanal passieren (Mayer et al. 1984; Monyer et al. 1994). An vielen erregenden Synapsen des ZNS wurde eine Kollokalisierung und damit einhergehende Koaktivierung von NMDA-Rezeptoren und AMPA-Rezeptoren beobachtet (Bekkers und Stevens 1989; Jones und Baughman 1991; Clements et al. 1992; Hollmann et al. 1994). Der NMDA-Rezeptor wird daher als molekularer Koinzedenzdetektor bezeichnet, da der Ionenkanal erst bei gleichzeitiger präsynaptischer Aktivierung und postsynaptischer

Depolarisation aktiviert wird. Spezielle Asparaginreste in der M2-Domäne spielen bei der Regulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität und der spannungsabhängigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockade eine Rolle (Hollmann et al. 1994; Burnashev 1998). Eine weitere Besonderheit des Rezeptors ist, dass neben L-Glutamat der Koagonist Glycin benötigt wird, um den Ionenkanal zu aktivieren (Mayer et al. 1984; MacDermott et al. 1986; Thomson et al. 1989). Ein weiteres Merkmal ist der langsame, aber andauernde Zeitverlauf der exzitatorischen postsynaptischen Ströme, die von NMDA-Rezeptoren vermittelt werden (Lester et al. 1990). Neben L-Glutamat und Glycin wird der Rezeptor von vielen endogenen und exogenen Liganden beeinflusst, beispielsweise Zinkionen, Protonen, Polyamine, Peptide oder Ethanol (Dingledine et al. 1999; Bence et al. 2000; Stark et al. 2000; Lynch und Guttman 2001). Hierfür wurden sechs verschiedene Ligandenbindungsstellen identifiziert, die potentielle Angriffspunkte für Pharmaka bilden. Der in dieser Arbeit verwendete spezifische Antagonist AP5 bindet kompetitiv an die Agonistenbindestelle des Glutamats.



**Abb. 1.3.1: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes**

**A:** Der Rezeptor besteht aus vier oder fünf verschiedenen Untereinheiten. Es existieren 3 Klassen von Untereinheiten: NR1, NR2 und NR3, wobei es für die letzten beiden verschiedene Subtypen gibt. Die essentielle NR1-Untereinheit besitzt die Bindungsstelle für den Koaktivator Glycin, wohingegen die Bindungsstelle des Agonisten Glutamat an der NR2 Untereinheiten lokalisiert ist. **B:** Die Transmembranuntereinheiten bilden eine zentrale Ionenpore. Der Ionenkanal ist spannungsabhängig durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen blockiert, welche sich durch Depolarisation der Membran lösen. Der Rezeptor wird permeabel für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Durch die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können intrazelluläre Prozesse ausgelöst werden, die für die neuronale Plastizität sowie die NMDA-Rezeptor vermittelte Neurotoxizität verantwortlich sind (Abb. verändert nach Parsons et al. 2007).



### Extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren

Außerhalb der synaptischen Dichte sind NMDA-Rezeptoren vorwiegend durch das Vorhandensein der NR2B-Untereinheit charakterisiert (Tovar und Westbrook 1999; Hardingham et al. 2002; Thomas et al. 2006; Harris und Pettit 2007). Die Verteilung der mRNA von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im ZNS weist deutliche regionale Unterschiede auf. Zudem ist die Expression der verschiedenen Untereinheiten entwicklungsabhängig (Monyer et al. 1992; Watanabe et al. 1992; Monyer et al. 1994). Im embryonalen Stadium werden im Hippocampus hauptsächlich NMDA-Rezeptoren der Zusammensetzung NR1/NR2B exprimiert. Die NR1-Untereinheit wird ab der dritten Woche bis ins adulte Stadium exprimiert, wohingegen die Transkription der mRNA und die Expression von NR2A Untereinheiten bis zum adulten Stadium zunimmt (Flint et al. 1997; Hoffmann et al. 2000). NR2A Untereinheiten integrieren sich in die Synapsen und ersetzen NR2B Untereinheiten im vollentwickelten Neuron (Gambrill und Barria 2011). Physiologisch werden im Gegensatz zu synaptischen NMDA-Rezeptoren, extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren nicht durch synaptisch freigesetztes Glutamat aktiviert, sondern durch im nanomolaren Bereich vorhandenes Glutamat in der Extrazellulärflüssigkeit. In geringer Dichte werden NR2B-NMDA-Rezeptoren an der gesamten Oberfläche der Neurone exprimiert und stellen maximal 50% der NMDA-Rezeptor Population dar. Sie besitzen eine höhere Permeabilität für Kalzium-Ionen (Dingledine et al. 1999) und zeigen eine geringere Desensitivierung (Krupp et al. 1996). Die Deaktivierungszeitkonstante für NR1/NR2B Heteromere ist deutlich länger im Vergleich zu NR1/NR2A Heteromeren (Monyer et al. 1994). Folglich führt die Aktivierung der NR2B enthaltenden Rezeptoren zu einem größeren Kalziumeinstrom, der intrazelluläre Kaskaden aktivieren, und über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bis zum Zelltod führen kann. Auf der anderen Seite ist der Kalziumeinstrom durch synaptische wie extrasynaptische Rezeptoren ein wichtiger Auslöser für die synaptische Plastizität und fördert das Zell-Überleben, indem es als „second messenger“ funktionell die Genexpression reguliert (Malenka et al. 1989; Malinow et al. 1989).

Glutamat wird nach synaptischer Freisetzung schnell durch in den Gliazellen vorkommende Glutamattransporter (EAAT) aus dem synaptischen Spalt entfernt. Somit führt unter physiologischen Bedingungen die synaptische Glutamatfreisetzung nicht zu einer Erhöhung der Glutamatkonzentration in der Umgebung. Wird jedoch die Transportkapazität der Glutamattransporter zum Beispiel im Rahmen einer Hochfrequenzstimulation überstiegen, kommt es zum Anstieg der Umgebungs-Glutamatkonzentration und somit zur Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren durch sog. Spill-over (Kullmann und Asztely 1998; Diamond und Jahr 2000; Harris und Pettit 2008). Pharmakologisch kann durch die Inhibition des Glutamat Transporters EAAT1 mit DL- threo- $\beta$ -benzyloxyaspartat (DL-TBOA) eine

langanhaltende Erhöhung der Glutamatkonzentration erreicht werden (Lozovaya et al. 2004; Rusakov et al. 2004; Scimemi et al. 2004).

### 1.3.2 AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren sind hauptsächlich postsynaptisch zu finden, wo sie die initiale Depolarisation des Neurons vermitteln. Ihre Hauptfunktion besteht in der Vermittlung der schnellen Komponente der exzitatorischen synaptischen Übertragung. AMPA-Rezeptoren weisen eine pentamere Struktur auf, wobei vier Untereinheiten (GluR1-GluR4) identifiziert wurden, die ca. 900 AS lang sind und untereinander zu 68%-74% sequenzidentisch sind (Hollmann et al. 1994). Alle vier Untereinheiten bilden funktionelle homomere oder heteromere Rezeptor-Kanal-Komplexe, wobei *in vivo* heteromere GluR1/2 bzw. GluR2/3 gehäuft vorkommen (Wenthold et al. 1996). Die Zusammensetzung der Untereinheiten hat entscheidenden Einfluss auf die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften. Alle Untereinheiten sind für Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen permeabel, GluR1, GluR3 und GluR4 zusätzlich auch für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Hollmann et al. 1991). Eine dauerhafte Präsenz des Agonisten Glutamat führt zu einer raschen Schließung des Ionenkanals; ein Phänomen, daß als Desensibilisierung bezeichnet wird und an einigen Synapsen wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Beendigung postsynaptischer Antworten spielt (Munoz et al. 1999). Die Untereinheiten des Rezeptors existieren in zwei Varianten, die als Flip- oder Flop-Form (Sommer et al. 1990) bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich nicht nur in der Morphologie durch An- beziehungsweise Abwesenheit eines gespleißten Exons, sondern auch bezüglich ihrer Funktionalität. Die Flip-Form zeigt ein geringeres Maß an Rezeptordesensitivierung (Mosbacher et al. 1994) als die Flop-Form. Diese Modulationsmöglichkeit dient womöglich zur Protektion vor einer durch Glutamat vermittelten Exzitotoxizität (Rothman und Olney 1995).

Neben L-Glutamat und AMPA werden AMPA-Rezeptoren zusätzlich durch die Substanzen Quisqualat, Domoat und Kainat aktiviert (Hollmann et al. 1994). Als kompetitive Antagonisten wirken verschiedene Chinoxalinderivate wie CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion), DNQX (6,7-Dinitrochinoxalin-2,3-dion) und NBQX (3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)chinoxalin-2,3-dion) (Honore et al. 1988). Diese Substanzen sind keine selektiven AMPA-Rezeptorantagonisten, denn sie hemmen ebenfalls niederaffine Kainatrezeptoren. Ein selektiver AMPA-Antagonist ist GYKI 52466 (4-(8-Methyl-9H-1,3-dioxolo[4,5-h][2,3]benzodiazepin-5-yl)-benzenamin Hydrochlorid), welcher über einen nicht-kompetitiven allosterischen Mechanismus wirkt (Rammes et al. 1994).

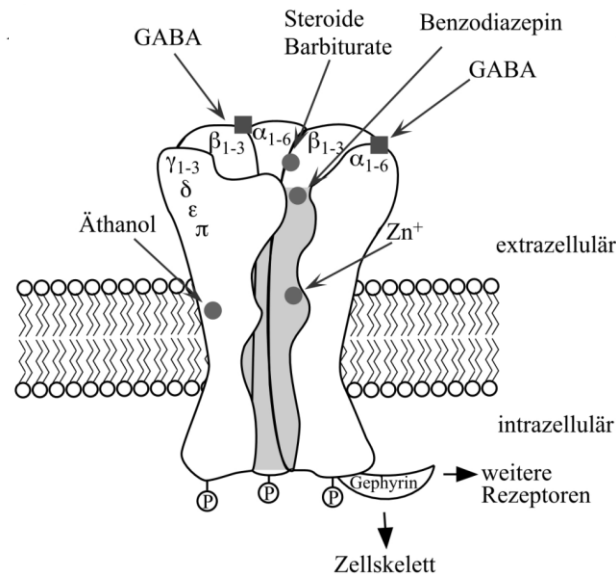
### 1.3.3 GABA-Rezeptoren

Die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Man schätzt, dass ca. 30 % aller Synapsen im ZNS GABAerg sind (Bloom und Iversen 1971). GABAerge Projektionen gehen hauptsächlich von hemmenden Interneuronen aus. Die GABA-Biosynthese erfolgt aus Glutamat über eine Abspaltung von  $\text{CO}_2$  durch das Enzym Glutamat-Decarboxylase, welche ausschließlich in GABAergen Neuronen vorkommt. Präsynaptisch freigesetztes GABA kann einerseits durch die spezifischen GABA Transporter GAT-2, GAT-3 und GAT-4 (Gadea und Lopez-Colome 2001) in Gliazellen transportiert werden oder es wird mithilfe des selektiven GABA Transporters GAT-1 in die Nervenendigungen aufgenommen (Wu et al. 2007). Gliales GABA wird durch die Transaminase zu Succinatsemialdehyd umgesetzt, welches letztendlich im Tricarbonsäurezyklus zu Glutamin umgewandelt wird.

GABAerge Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der Neurogenese und Differenzierung von Zellen und sind eine wichtige Voraussetzung für die Kontrolle von Netzwerkoszillationen im Gehirn (Mody und Pearce 2004). GABA-Rezeptoren lassen sich in die Gruppe der ionotropen ( $\text{GABA}_A$  und  $\text{GABA}_C$ ) und der metabotropen Rezeptoren ( $\text{GABA}_B$ ) klassifizieren.

#### 1.3.3.1 $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren

Der  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor gehört zu den liganden-aktivierten Ionenkanälen und setzt sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten mit je 4 Transmembrandomänen zusammen, die eine zentrale Pore bilden (Pirker et al. 2000). Im Ruhezustand ist diese Pore geschlossen und wird nach extrazellulärer Anlagerung zweier GABA Moleküle durch eine Konformationsänderung geöffnet (Bormann et al. 1985). Der Ionenkanal ist permeabel für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Damit bewirkt eine Öffnung des Kanals eine Hyperpolarisation des Neurons. Mithilfe von Genomanalysen ist es gelungen, insgesamt 19 verschiedene Untereinheiten zu identifizieren (Barnard et al. 1998). Diese beinhalten 16 Untereinheiten ( $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ), die den  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren zugeteilt und drei Rho ( $\rho 1-3$ ) Untereinheiten, die dem sogenannten  $\text{GABA}_C$ -Rezeptor zugeordnet werden. Die Untereinheitenzusammensetzungen variieren in verschiedenen Hirnregionen, wobei im Menschen die häufigste Zusammensetzung  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$  ist (Sieghart und Sperk 2002; Farrant und Kaila 2007). Die Funktionsweise von  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren kann durch intrazelluläre Phosphorylierung und durch allosterische Liganden wie  $\text{Zn}^{2+}$ , oder Barbituraten modifiziert werden (Mohler et al. 1996). Die Bindung von Benzodiazepinen zwischen der  $\alpha$ - und der  $\gamma$ - Untereinheit führt nicht direkt zu einer Aktivierung, sondern erhöht die Affinität für GABA-Moleküle (Walters et al. 2000). Benzodiazepine wirken klinisch anxiolytisch, sedierend, muskelrelaxierend und antikonvulsiv. Der in dieser Arbeit verwendete Antagonist Bicucullin Methiodid bindet kompetitiv an die GABA-Bindestelle des Rezeptors.



**Abb. 1.3.2: Struktur und Funktion des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors**

**A:** Der Transmembranrezeptor bildet ein Pentamer aus verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ 1-3 bis  $\pi$ ), die eine wassergefüllte Pore (grau schattiert) bilden. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden durch das Ankerprotein Gephyrin miteinander und mit dem Zellskelett verbunden. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit bilden zusammen die GABA-Bindestelle (graue Kästchen), an der auch Bicucullin kompetitiv bindet. Bei Bindung von 2 Molekülen GABA öffnet sich der Ionenkanal und wird permeabel für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Somit führt die Öffnung des Kanals unter physiologischen Bedingungen durch einen  $\text{Cl}^-$  Einstrom zur Hyperpolarisation. Weitere Bindestellen für Modulatoren sind in grauen Kreisen dargestellt.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten können darüber hinaus phosphoryliert werden. Jede Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors hat 4 transmembrane Helices (graue Zylinder) und extrazellulär gelegene amino- und carboxyterminale Endigungen.

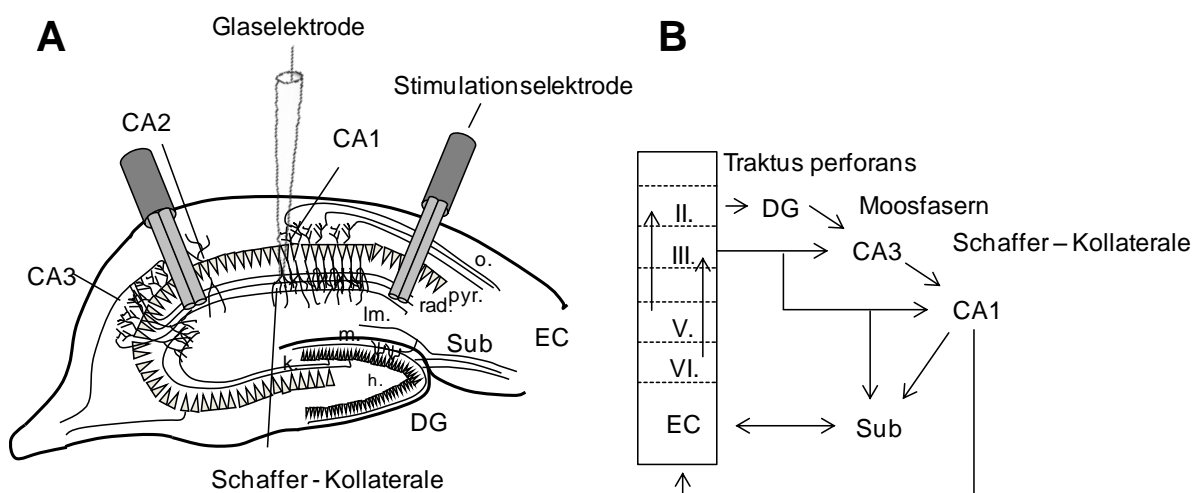
### 1.3.3.2 GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren

GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten metabotropen Rezeptoren. Sie bestehen aus einem Polypeptid mit sieben Transmembrandomänen (TM1-TM7) und können prä- und postsynaptisch lokalisiert sein. Ihre Aktivierung führt zu einer Verminderung des Kalzium-Einstroms und zu einer Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit (Treiman 2001). Dies bewirkt präsynaptisch eine Hemmung der GABA-Ausschüttung (negatives Feedback) und postsynaptisch die langsame Komponente des inhibitorischen postsynaptischen Stroms (IPSC) (Kuriyama und Ueha 1992; Ranft et al. 2004). In dieser Arbeit wurde CGP 35348 als spezifischer Antagonist für GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren verwendet (Olpe et al. 1990).

## 1.4 Hippocampus

### 1.4.1 Struktur und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus ist eine stark konservierte Hirnstruktur im medialen Temporallappen und bildet zusammen mit dem entorhinalen Cortex, dem Subiculum und dem Gyrus dentatus die hippocampale Formation. Diese ist Teil des limbischen Systems. Der Hippocampus lässt sich in das Stratum pyramidale einerseits und die Strata radiatum, oriens, lacunosum, moleculare andererseits einteilen. Im Stratum pyramidale befinden sich die Zellkörper der Pyramidenzellen. Morphologisch und funktionell lässt sich der Hippocampus in die Regionen Cornus ammonis 1-3 (CA1-CA3) unterteilen (siehe Abb. 1.4.1). Innerhalb des neuronalen Netzwerkes des Hippocampus existieren drei maßgebliche afferente Verbindungswege, die unter dem Begriff „trisynaptische Bahn“ zusammengefasst werden (Doller und Weight 1982; Yeckel und Berger 1990). Der entorhinale Cortex ist über den Tractus perforans mit dem Gyrus dentatus verbunden. Über die Moosfasern sind die Körnerzellen des Gyrus dentatus mit der CA3 Region des Hippocampus verknüpft. Den dritten Anteil dieses Systems bilden die Schaffer-Kollaterale, welche Pyramidenzellen der CA3-Region mit den Pyramidenneuronen der CA1-Region verbinden. Gemäß ihrem Aufbau ist die trisynaptische Bahn unidirektional und die exzitatorische Hauptkomponente der hippocampalen Formation (Amaral 1993; Henze et al. 2000). Intrahippocampale Verbindungen, die von der CA1-Region ausgehen, sind hingegen bidirektional. Der entorhinale Kortex projiziert zu den Neuronen der CA1-Region, erhält aber auch Informationen aus diesem Gebiet.



**Abb. 1.4.1:** : Laminarer Aufbau des Hippocampus und trisynaptischer Schaltkreis

**A:** Schematische Darstellung des Hippocampus. Strukturelle Organisation mit Cornus ammonis 1 (CA1), der Cornus ammonis 2 (CA2), der Cornus ammonis 3 (CA3), dem Gyrus dentatus (DG), dem Subiculum (Sub) und dem entorhinalen Cortex (EC). fEPSP-Ableitung nach elektrischer Stimulation der Schaffer-Kollaterale. **B:** Trisynaptischer hippocampaler Schaltkreis. Signale des entorhinalen Kortex erreichen über den Tractus perforans die Körnerzellen des DG, welche efferent über Moosfasern in die CA3 Region projizieren. Pyramidenzellen der CA3 Region gehen über Schaffer-

Kollaterale synaptische Verbindungen mit den Pyramidenneuronen der CA1-Region ein, die wiederum das Subiculum erregen. Das Subiculum besitzt seinerseits Afferenzen und Efferenzen zum entorhinalen Cortex. EC: entorhinaler Cortex, h.: Hillus; k.: Körnerzellschicht; Im.: Stratum lacunosum moleculare; m.: Stratum moleculare; o.: Stratum oriens; pyr.: Stratum pyramidale; rad.: stratum radiatum (Amaral 1993).

Eine entscheidende Funktion des Hippocampus liegt in der Konsolidierung des deklarativen Gedächtnisses. 1953 machte der Neurochirurg William Scoville die Entdeckung, dass die bilaterale Entfernung des Hippocampus und der darüber liegenden Kortexareale zu einer anterograden Amnesie führt (Scoville und Milner 1957). Testpsychologische Ergebnisse haben gezeigt, dass dabei nur das deklarative Gedächtnis gestört ist, nicht aber das prozedurale Gedächtnis (Birbaumer et al. 1999). Bei der Gedächtniskonsolidierung strömen Reize aus verschiedenen kortikalen und subkortikalen Arealen ins limbische System, woraufhin der Hippocampus die Inhalte assoziativ verknüpft.

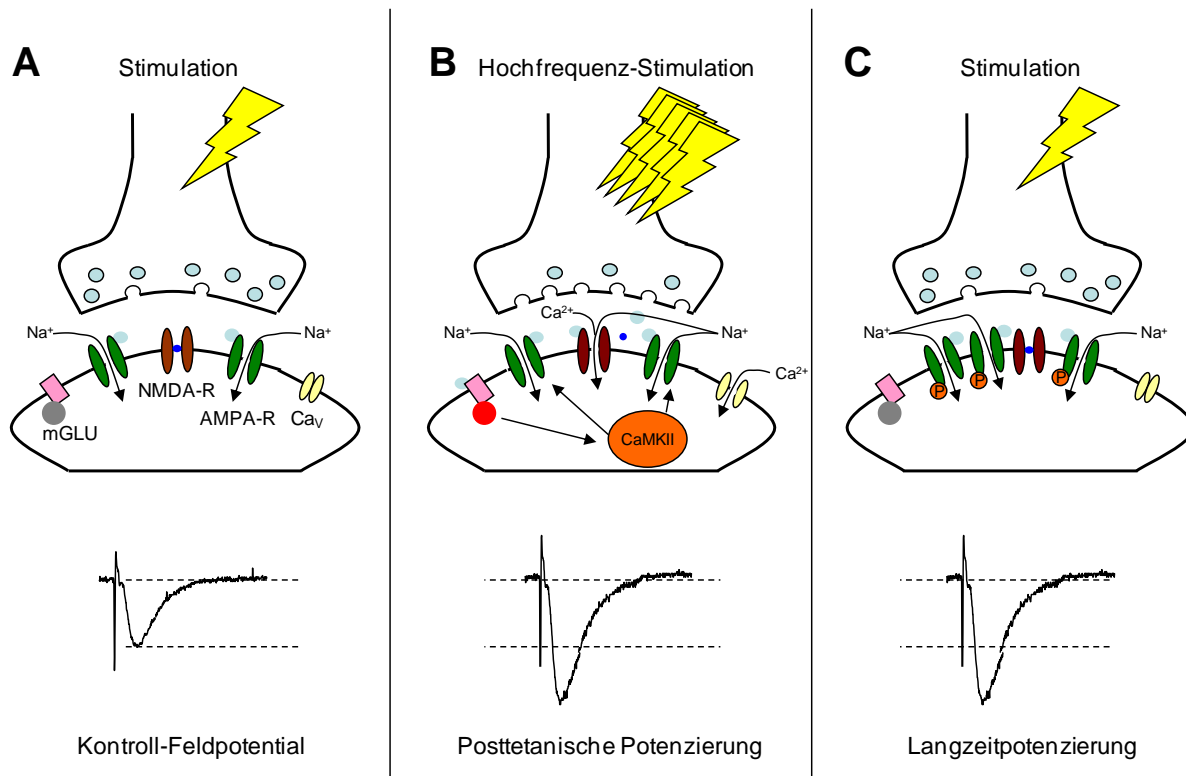
#### **1.4.2 Synaptische Plastizität**

Im ZNS erfolgt die Verarbeitung und Speicherung von Informationen durch Modulation der synaptischen Effizienz. Die aktivitätsabhängige Änderung der synaptischen Übertragungsstärke, welche über glutamaterge, aber auch GABAerge Mechanismen vermittelt wird, bezeichnet man als synaptische Plastizität (Bliss und Collingridge 1993). Grundsätzlich lassen sich zwei Formen der aktivitätsabhängigen Änderung der Übertragungsstärke unterscheiden: die Potenzierung, eine Verstärkung der synaptischen Übertragung und die Depression, eine Verminderung der synaptischen Übertragung. Beide Veränderungen werden durch charakteristische Reizmuster der synaptischen Eingänge ausgelöst und können Minuten bis mehrere Wochen oder länger anhalten. Zusätzlich unterscheidet man neben der Potenzierung und Depression auch Kurzzeit- und Langzeitveränderungen der synaptischen Übertragung. Die Langzeitpotenzierung spielt nicht nur eine Rolle bei neuronalen Anpassungsvorgängen, wie Konditionierung, Lernen/Gedächtnis, selektiver Wahrnehmung und Habituation, sondern auch bei der Schmerz-Chronifizierung. Im gesamten ZNS (Neokortex, Cerebellum, Amygdala, Hippocampus und Rückenmark) kann Langzeitpotenzierung vorkommen (Bliss und Collingridge 1993; Malenka und O'Connor 1995).

#### **1.4.3 Hippocampale Langzeitpotenzierung**

Die Unterdrückung der hippocampalen synaptischen Plastizität könnte ein *in vitro*-Modell für Lern- und Gedächtnisstörungen darstellen. Grundlegende Merkmale der hippocampalen Langzeitpotenzierung sind Kooperativität, Assoziativität und Inputspezifität (Bliss und Collingridge 1993). Die Mechanismen der LTP in der CA1-Region des Hippocampus sind *in vitro* gut untersucht. Ein hochfrequenter Stimulus führt prä- als auch postsynaptisch zur Membrandepolarisation (Malenka und Nicoll 1999) und bewirkt darüber hinaus folgende

Auslösemechanismen: Die repetitive Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt führt via postsynaptischer Depolarisation zum Lösen der spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Blockade und somit zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. Auf Grund der  $Ca^{2+}$ -Leitfähigkeit der NMDA Rezeptoren kommt es zum postsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Einstrom (Bear und Malenka 1994; Jodar und Kaneto 1995). Dieser intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsanstieg wird über spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle und metabotrope Glutamaterezeptoren verstärkt (Malenka und O'Connor 1995). Intrazelluläre Injektion von Kalzium Chelatoren verhindert die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration, welche Voraussetzung für die Induktion der LTP ist (Lynch et al. 1983; Brocher et al. 1992). Bei dieser NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP wird die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) (Lledo et al. 1995) aktiviert, welche den vesikulären Einbau von AMPA-Rezeptoren katalysiert sowie über Phosphorylierung dieser Rezeptoren zur Verstärkung der Ionenleitfähigkeit und somit der synaptische Übertragung führt. Zusätzlich zur CaMK II sind auch die Proteinkinase C (PKC) und die Protein-Tyrosin Kinase für posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, essentiell (Klann et al. 1993). Neben diesen Mechanismen beeinflusst intrazelluläres Kalzium als sog. second messenger die Expression von Genen, was als Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse gesehen wird (Maren und Baudry 1995; Asztely et al. 1996). Eine NMDA-Rezeptor-abhängige LTP kann man an glutamatergen Synapsen verschiedener Hirnregionen beobachten und durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure (D-AP5) verhindern (Bliss und Collingridge 1993).



**Abb. 1.4.2: NMDA-Rezeptor-abhängiger Mechanismus der LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus (vereinfacht)**

**A:** Im Rahmen der synaptischen Transmission führt die Glutamatausschüttung zur Aktivierung von postsynaptischen AMPA-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren sind durch Magnesiumionen blockiert. **B:** Durch eine tetanische Stimulation wird aufgrund der starken Depolarisation der spannungsabhängige Magnesiumblock gelöst und der Ionenkanal durchlässig für  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen. Der Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt zur Aktivierung von Proteinkinasen (CaMKII). **C:** Für die Aufrechterhaltung der LTP ist sowohl der durch den modifizierten AMPA-Rezeptor vermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstrom als auch eine erhöhte Transmitterausschüttung notwendig.

#### Modifikationen durch Anästhetika

Eine Unterdrückung der synaptischen Plastizität in Form der Langzeitpotenzierung durch Anästhetika könnte das *in vitro* Korrelat für deren amnestische Eigenschaften darstellen (Ishizeki et al. 2008). Im Rahmen einer *in vitro* Studie an Hippocampusschnitten von Mäusen konnte gezeigt werden, dass Halothan die Induktion von LTP verhindert, wohingegen die sukzessive Zugabe von Methoxyfluran keinen Effekt auf die Ausbildung hat (MacIver 1989). Weitere Studien beschreiben für Sevofluran eine konzentrationsabhängige Beeinträchtigung der LTP-Induktion (Otsubo et al. 2008; Haseneder et al. 2009) und eine Hemmung der hippocampalen LTP über GABAerge Mechanismen durch Isofluran und Propofol (Simon et al. 2001; Nagashima et al. 2005). Für das Hypnotikum Etomidate ist eine Aktivierung der  $\alpha_5GABA_A$ -Rezeptoren und eine Hemmung der LTP beschrieben (Martin 2009).



#### 1.4.4 Spannungsabhängige Kalziumkanäle und deren Rolle bei der LTP

Spannungsabhängige Kalziumkanäle ( $Ca_v$ ) spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalzium-Homöostase und sind darüber hinaus an Muskelkontraktion, Chemotaxis, Genexpression, synaptischer Plastizität und der Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern beteiligt (Bootman et al. 2001). Sie bestehen aus einer porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und den  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  und  $\gamma$ - Untereinheiten. Nach pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften lassen sich die Kalziumkanäle in hoch-spannungsaktivierte (high voltage activated, HVA) d.h. sie werden ab einem Membranpotential von -55 mV aktiviert und niederspannungsaktivierte (low voltage activated, LVA) Kalziumkanäle (aktiviert ab -30 mV) klassifizieren. HVA-Kalziumkanäle werden in L-Typ-Kalziumkanäle  $Ca_v1.1$ - $1.4$  und Non-L-Typ-Kalziumkanäle (P-; Q-; R-)  $Ca_v2.1$ - $2.3$ . eingeteilt. Zu den LVA-Kanälen zählt der T-Typ-Kalziumkanal  $Ca_v3.1$ - $3.3$  (Ertel et al. 2000; Catterall et al. 2005), wobei T für „transient“ und L für „long lasting“ steht, und damit das Inaktivierungsverhalten bzw. die Leitfähigkeit der Kanäle (Tsien et al. 1985) charakterisiert wird.

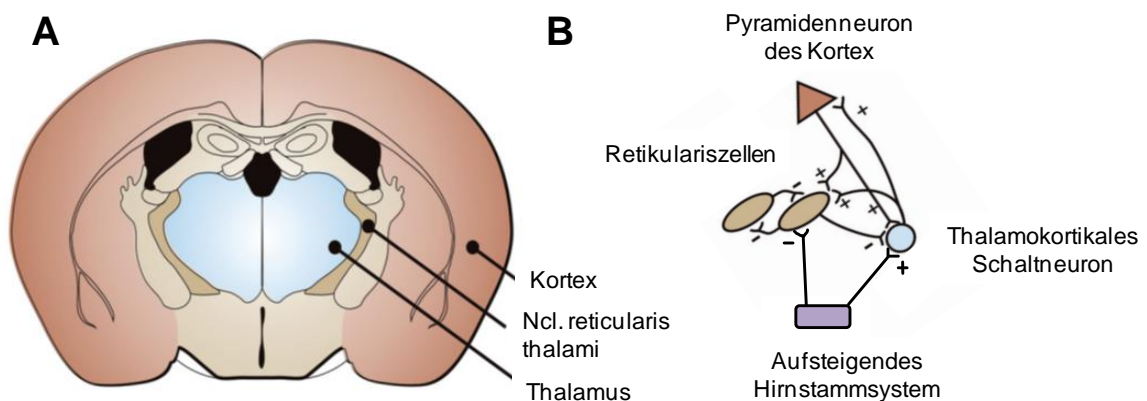
Neben dem NMDA-Rezeptor wird dem spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanal eine große Bedeutung für den Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Rahmen der LTP zugesprochen. Allgemein erfordert die Aktivierung von L-Typ-Kalziumkanälen eine stärkere Depolarisation und zeigt eine langsame Inaktivierung (Catterall et al. 2005). Spannungsabhängige Kalziumkanäle sind für die Induktion von LTP und die Aktivierung der für Lernprozesse wichtigen ERK-Signaltransduktionskaskade essentiell. Die Transkription kalziumabhängiger Gene z.B. brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Zif/268 spielen eine wichtige Rolle für das Lernen und adaptive Prozesse im ZNS (Patterson et al. 2001). Desweiteren wird durch den Kalziumeinstrom der Transkriptionsfaktor CREB anhaltend phosphoryliert und die damit assoziierte CRE-gesteuerte Genexpression im Hippocampus aktiviert (Dolmetsch et al. 2001).

Im ZNS sind L-Typ-Kalziumkanäle weit verbreitet und klassischerweise durch die  $Ca^{2+}$ -Kanalantagonisten Dihydropyridine wie Nifedipin, Phenylalkylamine und Benzothiazepine antagonisierbar. Die non-L-Typ Kalziumkanäle (P-, Q-) wurden in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von  $\omega$ -Agatoxin IVA (Randall und Tsien 1995) und  $\omega$ -Conotoxin GIVA gehemmt.

#### 1.5 Der Thalamus, das „Tor zum Bewusstsein“

Den größten Teil des Diencephalons bildet der Thalamus. Dieser wird anatomisch in zwei Hauptstrukturen, den dorsalen und den ventralen Thalamus eingeteilt. Die Kerne des Thalamus werden in palliothalamische (spezifische Kerne), die mit der Großhirnrinde (dem

„Pallium cerebri“) eng verbunden sind, und die trunkothalamischen (unspezifischen) Kerne, die mit dem Hirnstamm (dem „Truncus cerebri“) verbunden sind, eingeteilt. Neueren Studien zufolge projizieren nahezu alle Kerne des dorsalen Thalamus zum zerebralen Kortex und bilden mit ihm das thalamokortikale System (Guillery und Sherman 2002). Die Kerne des dorsalen Thalamus lassen sich in zwei Gruppen einteilen, eine Population projiziert spezifisch zur Region der Schicht 4 des zerebralen Kortex, wohingegen eine weitere Population diffus zu verschiedenen Regionen und Schichten des Kortex Verbindungen ausbildet (Jones 2009). Der ventrale Thalamus erhält Kollaterale sowohl vom thalamokortikalen als auch von kortikothalamischen Bahnen, die in der Capsula interna verlaufen (Jones 1983; Lubke 1993). Hauptsächlich besteht der ventrale Thalamus aus Retikulariszellen, welche netzartig um den Thalamus eine Hülle bilden (Lubke 1993; Jones 2009). Der Nucleus reticularis thalami (RTN) nimmt eine zentrale Position im thalamischen Schaltkreis ein und bildet durch bidirektionale kollaterale Projektionen thalamokortikaler und kortikothalamischer Fasern die Basis der Schaltkreise (McCormick und Bal 1997; siehe Abb. 1.5.1). Die Retikulariszellen kommunizieren über inhibitorische GABAerge Verbindungen mit verschiedenen spezifischen thalamischen Kernen (White et al. 1984). Afferent werden sie von der Formatio reticularis im Hirnstamm hemmend gesteuert. Das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem (ARAS) führt durch ungerichtete Hemmung der Retikulariszellen zur Disinhibition und somit Aktivierung der spezifischen Thalamuskern, wodurch diese mit ihren erregenden Efferenzen den Kortex aktivieren (McCormick und Bal 1997).



**Abb. 1.5.1: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Schaltkreises**

**A:** Koronarschnitt eines Gehirns der Maus: dargestellt sind der Kortex, Nucleus reticularis thalami und der Thalamus. **B:** Schematisches Diagramm des thalamokortikalen Schaltkreises. + zeigt die glutamaterge synaptische Kontakte; - zeigt inhibitorische GABAerge synaptische Kontakte; (Abb. verändert nach Wahl-Schott und Biel 2009)

Man unterscheidet im Wesentlichen drei Arten von thalamischen Neuronen: thalamische Schaltneurone (TC-Neurone), lokale Interneurone und Retikulariszellen (RTN-Neurone). TC-Neurone können in 2 Erscheinungsformen auftreten. Die Sternzellen stellen den größeren

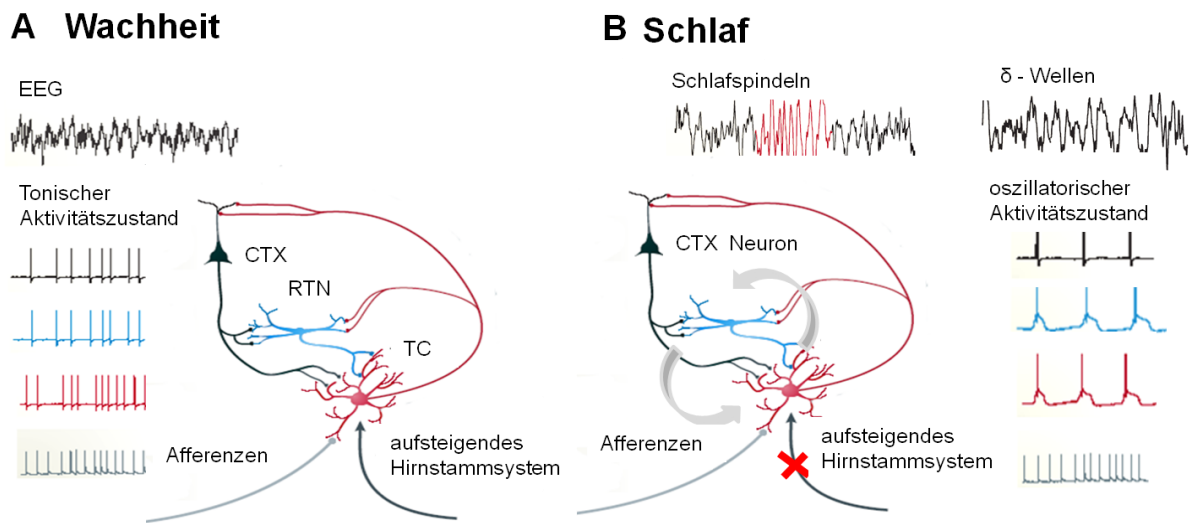
Anteil (85 - 90 %) dar, sie besitzen ein langes Axon, eine Somafläche zwischen 300 und 400  $\mu\text{m}^2$ , die Dendriten lagern sich radiär um den Zellkörper an und ihre Projektionen reichen in die kortikalen Schichten III, IV und V. Den kleineren Anteil (10 – 15 %) bilden die Buschzellen mit einer kleineren Somafläche (150 – 200  $\mu\text{m}^2$ ) und deutlich schlankeren Dendriten. Sie projizieren mit geringerer Leitungsgeschwindigkeit in die oberflächlichen Kortexschichten I und II (Guillery 1966; Grossman et al. 1973). Interneurone lassen sich morphologisch an den sich lokal aufzweigenden Axonen und einem oval förmigen Soma (200  $\mu\text{m}^2$ ) erkennen. RTN-Neurone besitzen eine Zelloberfläche von 300 – 400  $\mu\text{m}^2$  und ihre dicken Primärdendriten enden in kleinen Ästen (Scheibel und Scheibel 1966; Lubke 1993).

Für die Wahrnehmung der Außenwelt stellt der Thalamus die wichtigste Umschalt- und Vermittlungsstation dar und wird deshalb häufig als „Tor zum Bewusstsein“ bezeichnet. Fast alle sensorischen und motorischen Informationen, mit Ausnahme der Geruchsbahn, werden in verschiedenen Kernen des Thalamus umgeschaltet und auf entsprechende Cortexareale verteilt (McCormick und Bal 1997; Huguenard und McCormick 2007). Zusätzliche Projektionen zwischen dem Kortex und den unspezifischen Kernen des dorsalen Thalamus sind verantwortlich für die Modifikation von Eingangsinformationen. Thalamische Neurone sind nicht nur für den Datentransfer verantwortlich, sondern auch für unterschiedliche Bewusstseinszustände. Als Rythmusgenerator reguliert der Thalamus verschiedene Verhaltenszustände wie Wachheit, Schlaf und wahrscheinlich auch Phasen der Anästhesie (Steriade 2005).

### **1.5.1 Das thalamokortikale Netzwerk**

TC-Neurone können zwei grundsätzlich verschiedene Aktivitätszustände einnehmen (Jahnsen und Llinas 1984; Steriade und Deschenes 1984). Während bestimmter Phasen des Tiefschlafs und der Anästhesie, sowie bei bestimmten Epilepsieformen zeigt sich eine oszillatorische Aktivität (<5 Hz), während bei Wachheit und erhöhter Aufmerksamkeit tonische Aktivität im  $\gamma$ -Bereich (>20 - 40 Hz) nachweisbar ist (Banati et al. 2001). In Wachheitsphasen führt das ARAS sowie die exzitatorische Transmitterfreisetzung aus aufsteigenden spinothalamischen Bahnen zur Depolarisation von TC-Neuronen und somit zu tonischer Aktivität, die sich im EEG durch desynchronisierte, hochfrequente Muster mit niedriger Amplitude widerspiegelt (Pape et al. 2005 ; siehe Abb.1.5.2). In dieser Phase werden Informationen aus der Peripherie durch den Thalamus zum Kortex weitergeleitet. Während Schlafphasen fällt der erregende Einfluss auf die TC-Neurone weg, was zu einer Hyperpolarisation führt. Dadurch entsteht eine langsame oszillatorische Aktivität (sog. Burst-Modus), die mit der Generierung von Aktionspotentialsalven assoziiert ist und die im EEG als synchrone Aktivität mit hoher Amplitude erkennbar sind. Bei diesem Aktivitätszustand ist der

Informationstransfer durch den Thalamus zum Kortex gehemmt (Huguenard und McCormick 2007).



**Abb. 1.5.2: Aktivitätsmuster im thalamokortikalen Netzwerk bei Wachheit und Schlaf**

Das Netzwerkschema verdeutlicht zwei geschlossene synaptische Schaltkreise, die rekurrente Netzwerkoszillationen fördern. Axone thalamischer Schaltneurone (TC-Neurone) erreichen den zerebralen Kortex und die kortikalen Neurone projizieren zurück in den Thalamus, Axone von TC-Neuronen innervieren über synaptische Verbindungen Neurone des Nucleus reticularis thalami (RTN-Neurone), welche eine rekurrente Hemmung der TC-Neurone vermitteln. **A:** Während Wachheit führt die Transmitterfreisetzung zu einer Depolarisation der TC-Neurone, welche tonische Folgen von Aktionspotentialen in TC-Neuronen und RTN-Neuronen induziert und eine direkte Übertragung eintreffender, sensorischer Signale zum Kortex ermöglicht. **B:** Im Schlaf, durch Hyperpolarisation induziert, wechseln TC-Neurone in den oszillatorischen Aktivitätszustand (Burst-Modus) und werden im thalamokortikalen Netzwerk synchronisiert. Dies begründet die typischen Schlafwellen ( $\delta$ -Wellen) im EEG. Der Übergang von Wachheit zum Schlafzustand wird durch Schlafspindeln charakterisiert, durch Entladung einer Salve (burst) von einem TC-Neuron auf eine GABAerges RTN-Neuron, sendet dieses ein postsynaptisches inhibitorisches Potential zurück. Durch erneute Hyperpolarisation und Bildung neuer Salven von Aktionspotentialen werden intrathalamische Oszillationen generiert. CTX: Kortex Neuron; (Abb. verändert nach Franks 2008)

Das Antwortverhalten der TC-Neurone und der Wechsel der beiden Aktivitätsmodi ist also abhängig vom Membranpotential. Eine Hyperpolarisation leitet den Übergang der Neurone vom Zustand der tonischen Aktivität in den oszillatorischen Zustand, der Entladung von Aktionspotenzialsalven ein. Eine depolarisierende Wirkung, die für das tonische Feuern und den Zustand der Wachheit verantwortlich ist, wird unter anderem durch die Freisetzung von Neurotransmittern aus dem ARAS bewirkt. Die Ausschüttung der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh), Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT), Histamin (His), Glutamat und verschiedene Neuropeptide führt zu einer Aktivierung muskarinerger-,  $\alpha$ 1-adrenerger-, H1- und metabotroper Glutamatrezeptoren (Steriade et al. 1990; Steriade 1992; Mooney et al. 1993). Zudem wirken die Transmitter kontrollierend, indem über eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Aktivierung der HCN-Kanäle (Hyperpolarisations-

aktivierter Kationenkanal) zu positiveren Werten verschoben wird (Pape 2005; siehe Abb.1.5.4). Die daraus resultierende Depolarisation der TC-Neurone und eine verminderte  $K^+$ -Hintergrundleitfähigkeit ( $I_{KL}$ ) unterbricht die Spindeloszillationen und führt den tonischen Aktivitätsmodus herbei (McCormick und Bal 1997).

Die Ausprägung und der Wechsel zwischen den Aktivitätszuständen wird auf zellulärer Ebene durch die Art und Lokalisation der Membranrezeptoren und Ionenkanäle der beteiligten Neuronentypen, durch die synaptische Verschaltung innerhalb des Netzwerks und durch die modulatorischen Effekte der Neurotransmitter beeinflusst.

#### *Modulation durch Anästhetika*

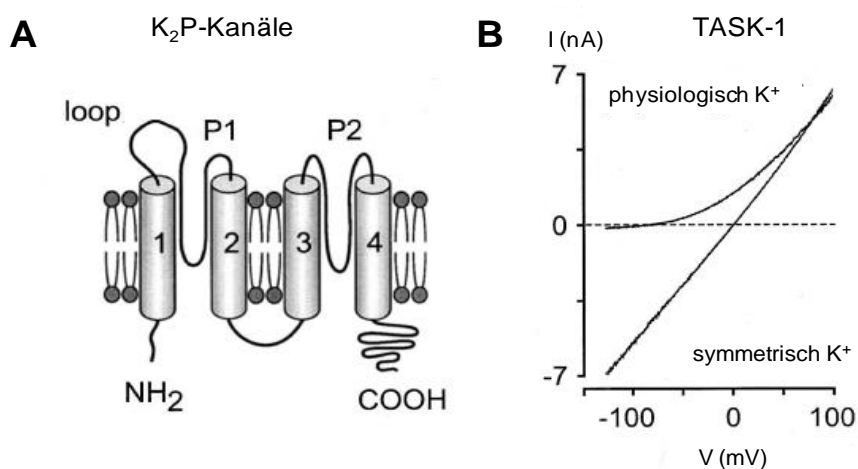
Trotz zahlreicher Unterschiede zwischen Schlaf und Allgemeinanästhesie sprechen Gemeinsamkeiten auf neurophysiologischer Ebene dafür, dass zumindest Teile des Phänomens Allgemeinanästhesie ähnlich wie Schlaf vermittelt werden (Tung und Mendelson 2004). Sind TC-Neurone im oszillatorischen Aktivitätszustand, werden keine Informationen aus der Peripherie an den Kortex weitergeleitet. Eine Unterdrückung dieses Informationsflusses könnte auch ein wichtiger Wirkmechanismus von Anästhetika sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass Anästhetika das Membranpotential von TC-Neuronen hyperpolarisieren und damit deren Erregbarkeit hemmen (Chen et al. 2005; Ying et al. 2006). Im thalamokortikalen Netzwerk gibt es unterschiedliche Zielstrukturen, deren Modulation durch Anästhetika zu Änderungen des Membranpotentials führt. Zum einen führt eine Hemmung der exzitatorischen synaptischen Transmission (Franks und Lieb 1994) sowie eine Verstärkung der inhibitorischen synaptischen Transmission zu einer Hyperpolarisation (Mihic et al. 1997), welche den oszillatorischen Zustand hervorruft. Eine weitere Möglichkeit zur Hyperpolarisation von TC-Neuronen ist die Erhöhung von  $K^+$ -Leitfähigkeiten, die zu einem sog. Kurzschluss anderer Leitfähigkeiten führt (Ries und Puil 1999). Das molekulare Korrelat dieser  $K^+$ -Leitfähigkeiten ist die Familie der  $K_2P$ -Kanäle, welche für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials sorgen. Eine Modulation dieser Kanäle durch Anästhetika könnte an der Vermittlung der hypnotischen Eigenschaften dieser Substanzen beteiligt sein (Franks 2008). Neben den  $K_2P$  Kanälen tragen noch weitere Ionenkanäle zum dauerhaften Auswärtsstrom ( $I_{K_{SO}}$ , standing outward current) bei, darunter persistierende  $Na^+$ -Kanäle, einwärts-gleichrichtete  $K^+$ -Kanäle, spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle und Schrittmacher- (HCN)-Kanäle (Meuth et al. 2006). HCN-Kanäle, welche den hyperpolarisations-aktivierten Kationenstrom vermitteln, sind ebenfalls für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verantwortlich und damit ein weiterer möglicher Angriffspunkt für Anästhetika.

## 1.5.2 Konstitution des Membranpotentials

Eine grundlegende Bedeutung für die Funktion von TC-Neuronen hat das Membranpotential (McCormick und Bal 1997) und die an der Konstitution beteiligten Ionenkanäle.

### 1.5.2.1 Zwei-Poren Domänen $K^+$ -Kanal ( $K_2P$ ) Familie

Erst vor einigen Jahren wurde diese Familie der  $K^+$ -Kanäle entdeckt, deren Mitglieder eine einzigartige Membrantopologie aufweisen. Jede Untereinheit besitzt vier transmembran- und zwei porenformende Domänen (Abb. 1.5.3). Daher werden die Kanäle als 2-Porendomänen  $K^+$ - ( $K_2P$ )-Kanäle bezeichnet.



**Abb: 1.5.3: Schematische Darstellung eines Zwei-Poren Domänen  $K^+$ -Kanäle ( $K_2P$ )**

**A:** Die Kanaluntereinheiten besitzen zwei Poren-formende P-Domänen (P1, P2) und vier Transmembranregionen (M1-M4), die sich im Tandem organisieren. **B:** Strom-Spannungskurve von TASK-1, erstellt durch eine Spannungsrampe von -120 mV bis 100 mV unter physiologischen (150 mM  $K^+$  intrazellulär; 5 mM  $K^+$  extrazellulär) und symmetrischen Bedingungen (150 mM  $K^+$  intrazellulär; 150 mM  $K^+$  extrazellulär) (Abb. verändert nach Patel und Honore 2001).

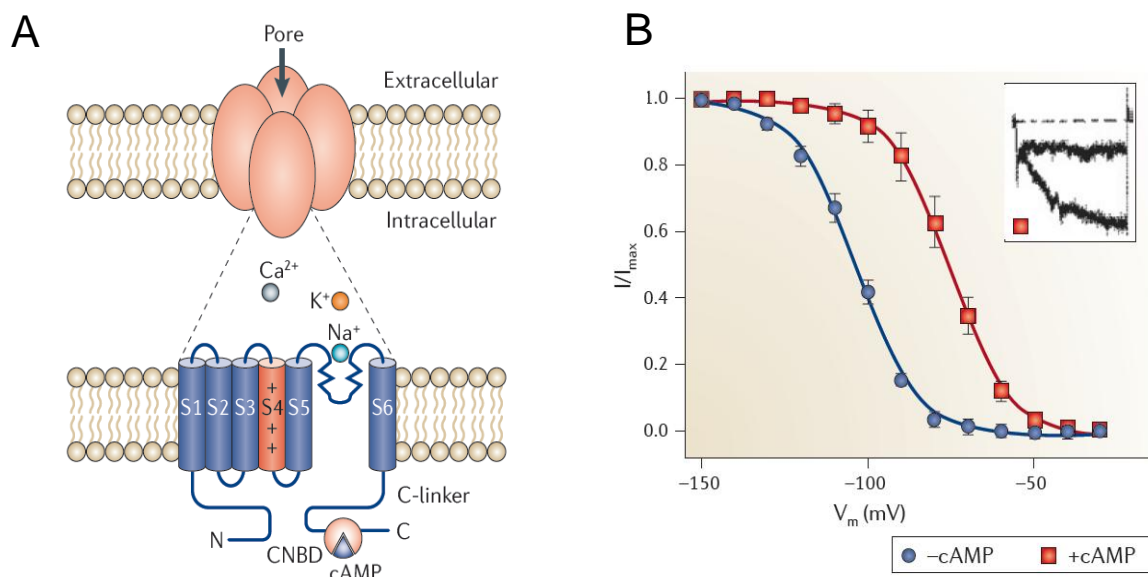
Die Klassifizierung von 15 human identifizierten  $K_2P$ - Proteinen nach Sequenzhomologien und funktionellen Eigenschaften führte zu einer Einteilung in 6 Unterfamilien (TWIK, THIK, TREK, TASK, TALK, TRESK) (Patel et al. 1999). Die meisten Mitglieder dieser Kanalfamilie zeigen eine ständige basale Aktivität und tragen entscheidend zum Membranpotential bei. Funktionell vermitteln die meisten Mitglieder der Familie spannungsunabhängige  $K^+$ -Hintergrundströme (Patel und Honore 2001), wohingegen die Offenwahrscheinlichkeit der pH-sensitiven TASK (TWIK-related-Acid-Sensitiv  $K^+$ -channels)-Kanäle (Karschin et al. 2001) mit zunehmender Depolarisation zunimmt. TC-Neurone exprimieren TASK-1- und vor allem TASK-3 Isoformen, welche einen konstanten  $K^+$ -Auswärtsstrom vermitteln und das Membranpotential beeinflussen (Meuth et al. 2003). Die  $K_2P$ - Kanäle werden indirekt durch verschiedene Neurotransmitter und Neuromodulatoren über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren geschlossen, was zu einer Reduktion des Auswärtsstroms und zu einer

Depolarisation der Membran führt. Dies wiederum fördert den tonischen Aktivitätszustand und damit den Transfer von Information der Peripherie zum Kortex. Die TASK-Kanal-Aktivität ist durch pH-Änderungen, Anästhetika, Temperatur, Phospholipide und Bariumionen modulierbar.

#### 1.5.2.2 HCN-Kanäle

Im zentralen Nervensystem sind HCN-Kanäle in einer Vielzahl von Neuronen zu finden (Luthi und McCormick 1998). Diese Kanäle vermitteln einen Kationenstrom, welcher aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften als  $I_f$  („funny“),  $I_q$  („queer“) oder  $I_h$  („hyperpolarisation-activated“) bezeichnet wird (Robinson und Siegelbaum 2003). Dieser Kationenstrom erfüllt wie im Reizleitungssystem des Herzens in einigen Teilen des Gehirns eine Schrittmacherfunktion und kontrolliert rhythmische Oszillationen von Einzelneuronen und neuronalen Netzwerken. Weitere wichtige Funktionen sind die Kontrolle des Ruhemembranpotentials und die Modulation der synaptischen Plastizität (Robinson und Siegelbaum 2003). Die Rolle des  $I_h$  für das Ruhemembranpotential und thalamische Oszillationen wurde anhand HCN2-defizienter Mäuse bestätigt (Ludwig et al. 2003). Bei Säugetieren sind bisher vier Mitglieder der HCN-Genfamilie (HCN1-4) bekannt, die sich in ihrer Aktivierungskinetik, Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und im Ausmaß der Modulation durch zyklische Nukleotide unterscheiden. Ein funktioneller HCN-Kanal besteht aus 4 Untereinheiten, wobei jede Untereinheit 6 Transmembransegmente besitzt. Im Gegensatz zu anderen spannungsabhängigen Kationenkanälen öffnen HCN-Kanäle bei Hyperpolarisation. Das S4-Segment dient hierbei als Spannungssensor, der auf Änderungen des Membranpotentials reagieren kann (Broomand et al. 2003). Bei Membranhyperpolarisation bewegt sich der Spannungssensor zum Zellinneren hin, wodurch der Kanal geöffnet wird. Die Isoformen der HCN-Kanäle unterscheiden sich in Bezug auf die Spannung ihrer halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ). Dabei stellt  $V_{1/2}$  ein Maß für den Spannungsbereich dar, in dem die Kanäle aktiviert werden. In der Literatur variieren die Werte, sie liegen zwischen -70 mV und -100 mV, wobei HCN2 tendenziell bei negativeren Potentialen aktiviert wird als HCN4 und HCN1 (Ludwig et al. 1999). In Abhängigkeit vom anliegenden Membranpotential zeigen HCN-Kanäle eine exponentielle Zunahme des Ionenflusses durch die Kanalpore, wobei die Aktivierungskinetik bei zunehmender Hyperpolarisation immer schneller wird. Für die HCN1 Isoform wurde die schnellste Aktivierungskinetik beschrieben, gefolgt von HCN2 und HCN3, die einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Mit Abstand am langsamsten wird der Strom durch den HCN4 Kanal geleitet. Trotz der großen Homologie zwischen der Porenregion von HCN-Kanälen und Kaliumkanälen leiten HCN-Kanäle sowohl Kalium- als auch Natriumionen. Mit der GYG (Glycin-Tyrosin-Glycin)-Sequenz besitzen auch die HCN- Isoformen das Hauptmotiv des Selektionsfilters von Kaliumkanälen (Doyle et al. 1998), tragen aber unter physiologischen

Bedingungen hauptsächlich einen depolarisierenden  $\text{Na}^+$ -Einwärtsstrom. Die Varianz der Aminosäuresequenz außerhalb des Motivs könnte den Durchlass von Natriumionen erklären. Am zytoplasmatischen S4-S5- Linker stellt ein Histidinrest in Position 321 den pH-Sensor der HCN-Kanäle dar. Im C-Terminus befindet sich eine Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD; „cyclic nucleotide binding-domain“), die deutliche Sequenzhomologie zu CNDB Bindestellen anderer Proteine aufweist. Diese besteht aus einem C-Linker, der anschließenden  $\beta$ -Region, sowie einer C-Helix und vermittelt die Reaktion der Kanäle gegenüber cAMP (Wainger et al. 2001; siehe Abb.1.5.4).



**Abb. 1.5.4: Struktur der HCN-Kanäle**

**A:** Schematische Darstellung von HCN-Kanälen. Die HCN-Kanäle besitzen vier Untereinheiten, welche jeweils aus 6 helikalen Transmembransegmenten (S1-S6) zusammen gesetzt werden. Die Kanalpore wird von den Segmenten S5 und S6 gebildet und besitzt einen Selektivitätsfilter, der die Permeabilität von Natrium- und Kaliumionen ermöglicht. Das S4-Segment besitzt zahlreiche positive Ladungen und stellt den Spannungssensor dar. Im C-Terminus befindet sich die Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD), die über eine C-Linker Region mit dem S6 Transmembransegment verbunden ist. Der N-Terminus ist wichtig für die Multimerbildung aus mehreren Untereinheiten. **B:** Spannungsaktivierungskurve in Ab- und Anwesenheit von cAMP. cAMP verschiebt die Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen (Abb. verändert Postea und Biel 2011).

Die Bindung von cAMP beschleunigt die Aktivierungskinetik von HCN-Kanälen und verschiebt  $V_{1/2}$  um 2 bis 20 mV zu positiveren Potentialen (Ludwig et al. 1999). cGMP kann die Kanäle auf diese Weise auch aktivieren, jedoch ist die Affinität im Vergleich zu cAMP deutlich geringer. Bei HCN2 (12-14 mV) und HCN4 (11-23 mV) ist die Verschiebung am deutlichsten ausgeprägt. Zusätzlich wird auch die Aktivierungskinetik beschleunigt, wodurch der „steady-state“ Strom bei einem bestimmten Potential schneller erreicht wird. Über den molekularen Mechanismus der Beeinflussung durch cAMP herrschte lange Zeit Unklarheit. Zum einen wird dieser durch Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der CNBD erklärt



(Wainger et al. 2001). In Abwesenheit von cAMP interagiert der C-Terminus mit der Kernregion des Kanals, verschiebt so die Aktivierung in Richtung hyperpolarisierender Membranpotentiale und verhindert dadurch die Öffnung im physiologischen Bereich. Ein anderes Modell (Johnson und Zagotta 2005) postuliert eine Regulation unabhängig von den Transmembransegmenten. Die 4 C-Termini eines funktionellen Kanals bilden einen sogenannten „gating ring“, der in der Lage ist, eigenständig und abhängig von der Bindung des cAMP die Kanalaktivität zu kontrollieren.

Die Regulierbarkeit der HCN-Kanäle durch das intrazelluläre cAMP in TC-Neuronen stellt einen wichtigen Mechanismus dar, der dem aufsteigenden Hirnstammssystem eine effektive Kontrolle der Oszillationen im thalamokortikalen Netzwerk ermöglicht (Pape 2005).

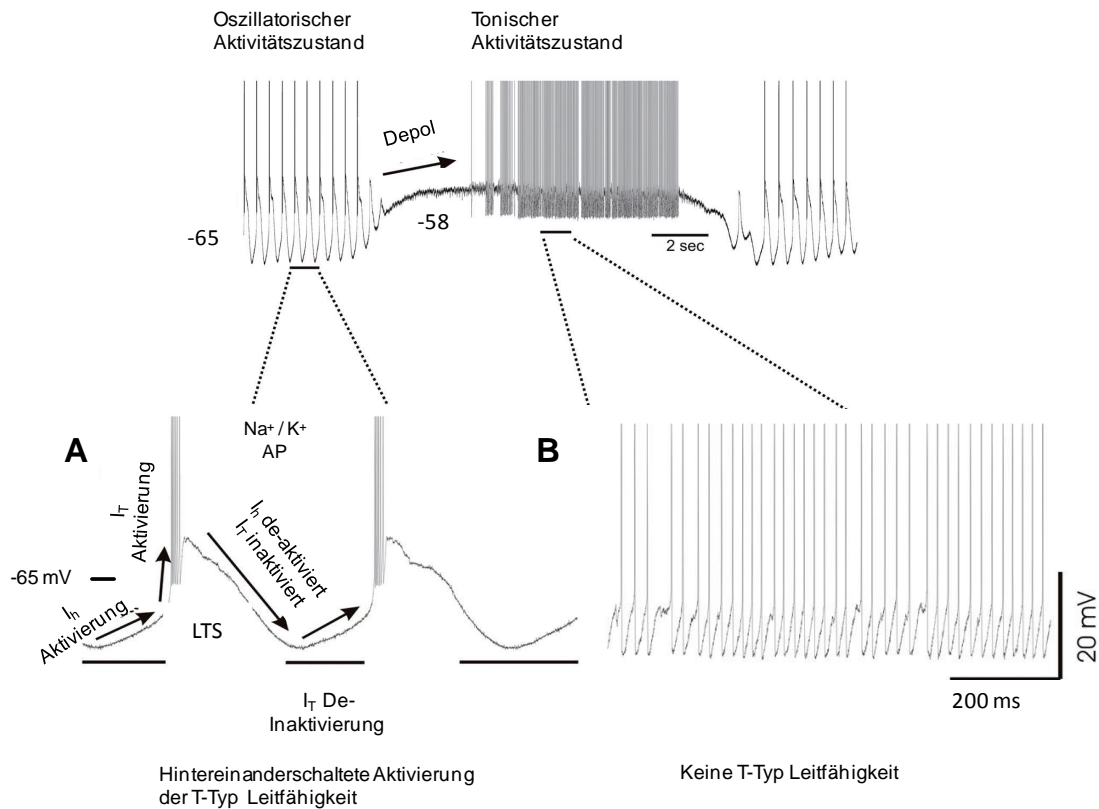
Die Expression der unterschiedlichen Isoformen der HCN-Kanäle im ZNS weist regionale Unterschiede auf. Im Thalamus sind hauptsächlich HCN2 und HCN4 Isoformen in den exzitatorischen TC-Neuronen zu finden (Moosmang et al. 1999; Seifert et al. 1999).

### **1.5.3 Intrinsische Eigenschaften von TC-Neuronen**

Die funktionellen Aktivitätszustände von TC-Neuronen beruhen auf den intrinsischen Eigenschaften der Neurone selbst und auf den thalamokortikalen und intrathalamischen Verbindungen, die über Hirnstammafferenzen moduliert werden. Die intrinsischen  $\delta$ -Oszillationen, welche durch salvenartige Aktionspotentialentladungen charakterisiert sind, entstehen durch Wechselwirkung eines T-Typ-Kalziumstroms ( $I_T$ ) mit dem hyperpolarisations-aktivierten Kationenstrom  $I_h$  (Luthi und McCormick 1998).

#### *T-Typ Kalziumkanal*

Die Aktivierung des T-Typ-Kalziumkanals (siehe Kapitel 1.4.4) ist Grundlage für die oszillatorische Salvenaktivität. Ausgelöst durch eine Membranhyperpolarisation öffnen HCN-Kanäle und induzieren eine langsame Depolarisation bis in den Aktivierungsbereich der T-Typ-Kalziumkanäle. Dies führt zur Aktivierung der T-Typ-Kalziumkanäle, die durch den Kalziumeinstrom das Membranpotential weiter depolarisieren und sich spannungsabhängig als Aktionspotentialsalven, dem sogenannten niederschweligen  $Ca^{2+}$ -Aktionspotential (LTS; low threshold calcium spike) entladen (McCormick und Pape 1990; siehe Abb. 1.5.5).



**Abb. 1.5.5: T-Typ-Kalziumkanal Aktivität kontrolliert das neuronale Feuerverhalten der TC-Neurone**

**A:** Oszillatorischer Aktivitätszustand während Membranhyperpolarisation; **B:** Tonischer Aktivitätszustand während Depolarisation der Membran: Gemeinsam generieren T-Typ-Kalzium- und HCN-Kanäle Membranpotential-Oszillationen. T-Typ Kalziumkanäle leiten  $\text{Ca}^{2+}$  während der oszillatorischen Salvenentladung. Der oszillatorische Aktivitätszustand wird durch entsprechend hohe Dichte an T-Typ Kalziumkanälen und ausreichender Hyperpolarisation, die eine Inaktivierung der T-Typ Kalziumkanäle aktivieren, induziert (Abb. verändert nach McCormick und Bal 1997).

Das LTS wiederum ist Bestandteil des oszillatorischen Aktivitätszustandes, der die Phasen des Schlafes repräsentiert. Die Repolarisation und „Nach-Hyperpolarisation“ der Membran führt bis in den Inaktivierungsbereich der T-Typ-Kalziumkanäle (-65 mV bis -90 mV), bevor ein neuer Zyklus der Salvenaktivität durch erneute Aktivierung von HCN-Kanälen einsetzt. Der T-Strom zeigt eine langsame Inaktivierungskinetik, welche von der Amplitude und Dauer des hyperpolarisierenden Reizes abhängt. So führt eine Unterbrechung der Hyperpolarisation zur Depolarisation der Membran und zur Aktivierung des T-Stroms. Die relativ niedrige Frequenz der Salvenaktivität kann durch die langsamen kinetischen Eigenschaften der Inaktivierung des T-Stroms erklärt werden (McCormick und Bal 1997). Während Phasen der Wachheit sind TC-Neurone depolarisiert und T-Typ-Kalziumkanäle inaktiviert (Steriade et al. 1991). Unter diesen Umständen werden tonisch Aktionspotentiale generiert, welche mit der Aktivierung von hoch-spannungsaktivierten Kalziumkanälen einhergehen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit möglichen neuronal-molekularen Mechanismen, über welche die amnestische und hypnotische Wirkung des Inhalationsanästhetikums Xenon vermittelt werden.

Der Hippocampus hat eine wichtige Bedeutung bei der Gedächtniskonsolidierung, die hippocampale Langzeitpotenzierung gilt als *in vitro* Korrelat für Gedächtnisbildung. In sog. Akut-Schnittpräparaten des Hippocampus wurde daher die Wirkung von Xenon auf die LTP und deren Auslösemechanismen als mögliches neuronales Korrelat für die amnestische Wirkung untersucht.

Die Informationsweiterleitung sensorischer Informationen der Körperperipherie zum Kortex erfolgt über den Thalamus. Aktivitätsänderungen innerhalb des thalamokortikalen Netzwerks, die zu einem verminderten Informationstransfer führen, gelten als neuronales Korrelat des Schlafs und stellen einen möglichen Mechanismus dar, wie Anästhetika ihre hypnotische Wirkung entfalten. Eine Unterdrückung dieses Informationstransfers könnte einerseits durch Inhibition der exzitatorischen bzw. Potenzierung der inhibitorischen Transmission, andererseits durch eine Modulation der an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Ionenkanäle erfolgen. Entsprechend wurde die Wirkung Xenons auf die an diesen Mechanismen beteiligten Ionenkanäle in thalamischen und thalamokortikalen Akut-Schnittpräparaten der Maus untersucht.

Im Detail sollten folgende Fragen erörtert werden:

- Beeinflusst Xenon die synaptische Plastizität im Hippocampus?
  - Welchen Einfluss zeigt Xenon auf die hippocampale Langzeitpotenzierung?
  - Bewirkt Xenon eine Änderung des Kalziumeinstroms während der Induktion der Langzeitpotenzierung im Hippocampus?
  - Welchen Einfluss hat Xenon auf synaptische und extrasynaptische NMDA-Rezeptoren im Hippocampus?
  
- Beeinflusst Xenon die Aktivitätszustände thalamokortikaler Schaltneurone?
  - Welche Wirkung zeigt Xenon auf die exzitatorische und inhibitorische synaptische Transmission innerhalb des thalamokortikalen Netzwerkes?
  - Welchen Einfluss zeigt Xenon auf spannungsabhängige  $K_2P$ -Kaliumkanäle im Thalamus?
  - Wie beeinflusst Xenon spannungsabhängige HCN- und Kalzium-Kanäle im thalamokortikalen Netzwerk?

## 2 Material und Methoden

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Lösungen ist im Anhang aufgeführt.

### 2.1 Herstellung der *in vitro* Hirnschnittpräparate

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene sogenannte Akut-Schnittpräparate benutzt. Die extrazellulären Ableitungen und Ganzzelleableitungen im Hippocampus wurden in Sagittalschnitten, die Kalzium-Messungen in Koronarschnitten durchgeführt. Für Ganzzelleableitungen im ventrobasalen Thalamus wurden thalamokortikale Schnittpräparate (Agmon und Connors 1991) und horizontale Schnitte angefertigt.

#### 2.1.1 Präparation der Hirnschnitte

Die Experimente wurden an männlichen C57Bl6 Mäusen (P21–P49) durchgeführt. Es wurden jüngere Tiere mit abgeschlossener Gehirnentwicklung verwendet. Jüngere Tiere bieten den Vorteil, dass deren Neurone unempfindlicher gegen Anoxie sind und leichter mit der Patch-Clamp-Technik abgeleitet werden können als diejenigen von adulten Tieren. Die Tiere wurden mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten in eiskalter, mit Carbogengas (95 % Sauerstoff / 5% Kohlendioxid) gesättigter künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, artificial cerebrospinal fluid; Zusammensetzung (mM): NaCl 125; KCl 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgCl<sub>2</sub> 6; Glucose 25; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub> 0,5; pH 7,35). Nach Freilegung der Schädelkalotte wurde die Schädeldecke mit zwei Transversalschnitten von kaudal und einem flach geführten Sagittalschnitt vom Rückenmarkskanal entlang der Mittellinie nach rostral hin geöffnet. Die so getrennten Kalottenhälften wurden mit einer Pinzette nach beiden Seiten bis zum Bregma abgehoben, um den Zugang zum Gehirn zu ermöglichen. Das Gehirn konnte, nachdem die Nervi optici durchtrennt waren, mit einem abgerundeten Spatel aus der Schädelgrube herausgelöst werden.

#### *Sagittalschnitte*

Für die Präparation der Sagittalschnitte des Hippocampus wurde das Kleinhirn entfernt und mithilfe eines Sagittalschnittes das Großhirn entlang der Hemisphärenlinie in zwei Hälften geteilt. Anschließend wurden die Hemisphären mit der so entstandenen Schnittfläche auf einen Metallblock mit Cyanoakrylatklebstoff (Histoakryl, B. Braun, Melsungen, Deutschland) befestigt.

### *Koronarschnitte*

In der Präparation der hippocampalen Koronarschnitte wurde mit einer Rasierklinge das Cerebellum in koronarer Schnitfführung entfernt und anschließend das Gehirn mit der so entstandenen geraden Standfläche auf den Metallblock geklebt.

### *Horizontalschnitte*

Zur Präparation horizontaler Schnitte wurde das Cerebellum entfernt, das Gehirn entlang des Interhemisphärenspalts geteilt und die dorsalen Kortexabschnitte abgeschnitten. Die beiden Hemisphären wurden dann mit den rostralen Hirnanteilen nach oben auf den Metallblock befestigt.

### *Thalamokortikales Schnittpräparat*

Um die morphologischen Strukturen, sowie die verbindenden Fasern zwischen ventrobasalen Nucleus des Thalamus und des sog. *Barrel*-Kortex zu erhalten, wurde die von Agmon und Connors erstbeschriebene Präparation angewandt (Agmon und Connors 1991). Das Gehirn wird mit der Basis nach unten platziert, eine Rasierklinge im Bezug zur sagittalen Mittellinie um 55° rotiert und um 10° in der Horizontalebene geneigt. Mit der so entstandenen Schnittfläche wird das Gehirn auf einen Metallblock geklebt. Die Schnitt- und Klebefläche wurde so durch 2 Winkel mit unterschiedlichen Achsen definiert.

In allen Präparationen wurde der Metallblock anschließend in ein mit eisgekühlter und Carbogen-gesättigter ACSF gefülltes Schneidegefäß gelegt. Mit einem Vibratom (HM 650 V, Microm International, Walldorf, Deutschland) wurden 300 µm, 350 µm bzw. 450 µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Die vitalen Hirnschnitte wurden in ein Inkubationsgefäß mit Carbogen-gesättigter ACSF (Zusammensetzung (mM): NaCl 125; KCl 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25; MgCl<sub>2</sub> 1; Glucose 25; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub> 2; pH 7,35) überführt und 30 Minuten bei 34°C inkubiert. Anschließend wurden sie bis zur Überführung in die Ableitkammer bei Raumtemperatur (22–24°C) unter ständiger Zufuhr von Carbogengas aufbewahrt.

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Verwendete Zelllinie**

Die stabil transfizierte mHCN2 HEK-Zelllinie stellte Prof. Dr. M. Biel von der Ludwig-Maximilians-Universität München (Department Pharmazie; Pharmakologie der Naturwissenschaften) zur Verfügung.

### 2.2.2 Nährmedium

#### *Minimum essential medium (MEM-Medium)*

Für das Wachstum von Säugetierzellen ist das MEM-Medium (Gibco) sehr gut geeignet, da es Aminosäuren, Glucose, Vitamine und Mineralien enthält (Eagle 1959) und somit die *in vitro* Kulturbedingungen den *in vivo* herrschenden so weit wie möglich angeglichen sind. Das verwendete Medium enthält L-Glutamin in einer stabilisierten Form als Dipeptid (L-Alanin-L-Glutamin; Glutamax<sup>TM</sup>; Gibco; Darmstadt; Deutschland). Vor Gebrauch wurden dem Medium 50 ml FCS (fetales Kälberserum; Biochrom) zugesetzt, um die Versorgung mit Wachstumsfaktoren, Hormonen, Anheftungsfaktoren u.a. zu gewährleisten. Das Wachstum von Bakterien wurde durch Zugabe einer Mischung aus Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml; Biochrom) unterdrückt.

#### *Selektionsmedium*

Für die Selektionierung und anschließende Kultivierung von Zellen, die durch das Gen für Aminoglycosid-Phosphotransferase (APH-Gen vom Transposon Tn 5 aus E.coli, Southern et al. 1982) eine entsprechende Resistenz tragen (Neo-Resistenzgen), wurde Geneticin (G418; Biochrom AG; Berlin Deutschland) eingesetzt (Selektion: 400 µg/ml; Kultur: 200 µg/ml). Dieses Antibiotikum ist auch für Eukaryoten toxisch, da es durch Bindung an die 80S-Ribosomen die Proteinbiosynthese hemmt

### 2.2.3 Kultur

Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (LaminAir HB2472; Heraeus Instruments GmbH; Düsseldorf; Deutschland) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Medien und Standard-Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Kultivierung der Zellen fand in 12 cm<sup>2</sup> Petrischalen (TPP; Trasadingen, Schweiz) in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> statt. Bei Erreichen einer Konfluenz von maximal 70 %, was einem Zeitraum von 2-3 Tagen entsprach, wurden die Zellen in neue Schalen subkultiviert (*splitting*). Dazu wurden die Zellen, nach einem Waschschrift mit PBS, durch Trypsinisierung (EDTA-Trypsin-Lösung, 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) vom Boden der Petrischale abgelöst, in Medium resuspendiert, vereinzelt und im Verhältnis von 1:10 passagiert. Alle 4 Wochen wurde ein neuer Gefrierstock aufgetaut (Lagerung -80°C) und in Kultur genommen.

## **2.2.4 Poly-L-Lysin Beschichtung**

Die Kultivierung der Zellen für die Patch-Clamp-Messungen erfolgte auf Deckgläschen (24 x 55 mm). Um die Anheftung der verwendeten Zellen auf den Deckgläschen zu verbessern, wurden diese zunächst mit Poly-L-Lysin-hydrobromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Schnelldorf; Deutschland) beschichtet. Nach 24 stündiger Reinigung der Deckgläschen mit Chloroform und 80 % Ethanol wurden diese im Trockenschrank getrocknet. Die Deckgläschen wurden mit 100 µl (1 µg/ml) Poly-L-Lysin-hydrobromid bedeckt und 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden diese nach Absaugen der Lösung mit Aqua bidest gewaschen und in jedes Well  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Die Messung erfolgte 24 h nach der Subkultivierung.

## **2.3 Elektrophysiologische Methoden**

### **2.3.1 Versuchsaufbau**

In einer Ableitkammer wurde das Präparat, entweder ein Gehirnschnitt oder ein mit stabil transfizierten HEK293-Zellen bestücktes Deckglässchen, platziert. Um Bewegungen des Schnittpräparates aufgrund von Strömungen durch die Lösungsperfusion zu verhindern, wurden die Schnitte mit einem U-förmigen Platindraht und darüber gespannten Nylonfäden fixiert. Das Infrarot-Mikroskop war mit einem System motorisierter Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) ausgestattet, wodurch das Mikroskop, die Ableitkammer und die Patch-Pipette unabhängig voneinander in alle drei Raumrichtungen bewegt werden konnten. Versuchskammer, Mikroskop und Mikromanipulatoren waren auf einem mit Druckluft schwingungsgedämpften Tisch befestigt. Zusätzlich wurde der Messstand zur elektrischen Abschirmung mit einem Faraday'schen Käfig umgeben und geerdet. Das Präparat wurde während der gesamten Dauer des Versuches mit ACSF perfundiert, welches unter Kontrollbedingungen mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> gesättigt war. Die Rezirkulation und kontinuierliche Sättigung der ACSF lieferte eine ausreichende Versorgung der Präparate mit Sauerstoff. Die Flussrate betrug 0,3-0,5 l/min. Nachdem die Amplitude und die Kinetik der gemessenen Stromantworten mindestens 15 Minuten stabil waren, wurde zur Xenonapplikation die ACSF mit 65 % Xenon gesättigt. 15-30 Minuten nach Beginn des Xenon-Einwaschs wurde die Xenonapplikation beendet (Auswasch). Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Hypoxietoleranz der vitalen Schnitte und der stabil transfizierten Zellen zu vergrößern.

### **2.3.2 Konzentrationsbestimmung des Anästhetikums Xenon**

Mithilfe der Gaschromatographie (Fa. RCC Ltd. Itingen, Schweiz) wurde die gelöste Xenonkonzentration in einer mit (65 % Xe / 30 % O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) gesättigten Extrazellulär-

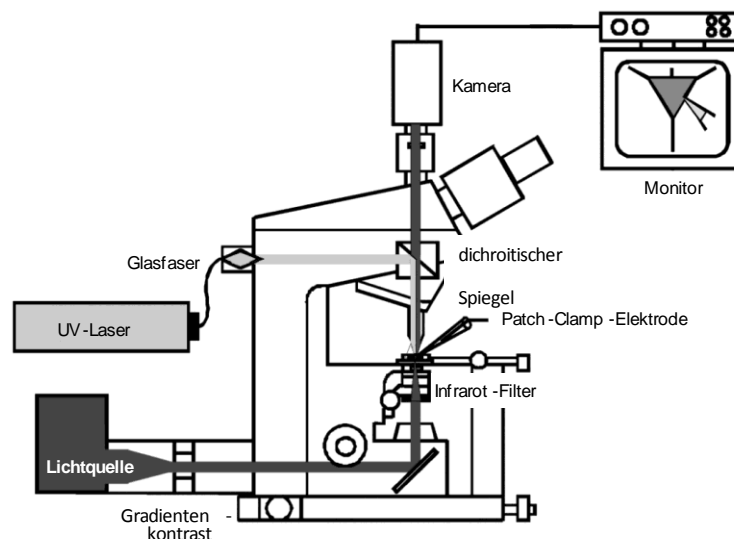
flüssigkeit (ACSF) auf  $1,9 \pm 0,5$  mM bestimmt. Nach 5 Minuten Begasungszeit wurde die Sättigung erreicht.

### 2.3.3 Bildgebendes Verfahren

Die Methodik der Infrarot-gelenkten Photostimulation ist eine Kombination aus Infrarot-Videomikroskopie und Photostimulation. Mit dieser Technik können an einzelnen visualisierten Neuronen u.a. Neurotransmitter photolytisch freigesetzt werden. Diese Methodik ist sehr gut geeignet, um synaptische Transmissionsvorgänge in neuronalen Netzwerken zu untersuchen (Dodt et al. 2002), da sie eine sehr große räumliche und zeitliche Auflösung besitzt.

#### 2.3.3.1 Infrarot-Videomikroskopie

Zur Visualisierung der Neuronen im ungefärbten Schnitt diente eine von Dodt und Zieglgansberger (Dodt und Zieglgansberger 1990; Stuart et al. 1993) entwickelte Technik der Infrarot (IR)-Videomikroskopie. Grundlegend beruht diese Technik darauf, dass langwelligeres Licht biologisches Gewebe leichter durchdringt als sichtbares Licht (MacVicar 1984). Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde mit IR-Licht der Wellenlänge 780 nm gearbeitet, da hier die besten Resultate zu erreichen sind (Dodt und Zieglgansberger 1994). Eine bessere Bildgebung wurde durch den Einsatz einer in die Videokamera eingebauten Kontrastverstärkung und des Gradientenkontrast (GC)-Verfahrens erreicht (Dodt und Zieglgansberger 1998). Mit Hilfe des GC-Verfahrens können Streulicht minimiert und Beleuchtungsgradienten in zwei orthogonalen Richtungen erzeugt werden.



**Abb. 2.3.1: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops mit IR-gelenkter Photostimulation**

Mit Hilfe der Infrarot-Phasen-Kontrast-verstärkten Videomikroskopie können Neurone innerhalb eines Hirnschnittpräparates visualisiert werden. Der Hirnschnitt wird von unten mit Schräglicht im langwelligigen Infrarotbereich, welches der Gradientenkontrast und Infrarotfilter erzeugen, durchstrahlt.

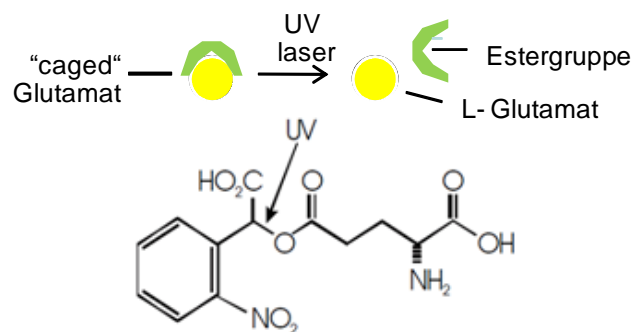


Über eine Kamera wird das Bild auf einem Monitor dargestellt. Gleichzeitig wird ein Laserimpuls über eine Quarzfasern in das Mikroskop geleitet und durch einen dichroitischen Spiegel und das Objektiv auf das abgeleitete Neuron fokussiert (Abb. verändert nach Dodt et al. 2002).

Ein Infrarot-Interferenzfilter positioniert zwischen Halogenlampe und Kondensator ermöglichte, dass IR-Licht mit einer Wellenlänge von 780 nm in den Strahlengang des Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gelangt. Das Mikroskop war mit einem 60-fach vergrößernden Wasser-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgestattet. Mit Hilfe einer zweifachen Vergrößerung der Streulinse (Barlow-Linse) wird das Bild auf einer infrarotsensitiven Videokamera abgebildet (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan).

### 2.3.3.2 Laser-Photostimulation

Durch eine Veresterung werden biologische Substanzen (sog. „caged“-Verbindungen) inaktiviert und können durch Laser-Photostimulation spezifisch aktiviert werden. Ultraviolettes (UV)-Licht spaltet die kovalente Esterbindung und die biologisch aktive Substanz wird wie in Abb. 2.3.2 dargestellt freigesetzt. Mit dieser Technik lässt sich ein sofortiger Konzentrationsanstieg von Neurotransmittern im synaptischen Spalt hervorrufen (MacVicar 1984; Adams und Tsien 1993). Durch Fokussierung des UV-Lichts kann die räumliche Ausbreitung der bioaktiven Substanz begrenzt werden und damit einzelne definierte Neurone oder kleinere neuronale Bereiche gezielt pharmakologisch manipuliert werden.



**Abb. 2.3.2: Schematische Darstellung der Laser-Photostimulation von CNB-caged-Glutamat**

Der Neurotransmitter ist durch eine Veresterung inaktiviert. Durch einen UV-Laserimpuls (Pfeil) wird die Esterbindung gespalten und das biologisch wirksame Glutamat kann an die glutamatergen Rezeptoren binden und diese aktivieren. (Abb. verändert nach Kramer 2005).

Für die Experimente dieser Arbeit wurde zur photolytischen Spaltung von „caged“-Glutamat ein UV-Laser (Nd:YVO<sub>4</sub>, 100 kHz Pulswiederholrate; DPSS Lasers, San Jose, USA) verwendet. Über eine Quarzfasern mit einem Durchmesser von 25 µm wurde die UV-Strahlung in den Strahlengang des Mikroskops geleitet und mithilfe eines dichroitischen

Strahlenteilers (FT 460 nm) von oben in das Objektiv eingespiegelt. Das emittierte Licht des Lasers besaß eine Wellenlänge von 355 nm. Dieses Licht wurde in der Fokalebene gebündelt, nachdem der Lichtstrahl in den Brennpunkt des Objektivs geleitet wurde. Der entstandene Lichtpunkt hatte einen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$ . Zur Bestimmung eines definierten Bereichs, den der Laser bei der photolytischen Stimulation ausleuchtet, wurde der Lichtpunkt vor jedem Experiment neu justiert. Die Lichtleistung des Lasers in den durchgeführten Experimenten lag zwischen 50–100 mW, welche über einen Polarisationsfilter variiert werden konnte. Die Dauer des Lichtpulses und die Öffnung eines zwischen Laser und Mikroskop geschalteten Shutters wurde über einen Computer mit entsprechender Software (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) und einen AD-Wandler gesteuert.

In dieser Arbeit wurde  $\gamma$ -( $\alpha$ -Carboxy-2-nitrobenzyl) ester, trifluoroacetic acid salt ( $\gamma$ -(CNB-caged) L-Glutamat; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet. CNB-caged-Glutamat ist äußerst inert und zeigt keinen Einfluss auf elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone (Schubert et al. 2001). Desweiteren werden glutamaterge Rezeptoren nicht durch spontane Hydrolyse des CNB-caged-Glutamat desensitiviert (Eder et al. 2002). Bei ausreichender Beleuchtung mit UV-Licht wird physiologisch aktives Glutamat innerhalb von 21  $\mu\text{s}$  zu 90 % mit einer Quantenausbeute von 14 % freigesetzt (Wieboldt et al. 1994). Vorteil der CNB-Gruppe gegenüber anderen „caged-Verbindungen“ sind eine höhere Wasserlöslichkeit und ein höhere „uncaging“ Rate.

#### **2.3.4 Ganzzelleableitung**

Durch die Entwicklung der sogenannten Patch-Clamp-Technik, die zum ersten Mal von Neher und Sackmann (1976) beschrieben und in den folgenden Jahren weiterentwickelt und verfeinert wurde (Hamill et al. 1981; Sakmann und Neher 1984), ist es möglich, kleine Ströme durch die Ionenkanäle der Zellmembran darzustellen und zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Technik wurden hippocampale und thalamokortikale Neurone abgeleitet. Im Unterschied zur klassischen intrazellulären Ableitung mit 2 Messelektroden können auch wesentlich kleinere Zellen abgeleitet werden und kleinere Ströme sind aufgrund des hohen Abdichtungswiderstands, der im Bereich von  $\text{G}\Omega$  („giga-seal“) liegt, auflösbar. Bei dieser Methode ist es auch möglich, die elektrische Aktivität der gesamten Zelle in der sogenannten „Whole-Cell“-Konfiguration (Ganzzelleableitung) zu messen (Blanton et al. 1989). Desweiteren können der Pipettenlösung Pharmaka zugesetzt werden, welche gezielt intrazelluläre Ionenkanäle modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten alle Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzelleableitung.

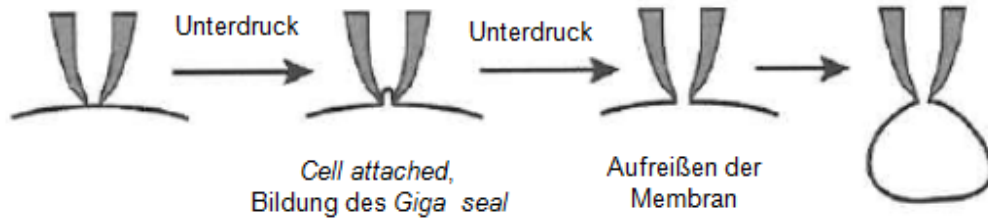
#### 2.3.4.1 Pipetten

Die Pipetten wurden aus dünnwandigen Borosilikatglas-Kapillaren (Hugo-Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz, Martinsried, Deutschland) angefertigt und hitzepoliert. Die Kapillaren besaßen einen Innendurchmesser von 1,17 mm und einen Außendurchmesser von 1,5 mm. Die Parameter für den Ziehvorgang wurden so eingestellt, dass der Spitzendurchmesser ungefähr 1 µm entsprach und damit der Gleichstromwiderstand der gefüllten Pipetten 4-7 MΩ betrug. Die Bestimmung des Pipettenwiderstandes erfolgte jeweils nach Eintauchen der Pipette in ACSF. Die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung variierte in Abhängigkeit der unterschiedlichen Experimentserien. Eine detaillierte Liste ist im Anhang aufgeführt. Nach dem Befüllen der Pipette mit Intrazellulärlösung wurde diese in einem Pipettenhalter befestigt. Eine Silber/Silberchlorid-Elektrode mit einem Durchmesser von 0,25 mm diente als direkte Verbindung zwischen der intrazellulären Lösung und dem Verstärker. Die verwendete Bad- oder Referenzelektrode war ein Pellet Ag/AgCl-Draht (Pellet-Durchmesser 2mm; Ag/AgCl-Elektrode mit Pellet, Scienc Products), der dem Schluss des Stromkreises beim Eintauchen in die Badlösung und der Erdung diente. Pipettenhalter und Vorverstärker waren auf einem in allen Raumrichtungen beweglichen, elektrisch-betriebenen Mikromanipulator (Luigs & Neumann) befestigt, der über ein externes Steuerelement (SMI, Luigs & Neumann) bewegt werden konnte.

#### 2.3.4.2 Etablierung der Ganzzelleableitung

Die Ableitung der Neurone erfolgte in der „Whole-Cell“-Konfiguration (Ganzzelleableitung) entweder im Brücken- oder im „Voltage-Clamp“-Modus. Über den chlorierten Silberdraht war die Patchpipette mit dem Patch-Clamp-Verstärker (SEC 10L, NPI electronic, Tamm, Deutschland) verbunden. Nach Auswahl geeigneter Neurone wurde Überdruck an die mit Intrazellulärlösung gefüllte Pipette gelegt. Dies diente zum einem dazu, mögliche Verunreinigungen der Pipettenspitze zu verhindern und zum anderen dazu, in Schnittpräparaten die zu untersuchende Zelle von umliegendem Gewebe zu säubern, da nur mit einer sauberen Pipettenspitze und Zelloberfläche ein stabiler Giga-Seal erreicht werden konnte. Zur Herstellung der Ganzzelleableitung wurde die Pipette vorsichtig unter visueller Kontrolle dem Zellsoma angenähert. Im Brücken-Modus (Wheatstone'sche Brücke) wurden der Widerstand und die Kapazität der Pipette abgeglichen sowie auftretende Offsetpotentiale und das Übergangspotential („liquid junction“ Potential) korrigiert. Unmittelbar vor der Zellmembran wurde der Überdruck abgelassen und durch einen langsam stärker werdenden Unterdruck zunächst die „Cell-attached“-Konfiguration hergestellt. Durch den Unterdruck wurde die Zellmembran in die Pipettenöffnung eingestülpt und es bildete sich ein Gigaseal aus. Die Ausbildung des Seals und der „cell-attached“-Konfiguration wurde anhand der Änderung der Stromantwort auf einen Testpuls verfolgt und durch Anlegen einer Spannung

unterstützt. Anschließend wurde die Membran unter der Pipettenöffnung mit einem kurzen, stärkeren Sog durchbrochen und somit die „Whole-Cell“-Konfiguration hergestellt. Die Herstellung einer Ganzzelleableitung ist in Abb.2.3.3 schematisch dargestellt.

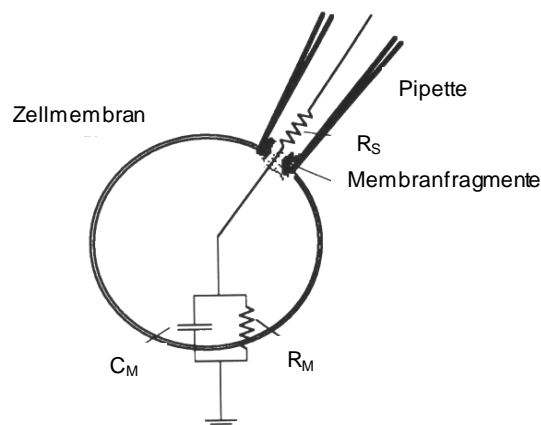


**Abb. 2.3.3: Die „Whole-cell“ Konfiguration der Patch-Clamp-Technik**

Abgebildet sind jeweils Zellmembran und Pipettenspitze. Die Pipette wird an die Membran aufgesetzt und durch Anlegen eines Unterdrucks kommt es zur „cell-attached“ Konfiguration. Durch Erhöhung des Unterdrucks kommt es zum Einreißen der Membran unter der Pipettenspitze und folglich zur Ganzzelleableitung (Abb. verändert nach Hamill et al. 1981).

Da nach Membrandurchbruch nicht nur der Bereich unter der Pipette, sondern die gesamte Membran umgeladen wurde, änderte sich die Stromantwort auf den Testpuls und die kapazitiven Ströme nahmen zu. Das Zellinnere ist somit leitend mit der Pipette verbunden. Die Verbindung zwischen Silberdraht und Zellsoma wird durch den Serienwiderstand ( $R_s$ ) beeinflusst.

Die Membran trennt die extrazelluläre von der intrazellulären Flüssigkeit durch eine etwa 3-9 nm dünne hydrophobe Schicht, die als Isolierung zwischen 2 Leitern (Intra- und extrazelluläre Salzlösung) einen Kondensator bildet. Außerdem wird über die Ladungstrennung (insbesondere  $K^+$ ) über der Membran das Ruhemembranpotential festgelegt. Die Membran ist somit ein Kondensator mit einer bestimmten Kapazität ( $C_M$ ). Zusätzlich hat sie einen parallelen Widerstand ( $R_M$ ; Membranwiderstand), mit dem der Serienwiderstand ( $R_s$ ) in Reihe geschaltet ist (Abb. 2.3.4).



**Abb. 2.3.4: Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung**

Nach Durchbrechen der Membran erhält man die „Whole-cell“-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettenmündung angesaugt, was den Serienwiderstand  $R_S$  erhöht.  $R_M$  Membranwiderstand,  $C_M$  Membrankapazität (Abb. verändert nach Numberger M 1996).

Die Stromantworten der Ganzzelleitungen wurden verstärkt, mit einem Tiefpass-Filter gefiltert (3 kHz) und danach mit einer Abtast-Frequenz von 9 kHz digitalisiert (ITC-16 Computer Interface, Instrutech Corp., Port Washington, USA).

### 2.3.4.3 Elektrische und photolytische Stimulation

Die Messung postsynaptischer Ströme erfolgte durch zwei unterschiedliche Stimulationsarten. Neurone wurden elektrisch und / oder photolytisch stimuliert.

Die elektrische Stimulation erfolgte mit einer bipolaren, konzentrischen Stimulationselektrode aus Wolfram (Außendurchmesser 200  $\mu\text{m}$ , Innendurchmesser 100  $\mu\text{m}$ , SNEX-100X, Hugo-Sachs-Elektronik -Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland). Im Hippocampus wurden CA1-Pyramidenneurone durch Stimulation der Schaffer-Kollateralen erregt, wohingegen im ventrobasalen Thalamus die Stimulation der TC-Neurone an der inneren Kapsel erfolgte. Die Stimulationselektrode wurde mit Mikromanipulatoren vorsichtig auf den Schnitt aufgelegt, so dass der abgeleiteten Zelle vorgeschaltete Axone stimuliert werden konnten. Der Stimulator, welcher mit der Stimulationselektrode verbunden war, konnte über die Aufzeichnungssoftware (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland) getriggert werden. Die Stimulationsintensität (0,1-100V) sowie die Dauer des Strompulses (0,05-0,5 ms) wurden am Stimulator individuell für jedes Experiment eingestellt.

Die photolytische Stimulation erfolgte nach Herstellung der Ganzzelleitung durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  CNB-caged-Glutamat zur ACSF. Der Laserpunkt wurde auf den Dendriten der abgeleiteten Zelle gerichtet und die Laserintensität so eingestellt, dass eine Stromantwort von 50-200 pA abgeleitet werden konnte.

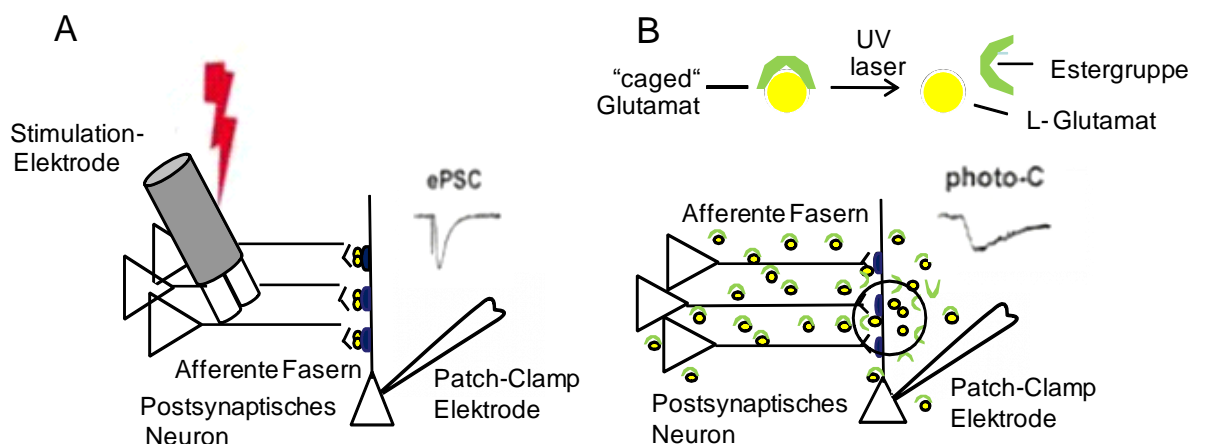


Abb. 2.3.5: Schematische Darstellung der zwei unterschiedlichen Stimulationsarten

**A:** Die elektrische Stimulation erfolgte durch Aufsetzen der Stimulationselektrode auf die zu stimulierende Struktur im Gehirn. Dadurch werden postsynaptische Ströme ausgelöst (ePSC) **B:** Die photolytische Stimulation erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  „caged-Glutamat“ zur ACSF. Durch einen Laserpuls wird das Glutamat aktiviert und löst Stromantworten aus (photo-C).

### 2.3.5 Messprotokolle

#### *Ableitungen im „Voltage-Clamp“-Modus*

Bei der Whole-Cell-Ableitung im „Voltage-Clamp“-Verfahren wird das Membranpotential der Zelle durch ein gewähltes Haltepotential ( $U_{\text{soll}}$ ) vorgegeben. Der verwendete Verstärker arbeitet nach dem Prinzip des „discontinuous single electrode voltage clamp“ (dSEVC) Verfahren und misst mit einer voreingestellten Frequenz von 60-80 Hz alternierend über die Messelektrode das aktuelle Membranpotential. Um die gemessene Differenz zur Sollspannung auszugleichen, wird anschließend Kompensationsstrom appliziert.

#### *Ableitungen im „Current-Clamp“-Modus*

In der „Current-Clamp“-Messung kann der Strom, der durch die Pipettenelektrode fließt, genau vorgegeben werden. Gemessen wird das entsprechende Potential zwischen Pipette und Badelektrode. Diese Konfiguration wird zum einem dazu verwendet, den spontanen zeitlichen Verlauf des Membranpotentials eines Neurons zu registrieren, zum anderen, um Potentialänderungen eines Neurons nach Strominjektion zu verfolgen.

#### *Ableitungen im „Voltage-controlled-Current-Clamp“-Modus*

Im „Voltage-controlled-Current-Clamp“ (VCcCC)-Modus können genaue „Current-clamp“-Messungen bei einem gewählten Haltepotential durchgeführt werden. Der Verstärker kontrolliert exakt das Membranpotential ohne schnelle postsynaptische Potentiale und Aktionspotentiale zu beeinflussen.

#### 2.3.5.1 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

##### *NMDA- Rezeptor vermittelte Ströme (EPSC)*

Der glutamaterge NMDA-Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der synaptischen Transmission und der synaptischen Plastizität spielt, besteht aus der essentiellen NR1 Untereinheit und 4 Isoformen der NR2- (A-D) Untereinheiten (Hollmann et al. 1994). NMDA-Rezeptoren sind synaptisch und extrasynaptisch an der Membran lokalisiert. Im Hippocampus setzt sich der NMDA-Rezeptor in Jungtieren aus einer Kombination aus NR1- mit NR2B Heterodimeren zusammen (Flint et al. 1997; Kew und Kemp 1998; Tovar und Westbrook 1999), wohingegen innerhalb der synaptischen Verbindungen die Expression der NR2A Untereinheit postnatal nach 6-10 Tagen hochreguliert wird. Dieses Expressionsmuster deutet darauf hin, dass NMDA-Rezeptoren, die eine NR2A Untereinheit enthalten synaptisch

lokalisiert sind, wohingegen NR2B enthaltende Rezeptoren hauptsächlich in extrasynaptischen Bereichen zu finden sind (Thomas et al. 2006).

Durch Zugabe spezifischer Antagonisten wurden NMDA-Rezeptor Stromantworten unabhängig von der Stimulationsart und der zu untersuchenden Region isoliert. NMDA EPSC (excitatory postsynaptic current) wurden in Gegenwart von 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulphonamide (NBQX; 5 $\mu$ M), p-(3-Amino-propyl)-P-diethoxymethylphosphinsäure (CGP35348; 200 $\mu$ M) und Bicucullin Methiodid (20 $\mu$ M) bei einem Haltepotential von -30 mV gemessen.

Die Aktivierung der extrasynaptisch lokalisierten NMDA-Rezeptoren erfolgte durch Zugabe von DL-TBOA (30  $\mu$ M), einem Inhibitor des Glutamat-Transporters. Glutamat wird nicht mehr abtransportiert und verbleibt länger im synaptischen Spalt, wodurch eine Diffusion zu den extrasynaptischen Bereichen möglich wird (sog. „spillover“).

Zu der Überprüfung der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, die die NR2B Untereinheit enthalten und somit höchstwahrscheinlich extrasynaptisch lokalisiert sind durch DL-TBOA (30 $\mu$ M), wurde der selektive NR2B-Antagonist Ro 25-6981 (1  $\mu$ M) (Fischer et al. 1997) eingewaschen. Anschließend wurde die Reduktion der Stromantworten in An- und Abwesenheit von DL-TBOA verglichen.

#### *AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme (EPSC)*

Zur Gruppe der nonNMDA-Glutamat-Rezeptoren gehören AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Kainat-Rezeptor vermittelte Ionenströme scheinen jedoch nur eine geringe Rolle bei der Vermittlung von nonNMDA-EPSC zu spielen, denn durch Zugabe des selektiven AMPA-Rezeptor-Antagonisten GYKI 52466 (Ouardouz und Durand 1991) wird der zuvor gemessene nonNMDA EPSC vollkommen blockiert. Im folgendem wird daher von AMPA EPSC gesprochen. AMPA-Rezeptor Stromantworten wurden durch Zugabe von D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure (AP5; 50  $\mu$ M), CGP35348 und Bicucullin Methiodid bei einem Haltepotential von -70 mV gemessen.

#### *GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Ströme (IPSC)*

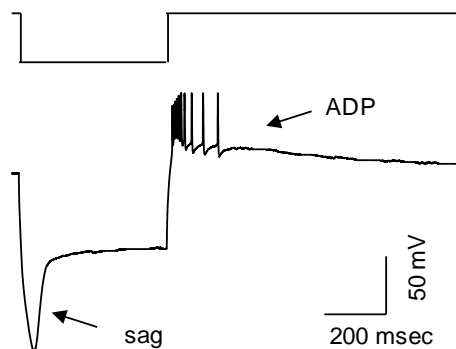
Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist der wichtigste inhibitorische Rezeptor, welcher für Chlorid- und Bicarbonationen durchlässig ist. Durch die Zugabe AP5, NBQX und CGP35348 wurden elektrisch induzierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Stromantworten bei einem Haltepotential von -50 mV isoliert.

#### *2.3.5.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle*

Die Zusammensetzung der Extrazellulär- und Intrazellulärlösung ist im Anhang detailliert dargestellt.

### Charakterisierung thalamokortikaler Schaltneurone

Die Charakterisierung der TC-Neurone erfolgte im „Current-Clamp“-Modus. Die Applikation eines Hyperpolarisationspulses von mindestens -200 pA und einer Dauer von 500 ms aktivierte einen charakteristischen langsamen, einwärts gerichteten Kationenstrom (sog. „sag“) (Ying et al. 2006). Zusätzlich entsteht durch die Repolarisation eine Salve von Aktionspotentialen (sog. „Rebound-Burst“), der eine lange Nachdepolarisation (ADP) folgt (Abb. 2.3.6). Über diese elektrophysiologische Eigenschaften können TC-Neurone identifiziert werden.

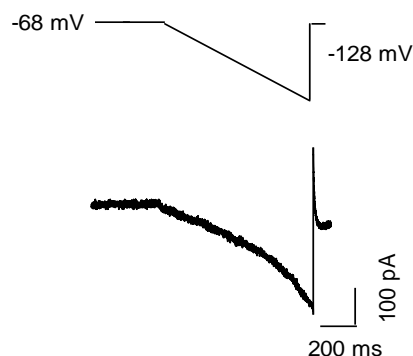


**Abb. 2.3.6: Spannungsprotokoll zur Charakterisierung TC-Neuronen**

Applikation eines Hyperpolarisationspulses von -200 pA über eine Dauer von 500 ms aktivierte einen einwärtsgerichteten Kationen-Strom, der einen charakteristischen Sag ausbildet. Weitere charakteristische Eigenschaften stellen eine Salve von Aktionspotentialen („Rebound-Burst“) und eine darauffolgende Nachdepolarisation (ADP) dar.

### $K_2P$ - Kanäle

Bei physiologischen Membranpotentialen zeigen TC-Neurone einen anhaltenden Auswärtsstrom ( $K^+$ -Hintergrundstrom,  $I_{K_{so}}$ ). Der Auswärtsstrom  $I_{task}$  (TWIK-related-acid-sensitiv current) ist zu 49 % an diesem sogenannten Hintergrundstrom beteiligt (Meuth et al. 2006). Die elektrophysiologischen Messungen wurden im „Voltage-Clamp“-Modus durchgeführt.



**Abb. 2.3.7: Spannungsprotokoll  $I_{task}$**

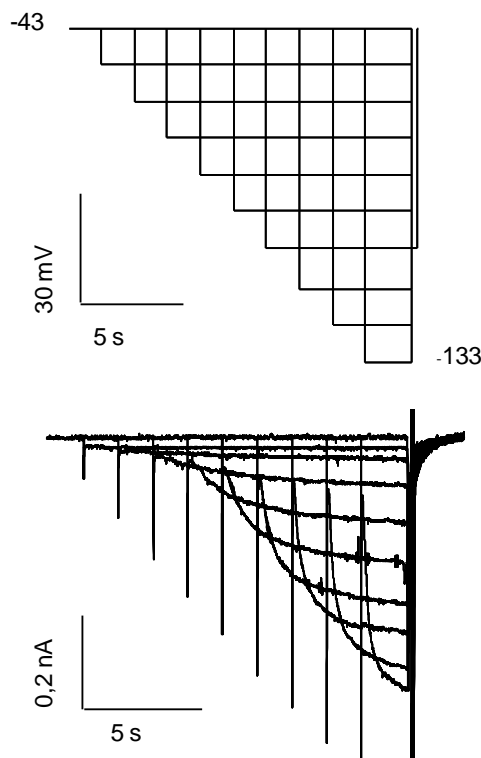


Ausgehend von einem Haltepotential von -68 mV schloss sich eine Spannungsrampe von -68 mV nach -128 mV innerhalb von 800 ms an. Abschließend sprang das Potential für 100 ms zurück auf -68 mV.

In Abb.2.3.7 ist eine Spannungsrampe abgebildet. Die Zelle wird von einem Haltepotential -68 mV innerhalb von 800 ms nach -128 mV hyperpolarisiert. Dadurch kam es zur Abnahme des Auswärtsstrom, bis das Umkehrpotential erreicht wurde und sich ein charakteristischer Einwärtsstrom anschloss.

### HCN-Kanal

Das folgende Spannungsprotokoll des Hyperpolarisations-aktivierten Kationenstroms  $I_h$  wurde sowohl für Messungen in HEK-Zellen wie auch in Gewebeschnitten verwendet. Um die funktionellen Eigenschaften des  $I_h$ -Stroms zu charakterisieren, wie z.B. die Bestimmung der Aktivierungskinetik, wurden „Voltage-Clamp“ – Experimente durchgeführt.



**Abb. 2.3.8: Spannungsprotokoll  $I_h$**

$I_h$  wurde durch Spannungssprünge von -43 mV in hyperpolarisierender Richtung bis -133 mV ( $\Delta$  mV = 10) aktiviert. Durch die zunehmende Aktivierungskinetik wurde die Pulslänge um 500 ms mit zunehmender Hyperpolarisation verkürzt, um die Stabilität der Ganzzelleableitung zu verbessern. Nach jedem Spannungsschritt wurde die Zelle auf -103 mV geklemmt.

Die Aktivierung des  $I_h$  erfolgte durch Spannungssprünge von -43 mV mit zunehmender Hyperpolarisation ( $\Delta$  mV = 10) bis -133 mV. Mit zunehmender Hyperpolarisation wurde die Pulslänge um 500 ms verkürzt. Diese Verkürzung förderte die Stabilität der Ableitung und beeinträchtigte die immer schneller werdende Aktivierungskinetik nicht. Der

Spannungsschritt auf -103 mV nach jedem Spannungssprung spiegelt den  $I_{Tail}$  wieder. Anhand der Amplituden der „Tail-Ströme“ ist es möglich, den Anteil der geöffneten Kanäle und damit die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu bestimmen. Aus der Spannungsabhängigkeit der „Tail“-Ströme erhält man durch eine Normalisierung die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, die zu diesem Zeitpunkt bei der jeweiligen Membranspannung geöffnet waren (Budde et al. 2008). Messungen von  $I_h$  erfolgten in Anwesenheit von  $150 \mu\text{M Ba}^{2+}$ , um den einwärtsgerichteten Kationenstrom  $K_{IR}$  zu inhibieren. Untersuchungen zur cAMP- Abhängigkeit wurden mit  $30 \mu\text{M cAMP}$  in der Intrazellulärlösung durchgeführt. Die Inhibition des  $I_h$  Strom erfolgte durch Zugabe von  $100 \mu\text{M ZD7288}$ .

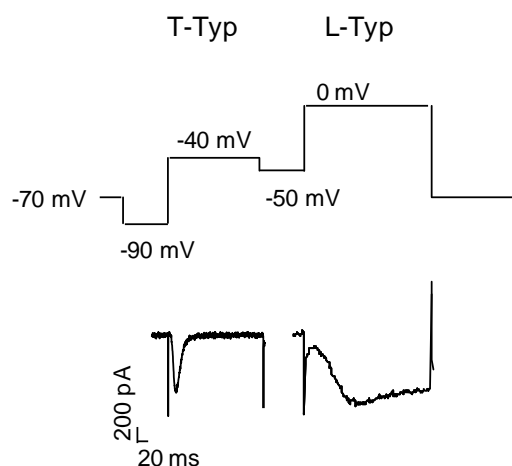
Untersuchungen zur Abhängigkeit der Adenylatzyklen wurden mit dem Adenylatzyklaseinhibitor SQ22536 ( $100 \mu\text{M}$ ) durchgeführt.

### *Kalziumkanal T-Typ und L-Typ*

In dieser Arbeit wurden spannungsabhängige L-Typ und T-Typ- Kalziumkanäle untersucht.

Im Hippocampus wurden unter Zugabe von Tetrodotoxin ( $1 \mu\text{M}$ ) spannungsabhängige Natriumkanäle, durch  $\omega$ -Agatoxin IVA ( $100 \text{ nM}$ ) spannungsabhängige Kalziumkanäle des Typs P- und Q, durch  $\omega$ -Conotoxin GVIA ( $1 \mu\text{M}$ ) N-Typ Kalziumkanäle und durch Nickel ( $50 \mu\text{M}$ ) T-Typ Kalziumkanäle blockiert und über den L-Typ Kalziumkanal vermittelte Ströme isoliert (Joksovic et al. 2007; Todorovic und Jevtovic-Todorovic 2007).

Im thalamokortikalen Netzwerk wurde der T-Typ-Kalziumstrom, der zur Untergruppe der LVA (low-voltage-activated) gehört und durch geringe Depolarisation aktiviert werden kann, untersucht. Zur Isolation wurden Tetrodotoxin ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\omega$ -Agatoxin IVA ( $100 \text{ nM}$ ),  $\omega$ -Conotoxin GVIA ( $1 \mu\text{M}$ ) und Nifedipin ( $5 \mu\text{M}$ ) verwendet (Meuth et al. 2006; Cueni et al. 2008). Die elektrophysiologischen Messungen wurden im „Voltage-Clamp“-Modus nach folgendem Spannungsprotokoll durchgeführt.



**Abb. 2.3.9: Spannungsprotokoll  $I_T$ ,  $I_L$**

Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV wurde das Membranpotential auf -90 mV hyperpolarisiert. Durch eine Depolarisation für 200 ms auf -40 mV wurden T-Typ-Kalziumkanäle aktiviert. Deren Inaktivierung erfolgte durch einen Spannungssprung auf -50 mV. Eine stärkere Depolarisation (0 mV) aktivierte L-Typ-Kalziumkanäle. Stromspuren wurden mithilfe des „Leak Subtraction P/4“-Protokolls analysiert. „Leak Subtraction“ filtert kapazitive Ströme heraus, die aus einem großen Spannungssprung resultieren und trennt spannungsabhängige Stromantworten von Hintergrundströmen.

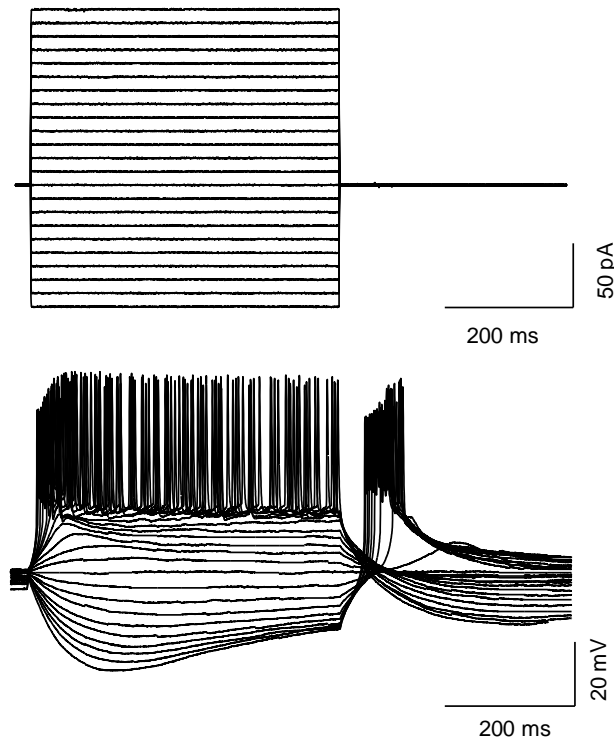
Für die Aktivierung der T-Typ- Kalziumkanäle war eine geringere Depolarisation durch einen Spannungsschritt von -90 mV auf -40 mV ausreichend. Die Deaktivierungszeit ist länger als bei den L-Typ- Kalziumkanälen, die zur Aktivierung eine stärkere Depolarisation benötigen. Um eine Kalzium-abhängige Desensitivierung der Kanäle und zytotoxische Effekte von Kalzium zu verhindern, wurden in der Extrazellulärlösung Kalzium-Ionen durch Barium-Ionen ersetzt.

#### *Hintergrund-Leckstrom („leak“ oder Hintergrundstrom)*

Die elektrophysiologischen Messungen des Leckstroms ( $I_{K_{so}}$  „standing outward current“) wurden im „Voltage-Clamp“-Modus durchgeführt. Der Hintergrundstrom setzt sich aus verschiedenen Einzelstromkomponenten zusammen und wird durch den Haltestrom widergespiegelt. Bei einem Haltepotential von -68 mV wurden sukzessiv die spezifischen Antagonisten für Natriumkanäle (Tetrodotoxin; 1  $\mu$ M), HCN-Kanäle (ZD7288; 100  $\mu$ M),  $K_{IR}$ -Kanäle ( $Ba^{2+}$ ; 150  $\mu$ M), Kaliumkanäle (Tetraethylammonium (TEA; 20 mM) und 4-Aminopyridine (4-AP; 6 mM) zugegeben und das Perfusionsmedium zuletzt zur Inhibition von TASK-Kanälen auf einen pH-Wert von 6,3 angesäuert (Meuth et al. 2006). Um die Amplitude des Leckstroms zu vergrößern, wurden die Experimente zusätzlich bei einem Haltepotential von -28 mV durchgeführt.

#### *Strom-Spannungsbeziehung*

Die Messung des Membranpotentials wurde im „Current-Clamp“-Modus in Abhängigkeit vom elektrischen Strom durchgeführt. Dabei wurden Strompulse mit einer Pulslänge von 500 ms, einer Stromstärke von -90 pA bis +130 pA in depolarisierender Richtung ( $\Delta I = 10$  pA) in einem Abstand von 2s appliziert.



**Abb. 2.3.10: Protokoll der Strom-Spannungsbeziehung**

Applikation rechteckiger Stromimpulse mit einer Stromstärke von -90 pA bis +130 pA ( $\Delta I = 10$  pA) für eine Pulslänge von 500 ms.

#### *Ruhemembranpotential*

Das Ruhemembranpotential wird über Ableseung am Verstärker im „Brücken“-Modus und / oder durch Auswertung der Spannung bei ausbleibender Strominjektion aus der IV-Kurve bestimmt.

### **2.3.6 Feldpotentiale**

#### *2.3.6.1 Prinzip der Feldpotentialmessungen und Versuchsaufbau*

Feldpotentiale sind extrazelluläre Spannungsänderungen, die durch die Aktivität einer Population von Neuronen zustande kommt. Eingehende exzitatorische postsynaptische Potentiale (fEPSPs) stellen am Dendriten einen Kationen-Einstrom und damit einen extrazellulären Verlust positiver Ladungen dar. Bei einer dendritischen Positionierung der Ableitelektrode ist diese extrazelluläre Ladungsverschiebung deshalb im Feld als ein negativer Ausschlag detektierbar und man spricht von einer aktiven Senke („active sink“). Am Soma entsteht dann eine passive Quelle („passive source“), was an der Elektrode als positive Auslenkung gemessen werden kann. Das fEPSP reflektiert postsynaptische Erregungsabläufe und damit die eigentliche synaptische Transmission.

Zur Ableitung von fEPSPs wurde das Hirnschnittpräparat in der Ableitkammer platziert und mithilfe eines Grids fixiert. Das Präparat wurde während der gesamten Dauer eines

Versuches mit ACSF perfundiert, welches unter Kontrollbedingungen mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> gesättigt war. Durch Rezirkulation und kontinuierliche Sättigung der ACSF wurde eine ausreichende Versorgung der Präparate mit Sauerstoff gewährleistet. Nachdem die Amplitude und die Steigung der gemessenen fEPSPs mindestens 15 Minuten stabil waren, wurde die ACSF mit 65 % Xenon gesättigt. Nach 15-30 Minuten wurde das Xenon-Gasgemisch ausgewaschen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### *2.3.6.2 Durchführung der Messung*

Im Hippocampus wurden die Feldpotentiale in der CA1 Region im Stratum radiatum mit Borosilikat - Glasspipetten (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, United Kingdom) abgeleitet. Die Ableitelektrode wurde mit ACSF befüllt und an einem Mikromanipulator befestigt. Durch kontrolliertes Abbrechen der Elektrodenspitze wurde der Gleichstromwiderstand auf 1-2 MΩ reduziert. Positioniert wurde die Ableitelektrode in der apikal gelegenen, dendritischen Zone von hippocampalen CA1 Pyramidenzellen. Die an der Elektrode anliegenden Signale wurden mit Hilfe eines Axopatch 200B Patch-Clamp-Verstärker (Axon Instruments) erfasst und routinemäßig mit 1 kHz Tiefpass gefiltert. Anschließend wurden die analogen Signale Computer-gestützt digitalisiert. Mit Hilfe des Programm WinLTP Program 1.11b (WinLTP Ltd., Centre for Synaptic Plasticity, School of Physiol. & Pharmacol. University of Bristol, Bristol, UK) wurden die Signale aufgezeichnet und weiterverarbeitet.

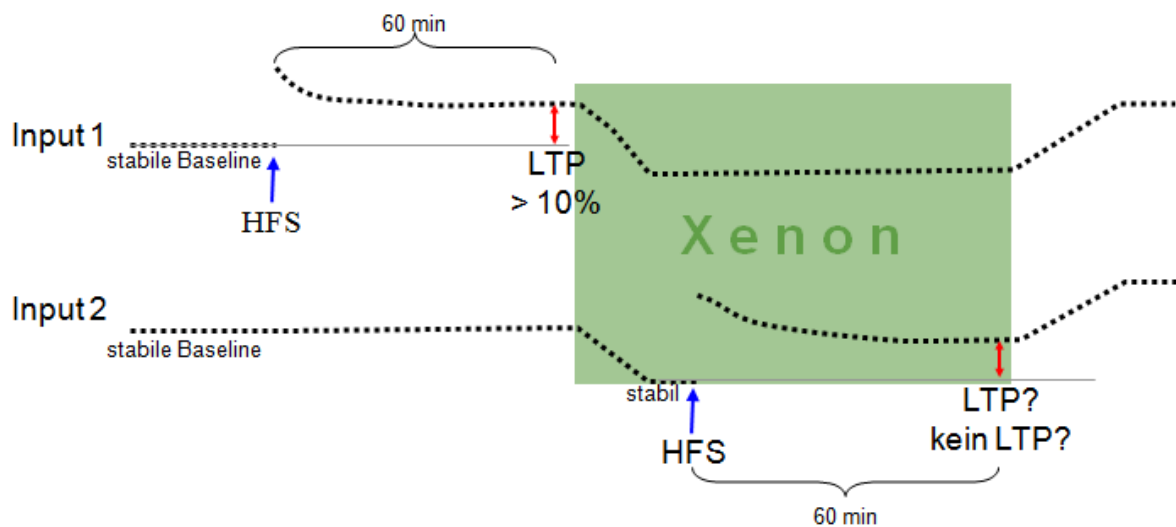
#### *2.3.6.3 Elektrische Stimulation*

In den extrazellulären Ableitungen wurden die Amplituden und Steigungen der Feldpotentiale gemessen. Dabei stellen diese Feldpotentiale die Summe aller Antworten von exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen dar, die während des elektrischen Stimulus gereizt wurden. Die evozierten Potentiale wurden durch elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen abgeleitet wie in Abb.1.4.1 schematisch dargestellt.

Die Stimulation erfolgte mit Hilfe von 2 bipolaren Wolfram Elektroden (Durchmesser von 50 µM), die auf jeder Seite der Ableitelektrode platziert wurde (siehe Abb. 1.4.1). Alternierend wurden alle 15 s nicht überlappende Fasern der Schaffer-Kollateralen angeregt, sodass beide Eingänge voneinander unabhängig sind und gleichzeitig zur HFS-Stimulation die fEPSPs von dem jeweils anderen Eingang unbeeinflusst bleiben. Die Stimulationselektroden waren mit einem Stimulator verbunden, über den Stimulationsintensität und Dauer eingestellt werden konnten. Die Stimulationsintensität wurde so gewählt, dass 25-30 % der maximalen Reizantwort (maximale fEPSP) ausgelöst wurden.

#### 2.3.6.4 Induktion von Langzeit-Potenzierung (LTP)

Für das Auslösen von LTP wurde eine Sekunde eine einmalige hochfrequente Stimulation (HFS) von 100 Hz appliziert. Nachdem die Amplitude und die Steigung der Feldpotentiale mindestens 15 Minuten stabil waren, wurde ein sogenanntes Kontroll-LTP über eine der beiden Stimulationselektroden (Input 1) ausgelöst. Zeigte sich 60 Minuten nach der Induktion eine Potenzierung (>10 %), wurde Xenon appliziert. 15-20 Minuten nach dem Einwasch erreichten Amplitude bzw. Steigung der Feldpotentiale ein Plateau. Zu diesem Zeitpunkt wurde über die zweite Stimulationselektrode (Input 2) erneute hochfrequent stimuliert und für 60 Minuten aufgezeichnet. Auf diese Weise konnten in einem Präparat Kontroll-LTP und LTP unter pharmakologischem Einfluss gemessen werden.



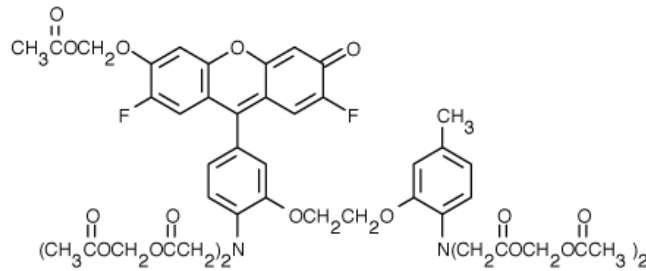
**Abb. 2.3.11: Experimentelle Vorgehensweise der LTP Induktion**

Nachdem eine stabilen Baseline (basale Aktivität) registriert wurde, erfolgte eine hochfrequente Stimulation (HFS; 100 Hz/100 Pulse) über eine der beiden Stimulationselektroden. Nach 60 Minuten lag eine Potenzierung von > 10 % vor, welche als Kontroll-LTP diente. Anschließend wurde Xenon appliziert und erneut LTP durch HFS über den anderen Eingang induziert.

### 2.3.7 Intrazelluläre Kalzium Messung

#### 2.3.7.1 Fluo-4-AM

Die Untersuchung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen erfordert eine hochempfindliche Messmethode, da für die Funktion von Kalzium als intrazellulärer Botenstoff extrem niedrige zyttoplasmatische Konzentrationen erforderlich sind. Eine etablierte Methode dafür ist die Messung der Kalziumkonzentration über Kalzium-sensitive Fluoreszenzindikatoren, die minimal mit den zellulären Vorgängen wechselwirken, eine gute Zellgängigkeit aufweisen und zudem eine hohe Selektivität bei der Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gegenüber anderen mono- und bivalenten Ionen aufweisen. Bei diesen Farbstoffen handelt es sich um Moleküle, die bei der Bindung von Kalzium ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern, was sich im Fluoreszenzspektrometer oder unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten lässt.



**Abb. 2.3.12: Strukturformel Fluo-4-AM**

Der Farbstoff Fluo-4-AM gelangt in seiner ungeladenen Form als Azetoxymethylester durch Diffusion in das Zytoplasma. Dort wird von endogenen Esterasen der Azetoxymethylesterrest abgespalten und der nun aktive Farbstoff reichert sich im Zytosol an.

Zur Bestimmung der Kalzium-Konzentration wurde der Kalzium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM ((2-[(2-(2-(5[bis(carboxymethyl)amino]-2-methylphenoxy)ethoxy)-4(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo3*H*-xanthen-9-y)phenyl)](carboxymethyl)amino)acetic acid), Molecular Probes, Abb. 2.3.12) in der membrangängigen Form als Azetoxymethylester verwendet. In dieser ungeladenen Form gelangt der Farbstoff durch Diffusion über die Membran in das Zytoplasma, wo durch endogene Esterasen der Azetoxymethylesterrest abgespalten wird und in der Folge der Farbstoff als Anion vorliegt. In dieser Form kann er nicht mehr durch die Membran diffundieren, so dass er sich im Zytosol anreichert.

#### 2.3.7.2 Färbung der Schnitte mit Fluo-4-AM

Die Farbstoffbeladung erfolgte mit 500  $\mu\text{M}$  Fluo-4-AM, gelöst in DMSO + 20 % Pluronic F127, in HEPES-ACSF bei Raumtemperatur. Der Bolus des Farbstoffs wurde mit einem Druckpuls aus der Glaspipette (0,5 M $\Omega$  Pipettenwiderstand) in die Zielregion appliziert. Anschließend wurde 60 min gewartet, um die Aufnahme des Farbstoffs in die Zellen zu gewährleisten.

#### 2.3.7.3 Versuchsaufbau

Zur Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration war das Mikroskop mit einem 60 x Wasserimmersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland), einem dichroischen (495) Spiegel und einem Breitbandfilterblock, der einen Filter 470/40 enthält, ausgestattet. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm. Zur Messung wurde ein Kalzium-Imaging System (Polychrome V; T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Germany) verwendet. Die Intensität des emittierten Lichts wurde bei einer Wellenlänge von 516 nm gemessen. Parallel zur Hochfrequenzstimulation wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der gebundenen Menge an Kalzium gemessen. Für diese Kalzium-abhängigen Änderungen in der Fluoreszenz wurden die Bilder 1 s vor, 1 s während der HFS und 3 s nach der Stimulation bei 10 Hz abgetastet und mit Hilfe einer High Speed CCD Kamera (Retiga-2000RV, Qimaging, Surrey, Canada) aufgenommen. Die

Datenaufnahme und Analyse erfolgte mit dem Programm TillVision (T.I.L.L. Photonics). Die Grundfluoreszenz vor der HFS-Stimulation ( $F_0$ ) und die relative Veränderung in der Fluoreszenz ( $\Delta F/F_0$ ) wurde in definierten Bereichen (ROIs; region of interest) aus den Bildern ausgemessen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.3.5 beschrieben.

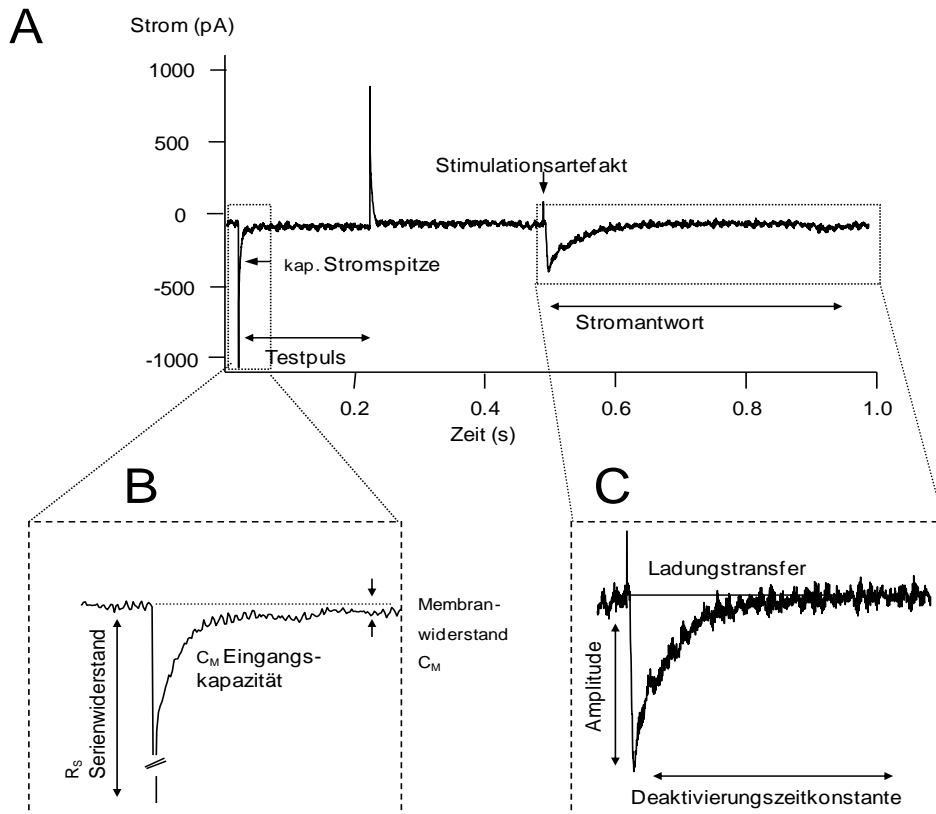
## 2.3.8 Auswertung und Statistik

### 2.3.8.1 Auswertung der intrazellulären Daten

Die Patch-Clamp-Messungen wurden mit der Software HEKA Pulse (HEKA Pulse, Heka Elektronik, Lambrecht, Deutschland), die Feldpotentialableitungen mit der Software WinLTP (WinLTP Ltd., Centre for Synaptic Plasticity, School of Physiol. & Pharmacol. University of Bristol, Bristol, UK) vorgenommen und mit der Software Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA) analysiert. Die Datenzusammenfassung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Mit Hilfe des sog. Testpulses (Abb. 2.3.13) lassen sich die Membraneigenschaften der Zelle ( $R_M$ ,  $C_M$ ) und die Qualität der Ganzzelleableitung ( $R_S$ ) über die Dauer des Experiments bestimmen. Der Testpuls ist eine sprunghafte Hyperpolarisation von 10 mV, die 200 ms lang anhält. Die dadurch entstandene Umladung der Membran ist anhand der kapazitiven Stromspitzen zu erkennen. Mit dem dSEV erfolgten Spannungsmessung und Strominjektion nacheinander mit einer Wiederholungsrate  $f_{sw}$  (switching frequency). Während der Spannungsmessung wird kein Strom injiziert ( $I=0$ ), weshalb kein Strom am Serienwiderstand ( $R_S$ ) abfällt und dieser damit unbedeutend wird. Nach Eintauchen der Pipette in das Bad wird der Nullpunkt des Potentials Offsetpotential;  $I=0$ ) unter Berücksichtigung des Übergangspotentials (Liquid Junction Potential) definiert. In der Cell-attached Konfiguration werden die kapazitiven Artefakte der Pipette, Pipettenhalter und des Membranflecks kompensiert, um die eigentlichen Messsignale nicht zu stören (Juusola 1994).





**Abb. 2.3.13: Berechnung der Messgrößen aus dem abgeleiteten Stromzeitverlauf**

Im Testpuls (A) wird das Haltepotential des Verstärkers vor jeder Stimulation sprunghaft um 10 mV für 200 ms gesenkt. Die Umladung der Zellmembran ist anhand der vergrößerten kapazitiven Stromspitzen zu erkennen. B: Nach vollständiger Umladung der Membran ist der kapazitive Widerstand sehr hoch, so dass der Potentialerhaltungsstrom ( $I_{\text{offset}}$ ) über den Membranwiderstand abfließt. Die Differenz zwischen dem Strom vor und nach der Umladung spiegelt den  $I_{\text{offset}}$  wieder. An der Stromantwort (C) lässt sich die absolute Amplitude ablesen. Die Berechnung der Zeitkonstante  $T$  erfolgt durch Annäherung einer auf einer Exponential- bzw. Biexponentialfunktion basierenden Kurve an die Messkurve. Durch Integration der Fläche unterhalb der Stromantwort kann der Ladungstransfer (in pAs) bestimmt werden.

#### Membranwiderstand ( $R_M$ )

Durch einen Testpuls wurde der Membranwiderstand routinemäßig kontrolliert. Dieser Membranwiderstand steht für Ionenkanäle und den Innenwiderstand für das mit Zytoplasma gefüllte Neuron. Mit Hilfe des Testpulses kann dieser aus der Differenz vor und nach den kapazitiven Stromspitzen errechnet werden. Der kapazitive Widerstand ist nach Umladung der Membran sehr groß, weshalb der Kompensationsstrom  $I_{\text{offset}}$ , der das eingestellte Haltepotential aufrechterhalten soll, durch den Membranwiderstand fließt. Mit dem Ohm'schen Gesetz kann dieser berechnet werden.

#### Stromamplitude (Peak)

Die Amplitude ist durch den maximalen Ausschlag der Stromantwort von der Ausgangslinie in pA definiert.

### *Steigung*

Der Anstieg ist ein Maß für die Steilheit einer Kurve. Die Steigung wird zwischen 20 % und 80 % der Stromamplitude gemessen.

### *Ladungstransfer*

Der Ladungstransfer (Einheit: pAs) beschreibt den Ionenstrom, der über eine Zeit geflossen ist. Er ist durch die Fläche unter der Stromantwort in einem Strom-Zeit-Diagramm definiert.

### *Zeitkonstante $\tau$*

Zur Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  wird mit einem Iterationsverfahren eine Exponentialfunktion an die Stromkurve solange angenähert bis die quadrierten Differenzen, also die durchschnittlichen Abweichungen zwischen gemessener und berechneter Kurve, möglichst gering sind. Diese Annäherung wird computergestützt mit der Formel

$$y = y_0 + A e^{-x/\tau}$$

berechnet. Hierbei stellen A die Amplitude,  $\tau$  die Zeitkonstante und  $y_0$  die Verschiebung in der y-Achse dar. Die Zeitkonstante wird in ms angegeben und spiegelt den Stromabfall (Deaktivierungskonstante) oder den Stromanstieg (Aktivierungskonstante) in der Messkurve nach 63% Amplitudenreduktion wieder. NMDA-, GABA<sub>A</sub>- und HCN-Rezeptor vermittelte Ströme weisen typischerweise einen biexponentiellen Verlauf mit zwei Zeitkonstanten  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  auf. Hier wird das Iterationsverfahren mit einer biexponentiellen Funktion durchgeführt.

$$y = y_0 + A_{1e}^{x/\tau_1} + A_{2e}^{x/\tau_2}$$

### *Spannungsabhängigkeit der HCN-Kanalaktivität (pV)*

Zur Auswertung der Aktivierungsgeschwindigkeiten wurden die Aktivierungskonstanten  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  berechnet. Dies erfolgte durch das Iterationsverfahren der jeweiligen Stromspuren von -133 mV bis -93 mV mit einer Biexponentialfunktion.  $\tau_{fast}$  repräsentiert allerdings die eigentliche Aktivierungskonstante, weil bei HCN-Kanälen die schnelle Komponente mit der Amplitude zu mehr als 90% zur Gesamtamplitude des Stroms beiträgt. Die  $\tau$ -Werte wurden graphisch gegen das Aktivierungspotential von -133 mV aufgetragen. Zur Bestimmung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven und des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$  wurden die „Tail-Ströme“ auf die maximale Stromstärke  $I_{max}$  der Zelle normalisiert und graphisch als Funktion des vorangegangenen Membranpotentials aufgetragen. Die Kurven wurden anschließend mit folgender Boltzmann-Funktion approximiert:

$$(I - I_{min}) / (I_{max} - I_{min}) = [1 - \exp([V_m - V_{0,5}] / k)]$$

### *2.3.8.2 Auswertung der extrazellulären Experimente*

Feldpotentiale (fEPSPs) sind durch die Amplitude, die „Time-to-peak“ sowie die Anstiegssteilheit charakterisiert. Als Erfassung der Stärke der synaptischen Übertragung dient für gewöhnlich der Anstieg des fEPSPs. Zur Bestimmung dieses Parameters wurde die Steigung des fEPSP zwischen 20% und 80% der Antwortamplitude gemessen. Um das Rausch-Signal-Verhältnis zu verkleinern, wurden 2 konsekutive fEPSPs gemittelt. Die fEPSP-Steigungen wurden zu den letzten 5 Minuten vor den HFS normalisiert. Die LTP wurde anhand der prozentualen Erhöhung des fEPSP-Anstiegs 60 Minuten nach der HFS gegenüber dem Kontrollwert bewertet.

### *2.3.8.3 Auswertung der Daten der intrazellulären Kalzium Messungen*

In der Auswertung wurden die unterschiedlichen definierten Bereiche (ROIs) eines Experiments gemittelt. Änderungen der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz wurden in  $\Delta F/F_0$  angegeben. Für die Änderungen des Gesamtkalziumgehalts wurde das Integral (AUC) berechnet.

### *2.3.8.4 Statistik*

Um die einzelnen Experimente vergleichbar zu machen, wurden die Antworten der letzten 5 Minuten der Kontrolle auf 1,0 normalisiert und die Änderung der Amplituden, der Fläche unter der Kurve (AUC) oder des Ladungstransfers, als relative Veränderung zu diesem normalisierten Ausgangsniveau berechnet (relative Amplituden, relative AUC, relativer Ladungstransfer).

Die Zusammenfassung der Daten und die statistische Analyse erfolgten über Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die Werte sind als Mittelwerte angegeben und werden grundsätzlich mit dem dazugehörigen SEM („standard error of the mean“)-Wert; Standardfehler) angegeben (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen zweiseitigen gepaarten t-Test überprüft und mit einem Signifikanzniveau ab  $p < 0,05$  angenommen.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 ELISA**

Der intrazelluläre cAMP-Gehalt wurde mit einem kommerziell erhältlichen kompetitiven Enzymimmunoassay (cAMP complete ELISA kit, Enzo Lifescience, Lörrach, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden ungefähr  $10^6$  stabil transfizierte mHCN2 HEK Zellen in einer Petrischale ausgesät. Diese wurden entweder mit Kontroll-ACSF oder in Gegenwart des Xenongasgemisches 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 M Salzsäure (HCL) 10 Minuten lysiert und der Abbau des cAMP durch Inhibition der

Phosphodiesterase gestoppt. Durch Zentrifugation (4 Minuten, > 600 g) wurden die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen des Lysats getrennt. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die cAMP Konzentrationen wurden nach Herstellerangaben des cAMP complete ELISA kit (Enzo lifesciences) bestimmt.

Das Prinzip des ELISAs beruht auf einer Konkurrenz von zellulären und einem Markerenzym-konjugierten cAMP um die Bindung an einen selektiven cAMP-Antikörper, der über einen „anti-rabbit IgG“ am Boden einer 96-Lochplatte gebunden ist. Durch Zugabe eines Substrats kann der Anteil der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch eine Farbreaktion ermittelt werden. Je intensiver die Farbreaktion, desto geringer der Anteil des zellulären cAMP, welches um die Antikörper-Bindung konkurriert. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus Doppelmessungen.

#### **2.4.2 Fluoreszenzfärbung**

Die Morphologie der Neuronen wurde mittels Fluoreszenzmikroskop nach Füllung mit Neurobiotin und Kopplung an den fluoreszierenden Farbstoff Cy-3 untersucht.

##### *Färbung der Neurone durch intrazelluläre Injektion von Neurobiotin*

Für die intrazelluläre Färbung wurde der Farbstoff Neurobiotin in einer Konzentration von 0,5 mg/ml der Intrazellulärlösung zugegeben. Neurobiotin gelangte durch Diffusion während der Ableitung in die Zelle. Nach Beendigung des Experiments wurde die Pipette sehr langsam und vorsichtig von der Zellmembran gelöst, mit dem Ziel, diese dabei nicht zu zerstören. Anschließend erfolgte eine einstündige Fixierung der Schnitte in 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur und abschließend über Nacht bei 4 °C. Das Fixativ wurde mit PBS für 3 x 10 Minuten ausgewaschen. Die Schnitte wurden über Nacht in einer Lösung aus 1:500 cy-3 Streptavidin in PBS mit 2 % Triton-X inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Schnitte mit Hilfe von Vectashield eingedeckelt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Olympus IX81; Hamburg; Deutschland) angefertigt.

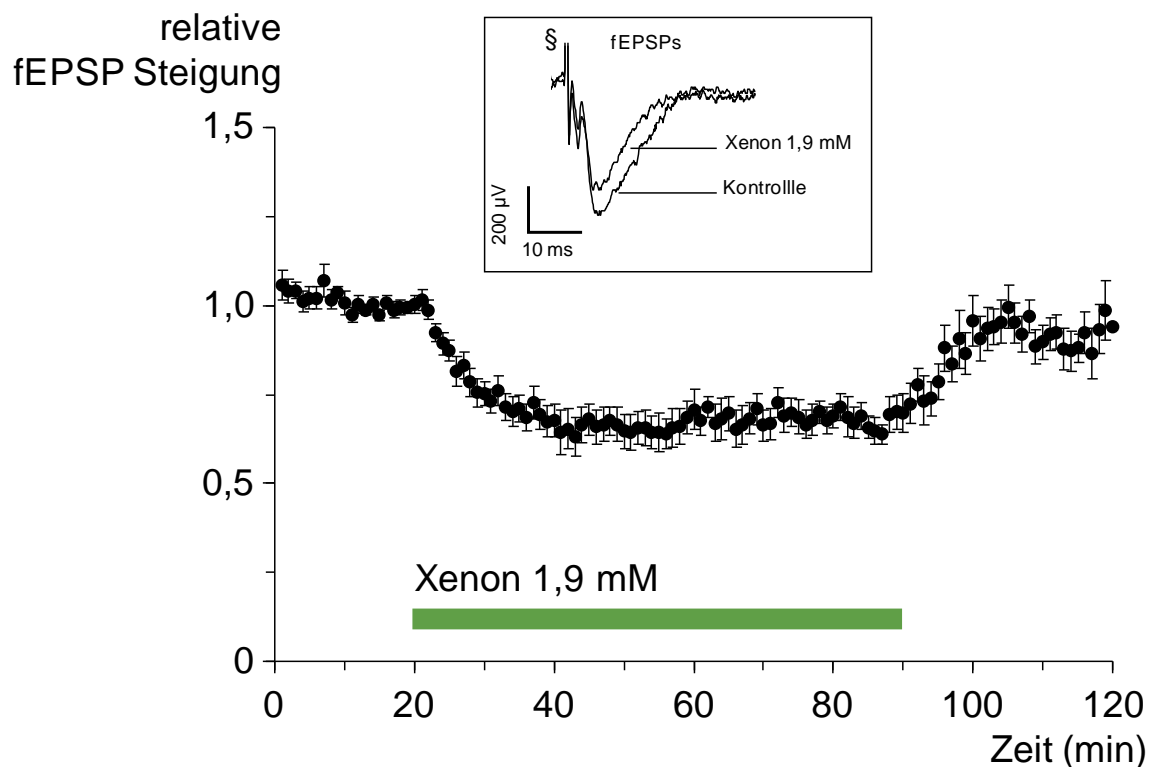
### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Inhalationsanästhetikums Xenon auf die hippocampale synaptische Plastizität und auf das thalamokortikale Netzwerk untersucht.

#### 3.1 Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus

##### 3.1.1 Xenon reduziert die Feldpotentiale im Hippocampus

In einer ersten Versuchsreihe wurden in der CA1-Region von sagittalen Hippocampus-Schnitten der Maus Feldpotenziale (*field excitatory postsynaptic potentials*; fEPSPs) abgeleitet. Durch elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen wurden fEPSPs im Stratum radiatum induziert und aufgenommen. Nachdem die Antworten 15 Minuten in Bezug auf die Amplitude und Kinetik stabil waren, wurde die ACSF mit 65 % Xenon gesättigt. Die Xenonapplikation führte zu einer Reduktion der Steigung der fEPSPs auf  $70,4 \pm 3,5$  % (gemittelter Wert 16-20 Minuten nach Beginn der Xenonapplikation). Nach Beendigung der Xenonapplikation („washout“) erreichten die fEPSPs wieder das Ausgangsniveau (Abb. 3.1.1). Der Effekt von Xenon war damit reversibel.



**Abb. 3.1.1: Xenon reduziert fEPSPs in der CA1-Region des Hippocampus.**

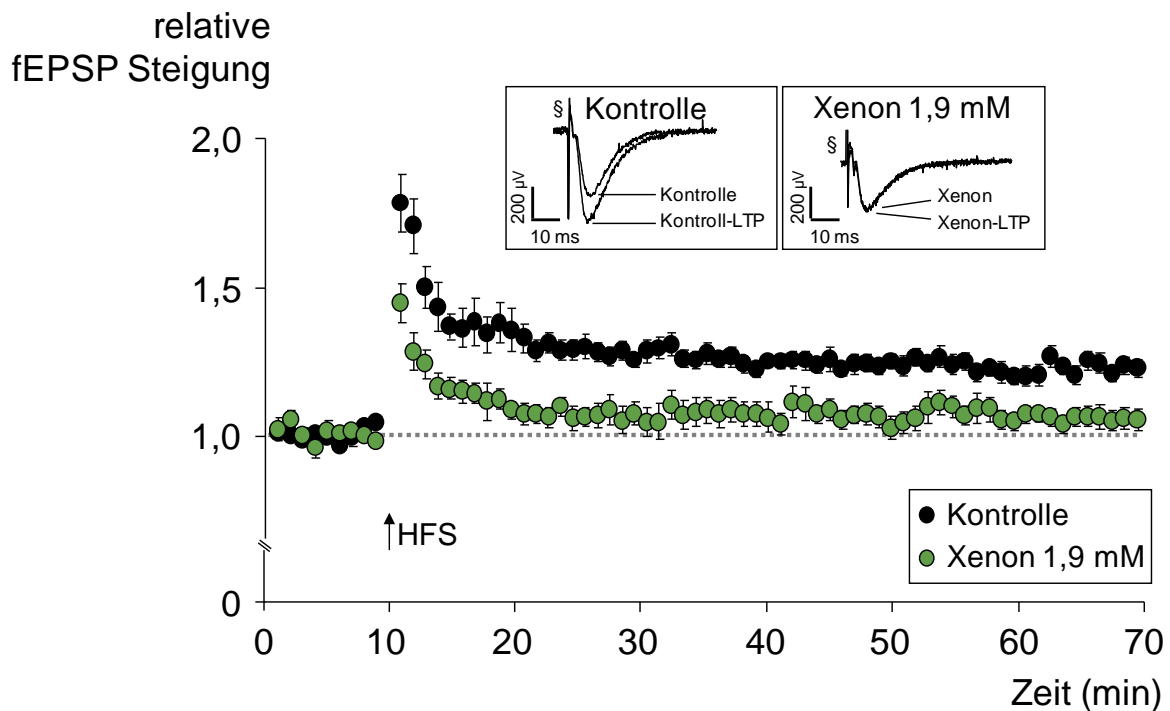
Durch elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen in der CA1-Region des Hippocampus wurden Feldpotenziale (*field excitatory postsynaptic potentials*; fEPSPs) induziert. Die oben abgebildeten Stromkurven zeigen fEPSPs eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und Xenonapplikation. In der Grafik sind die gemittelten relativen Steigungen (y-Achse) über die Zeit (x-

## Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus

Achse) aufgetragen. Unter Kontrollbedingungen wurde ACSF mit einem Gasgemisch aus (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) gesättigt bis die Steigungen der fEPSPs über mindestens 15 Minuten ein stabiles Niveau erreicht hatten. Für die Xenonapplikation wurde die ACSF zusätzlich mit 65 % gesättigt. Die gelöste Xenonkonzentration entsprach 1,9±0,5 mM. Die letzten 5 Minuten unter Kontrollbedingungen wurden auf 1,0 (100 %) normalisiert und dann die relativen Steigungen ermittelt. Die Xenonapplikation reduziert die fEPSP-Steigung auf 70,4±3,5 % (n=7), nach Beendigung der Applikation erreichten die Steigungen wieder das Ausgangsniveau (p=0,001).

### 3.1.2 Xenon hemmt die hippocampale Langzeitpotenzierung

Zur Untersuchung der Xenonwirkung auf die Langzeitpotenzierung wurde in einer weiteren Versuchsreihe in einem Hippocampus-Schnitt über zwei getrennte und voneinander unabhängige Eingänge (siehe Abb. 1.4.1) ein hochfrequenter Stimulus (HFS; 100 Hz/1s) appliziert. Diese Stimulation zur LTP-Induktion erfolgte zunächst über Eingang 1 vor der Xenonapplikation und anschließend ca. 90 Minuten später, in Anwesenheit von Xenon, über den 2. Eingang (siehe Abb. 2.3.11). Unmittelbar nach der HFS-Stimulation kommt es typischerweise zu einem sprunghaften, starken Anstieg der Antworten, der sogenannten posttetanischen Potenzierung. Da die beiden Eingänge voneinander unabhängig sind, bleiben gleichzeitig zur HFS-Stimulation die fEPSPs von dem jeweils anderen Eingang unbeeinflusst. Die folgende Abbildung zeigt die gemittelten normalisierten Werte aus 25 separaten Experimenten (Abb. 3.1.2).



**Abb. 3.1.2: Xenon hemmt die Auslösung von LTP im Hippocampus.**

Die fEPSPs werden durch zwei Stimulationselektroden, die jeweils im selben Schnitt positioniert sind, ausgelöst. Jeder Datenpunkt (schwarzes Symbol = Kontrolle; grünes Symbol = Xenon) errechnet sich aus dem Mittel von 2 aufeinanderfolgenden fEPSP-Antworten (2 Antworten pro Minute für jeden

Eingang). Die gemittelten fEPSP-Steigungen der letzten 5 Minuten vor der tetanischen Reizung werden auf 1,0 (100 %) normalisiert. Unter Kontrollbedingungen bewirkte eine hoch-frequente Stimulation (100 Hz/1s) ein LTP der Feldpotentiale ( $127,2 \pm 5,8$  %;  $n=25$ ), wohingegen die Xenonapplikation lediglich eine Kurzzeitpotenzierung (fEPSP Steigungen nach 60 Minuten  $105,9 \pm 2,9$  %;  $n=25$ ) auslöste. Die oben abgebildeten Originalspuren zeigen fEPSPs eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingen und Xenonapplikation vor und nach der hochfrequenten Stimulation. § Stimulusartefakt

Unter Kontrollbedingungen vergrößerte die tetanische Stimulation die Steigung der fEPSPs im Mittel auf  $127,2 \pm 5,8$  % (LTP 60 min *post stimulationem*;  $n=25$ ;  $p < 0,001$ ). In Anwesenheit von Xenon konnte nur eine Kurzzeitpotenzierung (short-term potentiation; STP) ausgelöst werden. Die fEPSP-Steigungen erreichten nach wenigen Minuten wieder ihr Ausgangsniveau ( $105,9 \pm 2,9$  %;  $n=25$ ;  $p=0,090$ ).

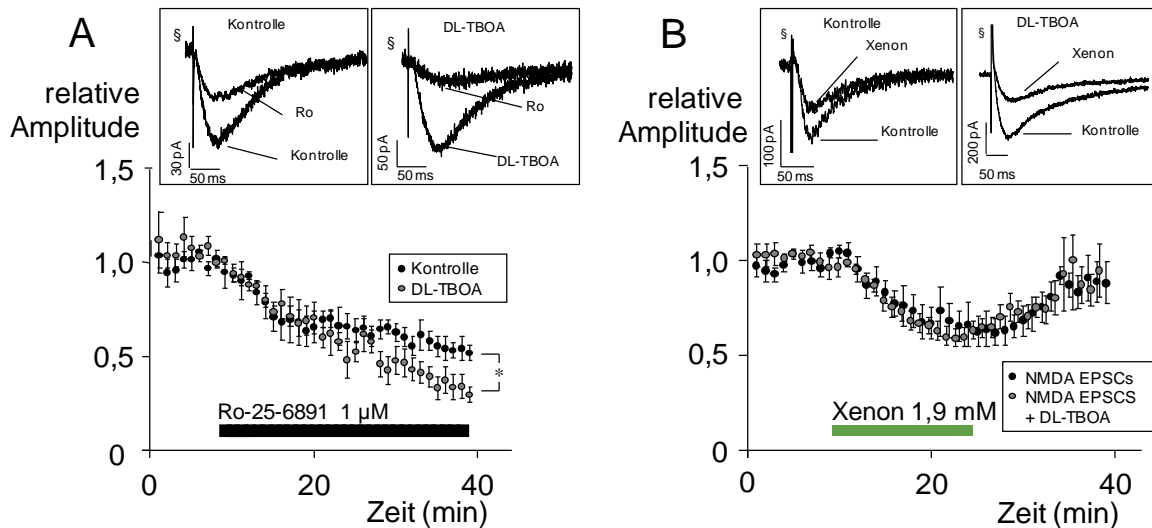
### 3.1.3 Xenon reduziert NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme im Hippocampus

Die Aktivierung der synaptischen NMDA-Rezeptoren sowie der außerhalb der postsynaptischen Dichte lokalisierten extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der LTP-Induktion. Die Wirkung von Xenon auf die NMDA-Rezeptor vermittelte Transmission wurde in „Patch-Clamp“-Experimenten (Ganzzelleableitung) im „Voltage-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -40 mV untersucht. NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten wurden durch Zugabe der spezifischen Antagonisten NBQX ( $5 \mu\text{M}$ ), CGP 35348 ( $200 \mu\text{M}$ ) und Bicucullin Methiodid ( $20 \mu\text{M}$ ) pharmakologisch isoliert.

Während synaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren durch Stimulation der Schaffer-Kollaterale einer funktionellen Charakterisierung direkt zugänglich waren, wurden extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren zunächst durch Zugabe des Glutamatransporter-Inhibitors DL-TBOA indirekt, durch einen „spill over“ (Überlaufen) von Glutamat aus dem synaptischen Spalt, aktiviert. NMDA-Rezeptoren außerhalb der postsynaptischen Dichte bestehen hauptsächlich aus einer Kombination von NR1- und NR2B-Untereinheiten. Die Aktivierung der extrasynaptisch lokalisierten NMDA-Rezeptoren wurde durch Zugabe des NR2B-selektiven Antagonisten Ro-25-6981 überprüft. Abbildung 3.1.3 A zeigt eine Reduktion synaptischer NMDA-Rezeptor vermittelter Ströme (NMDA-EPSCs) nach 30 minütiger Applikation des Antagonisten Ro-25-6981 auf  $53,3 \pm 4,9$  % ( $n=5$ ;  $p < 0,001$ ; schwarze Symbole), wohingegen die Amplitude der NMDA-EPSCs in Gegenwart von DL-TBOA durch Ro-25-6981 auf  $37,4 \pm 6,4$  % ( $n=5$ ;  $p > 0,001$ ; graue Symbole) reduziert wurde. Der signifikante Unterschied der Reduktion der Amplitude der NMDA-EPSCs verursacht durch Ro-25-6981 in An- und Abwesenheit von DL-TBOA deutet auf eine zusätzliche Aktivierung extrasynaptisch lokalisierter NMDA-Rezeptoren hin. Xenon reduzierte NMDA-eEPSCs in Abwesenheit von DL-TBOA reversibel auf  $65,9 \pm 9,4$  % ( $n=7$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.1.3 B). Die Xenon vermittelte Abnahme der NMDA-EPSCs unter DL-TBOA auf  $58,2 \pm 5,8$  % ( $n=5$ ;  $p=0,004$ ) zeigte dazu keinen signifikanten Unterschied. Dies deutet

## Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus

darauf hin, dass Xenon unter diesen experimentellen Bedingungen synaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren gleichermaßen hemmt, wie extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren.



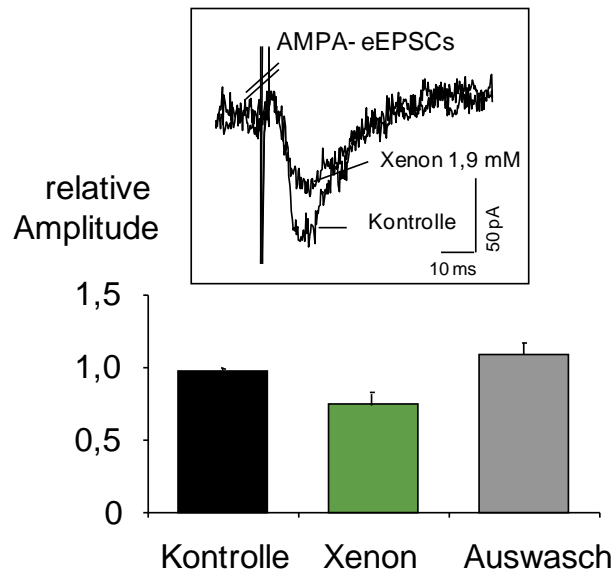
**Abb.3.1.3: Xenon reduziert NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten in der CA1-Region**

**A:** NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme (NMDA-EPSCs) wurden in Anwesenheit (graue Symbole) und in Abwesenheit (schwarze Symbole) von  $30 \mu\text{M}$  DL-TBOA, eines Inhibitor des Glutamattransporters (EAAT) aufgenommen. Extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren enthalten hauptsächlich NR2B-Untereinheiten. Ro-25-6981 (Ro) ist ein Antagonist von NR2B-Untereinheiten-enthaltenen NMDA-Rezeptoren. Unter Kontrollbedingungen reduzierte Ro-25-6981 die Amplitude der NMDA-EPSCs auf  $53,3 \pm 4,9 \%$  ( $n=5$ ;  $p < 0,001$ ). In Anwesenheit von DL-TBOA wurde die Amplitude der NMDA-EPSCs durch Applikation von Ro-25-6981 auf  $37,4 \pm 6,4 \%$  ( $n=5$ ;  $p > 0,001$ ) reduziert. Der signifikante Unterschied beider Wirkungen deutet auf eine zusätzliche Aktivierung NR2B-enthaltender NMDA-Rezeptoren unter DL-TBOA hin. **B:** Xenon reduziert NMDA-EPSCs (schwarze Symbole) reversibel auf  $65,9 \pm 9,4 \%$  ( $n=7$ ;  $p < 0,001$ ). Eine vergleichbare Reduktion ( $58,2 \pm 5,8 \%$ ,  $n=5$ ;  $p=0,004$ ) durch Xenon zeigte sich, wenn extrasynaptische NMDA-Rezeptoren durch Inkubation des Präparats mit DL-TBOA mit aktiviert wurden (graue Symbole). Jedes Symbol repräsentiert normalisierte und gemittelte NMDA-EPSC Amplituden  $\pm$  SEM. Die oben abgebildeten Stromkurven zeigen NMDA-EPSCs eines repräsentativen Experiments unter Ro- und Xenonapplikation.

### 3.1.4 Xenon reduziert AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme im Hippocampus

AMPA-eEPSCs wurden in der Ganzzelleableitung im „Voltage-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von  $-70 \text{ mV}$  unter Inkubation des Schnittpräparats mit den spezifischen Antagonisten AP5, CGP 35348 und Bicucullin Methiodid aufgezeichnet. Die Applikation von Xenon verminderte signifikant AMPA-vermittelte Ströme auf  $75,2 \pm 7,6 \%$  ( $n=6$ ;  $p=0,02$ ) (Abb.3.1.4).





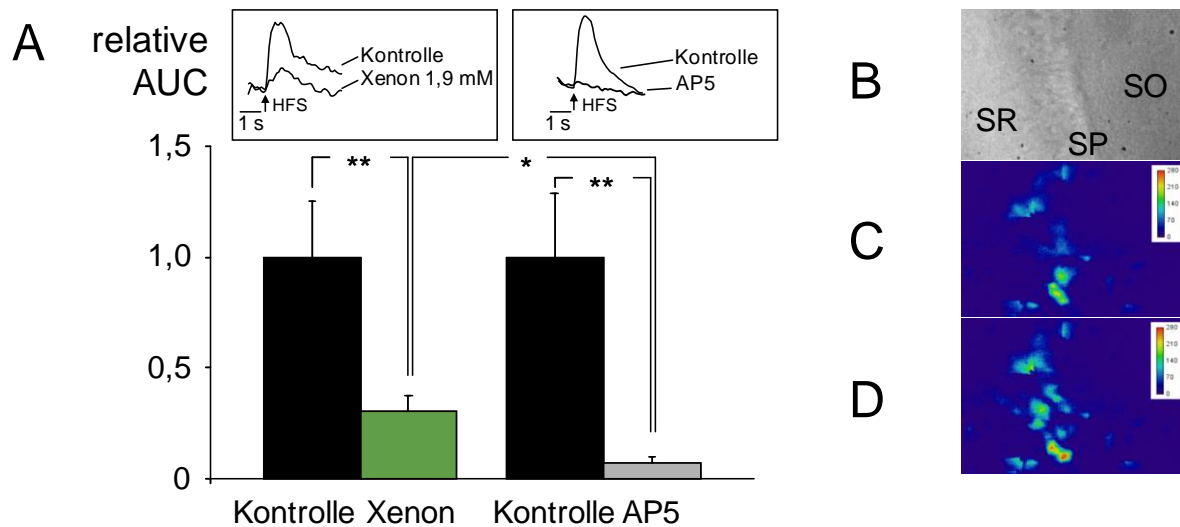
**Abb.3.1.4: Xenon vermindert die AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Transmission**

In der CA1-Region des Hippocampus reduziert Xenon die Amplitude von AMPA-EPSCs reversibel auf  $75,2 \pm 7,6$  % ( $n=6$ ;  $p=0,01$ ). Die abgebildeten Stromkurven eines Experimentes zeigen beispielhaft AMPA-EPSCs unter Kontrollbedingungen und Xenonapplikation.

### 3.1.5 Xenon reduziert den intrazellulären Kalziumeinstrom während der hochfrequenten Stimulation

Ein wesentlicher Mechanismus der LTP-Induktion ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Mit Hilfe des Kalziumimaging-Systems wurde der Kalziumeinstrom während des tetanischen Reizes untersucht. Die Färbung der Schnitte erfolgte mittels Bolusapplikation von  $500 \mu\text{M}$  Fluo4-AM. 1 Sekunde vor hochfrequenter Stimulation der Schaffer-Kollateralen wurde die relative Veränderung der Fluoreszenz für 5 Sekunden gemessen. Für die Bestimmung der Veränderung der Fluoreszenz wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) ausgemessen (Abb. 3.1.5 A). Xenon vermindert deutlich den Kalziumeinstrom auf  $30,2 \pm 6,9$  % ( $n=8$ ;  $p<0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Der initiale Kalziumeinstrom, der für eine LTP Induktion wichtig ist, kann prinzipiell über NMDA-Rezeptoren oder spannungsabhängige Kalziumkanäle erfolgen. Um die Abhängigkeit des gemessenen Kalziumeinstroms von NMDA-Rezeptoren zu untersuchen, wurde in einer weiteren Experimentserie der NMDA-Rezeptor Antagonist AP5 appliziert. Die Zugabe von AP5 verminderte den Kalziumeinstrom auf  $7,4 \pm 2,6$  % ( $n=8$ ;  $p<0,001$ ). Dies weist darauf hin, dass unter dem von uns gewählten tetanischen Stimulationsprotokoll zur LTP-Induktion NMDA-Rezeptoren den wesentlichen Teil des Kalziumeinstroms vermitteln.

## Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus



**Abb.3.1.5: Einfluss von Xenon auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration während der HFS-Stimulation**

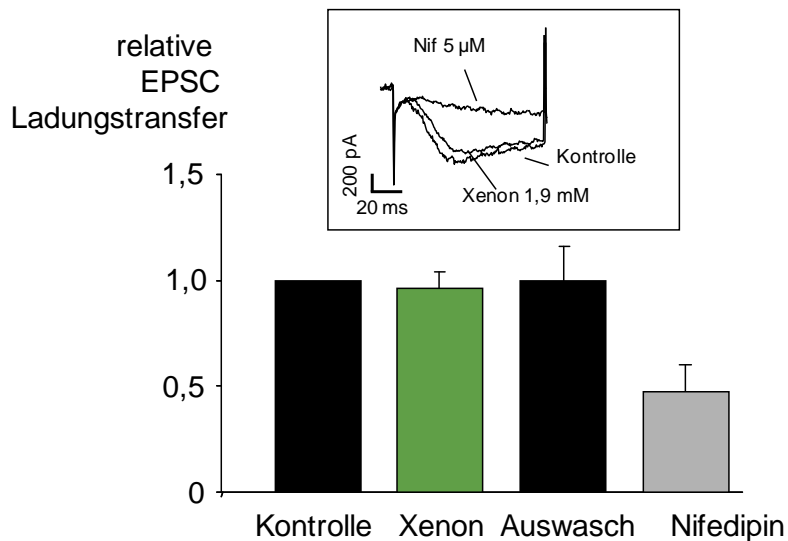
Mithilfe von Kalziumimaging-Systemen wurde der Kalziumeinstrom während der hochfrequenten Stimulation bestimmt. Eine Sekunde vor HFS der Schaffer-Kollateralen wurde die Veränderung der Fluoreszenz für 5 Sekunden gemessen. **A:** Für die Bestimmung der Veränderung des intrazellulären Kalziums wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) ausgewertet. Xenon reduzierte den Kalziumeinstrom auf  $30,2 \pm 6,9\%$  ( $n=8$ ;  $p<0,001$ ). Die nahezu vollständige Blockade ( $7,4 \pm 2,6\%$ ;  $n=8$ ;  $p<0,001$ ) des Kalziumeinstroms unter dem NMDA-Antagonisten AP5 zeigt die maßgebliche Rolle der NMDA-Rezeptoren beim Kalziumeinstrom während des hier gewählten hochfrequenten Stimulationsmusters. **B:** Transmissionsbild der CA1 Region des Hippocampus Stratum radiatum (SR), Stratum pyramidale (SP), Stratum oriens (SO). **C & D:** Fluoreszenz während HFS-Stimulation vor LTP-Induktion (C) und während LTP-Induktion (D), Hintergrundfluoreszenz wurde subtrahiert um Störsignale zu verringern.

### 3.1.6 Xenon hat keinen Einfluss auf spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle

Da neben NMDA-Rezeptoren spannungsgesteuerte Kalziumkanäle, insbesondere der L-Typ-Kalziumkanal, prinzipiell eine wichtige Rolle für den Kalziumeinstrom während der HFS spielen (Grover und Teyler 1990), wurde der Effekt von Xenon auf L-Typ-Kalziumkanäle untersucht. Durch die Zugabe der spezifischen Kalziumkanal-Antagonisten  $\omega$ -Agatoxin IVA (100 nM),  $\omega$ -Conotoxin GVIA (1  $\mu$ M) und Nickel (50  $\mu$ M) sowie einem depolarisierenden Spannungssprung von -70 mV auf 0 mV wurden Stromantworten aufgenommen, an deren Entstehung Kalziumkanäle vom L-Typ hauptsächlich beteiligt sind. Für diese Experimente wurde Kalzium in der Extrazellulärlösung gegen Barium ausgetauscht, um eine Kalzium-abhängige Desensibilisierung der Kanäle und zytotoxische Effekte von Kalzium zu verhindern. Somit wurden Bariumströme durch Kalziumkanäle gemessen. Es wurde die Fläche unter der Kurve der Stromspuren bestimmt, die dem Ladungstransfer durch den offenen Kanal entspricht. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung des Ladungstrfers ( $95,4 \pm 7,4\%$ ;  $n=6$ ;  $p=0,650$ ) der Stromantworten (Abb.3.1.6). Die Koapplikation des L-Typ-Kalziumkanal Antagonisten Nifedipin (5  $\mu$ M) verminderte den Ladungstransfer auf  $47,0 \pm 13,1\%$ . Der verbleibende Antagonisten-resistente Reststrom wurde wahrscheinlich

## Der Einfluss von Xenon auf die synaptische Plastizität im Hippocampus

über R-Typ-Kalziumkanäle vermittelt, für welche derzeit keine spezifischen Antagonisten verfügbar sind. Die Zugabe des unspezifischen Kalziumkanal Antagonisten  $\text{CdCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer vollständigen Inhibition der Antworten.



**Abb. 3.1.6 Xenon zeigt hat keinen Einfluss auf L-Typ-Kalziumkanäle**

Durch Spannungssprünge von -70 mV bis 0 mV wurden Bariumströme durch Kalziumkanäle evoziert. P-/Q-/N- und T-Typ Kalziumkanäle wurden pharmakologisch blockiert. Nach stabilen Kontrollbedingungen wurde Xenon appliziert und zeigte keine Veränderung des Ladungstransfer  $95,4 \pm 7,4$  % ( $n=6$ ;  $p=0,650$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Zu einem reduzierten Ladungstransfer  $47,0 \pm 13,1$  % führte die Applikation des spezifischen L-Typ-Kalziumkanal Antagonist Nifedipin (5  $\mu\text{M}$ ). Anteilig wurden die aufgezeichneten Stromantworten also zu etwa 50 % von L-Typ-Kalziumkanälen vermittelt.

### 3.1.7 Passive Membraneigenschaften

In der Ganzzelleableitung veränderten sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der abgeleiteten Zellen (Ruhemembranpotential, Serienwiderstand und Membranwiderstand) unter Zufuhr von Xenon im Hippocampus nicht (Tab. 3.1-1).

**Tabelle 3.1-1: Die elektrophysiologischen Eigenschaften der abgeleiteten Neurone werden durch Xenon nicht verändert.**

	Kontrolle	1,9 mM Xenon	Auswasch
RMP (mV)	-65,13 ± 1,5	-64,5 ± 2,3 (#)	-62,7 ± 2,0 (##)
$R_M$ (M $\Omega$ )	386,45 ± 8,6	376,38 ± 8,5 (#)	407,39 ± 8,7 (##)

Das Ruhemembranpotential (RMP) wurde vor und während der Applikation von Xenon im Brücken-Modus des Verstärkers abgelesen. Der Membranwiderstand  $R_M$  wurde kontinuierlich während des gesamten Experiments aufgenommen. Im Hippocampus wurden 22 Zellen in der Ganzzelleableitung unter Applikation von Xenon abgeleitet. Die angegebenen Zahlen geben die Mittelwerte der einzelnen Experimente  $\pm$ S.E.M wieder. Xenon zeigt keinen Einfluss auf die passiven Eigenschaften sowie das Ruhemembranpotential der Neurone. # nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; ## nicht signifikant unterschiedlich zur Ableitung unter Xenon.

### 3.2 Beeinflusst Xenon die synaptische Transmission thalamokortikaler Schaltneurone (TC-Neurone)?

#### 3.2.1 Charakterisierung von TC-Neuronen

In Abbildung 3.2.1. sind zwei Neurobiotin-Cy3-Streptavidin-gefärbte Erscheinungsformen von TC-Neuronen, eine Buschzelle (l) und eine Strahlzelle (r) dargestellt. Durch eine experimentell induzierte Membranhyperpolarisation können TC-Neuronen charakterisiert werden. Zu Beginn der negativen Strominjektion stieg die Hyperpolarisation zunächst an, resultierte dann in einen einwärts gerichteten depolarisierenden Strom, der schließlich einen stationären Wert erreichte (Abb.3.2.1.B). Dieses Phänomen wird als „voltage sag“ oder „depolarising sag“ bezeichnet und durch in TC-Neuronen stark exprimierte HCN-Kanäle vermittelt. Weitere Merkmale sind der „rebound burst“ sowie eine Nach-Depolarisation (ADP) nach dem niederschweligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotential (LTS; Low-threshold-Calcium spike). Abhängig vom Membranpotential zeigen thalamische Neurone zwei grundsätzlich verschiedene Aktivitätszustände. Ausgehend von positiveren Membranpotentialen um -50 mV wird der tonische Aktivitätsmodus, der durch eine Serie von einzelnen Aktionspotentialen charakterisiert ist, induziert (Abb.3.2.1.C). Bei negativeren Membranpotentialen um -75 mV feuern TC-Neurone rhythmische, salvenartige Aktionspotentialentladungen als Antwort auf einen depolarisierenden Stimulus (Abb.3.2.1.D).

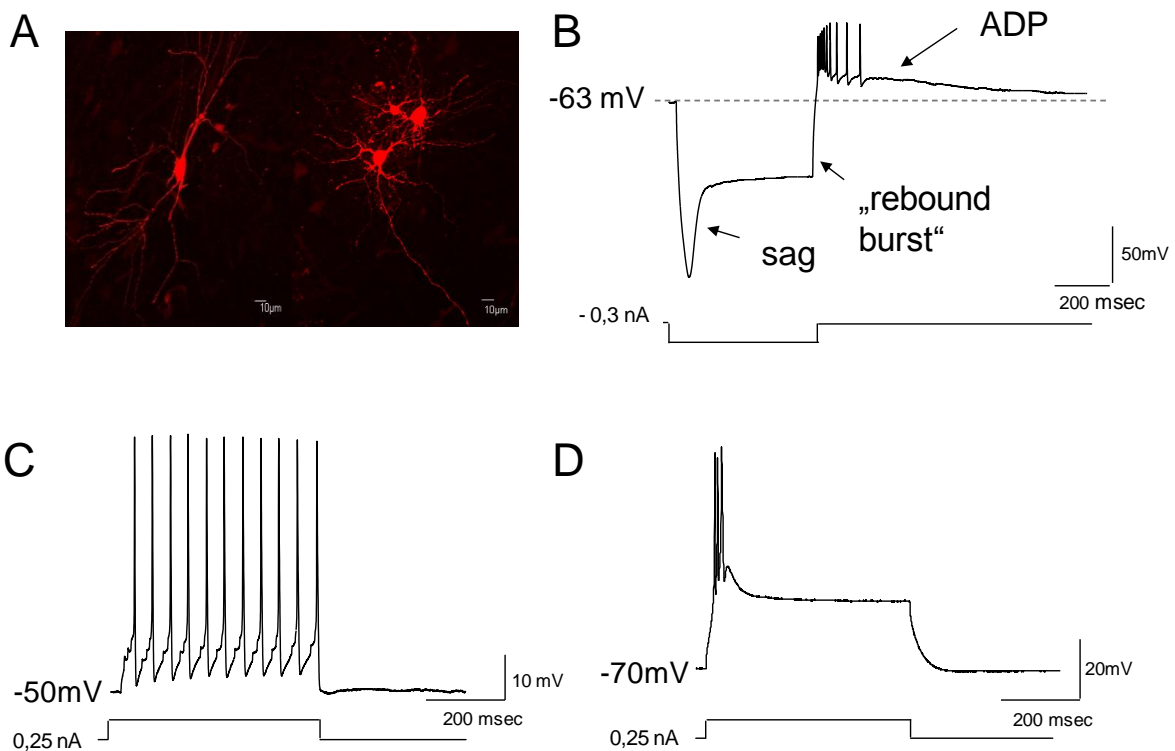


Abb. 3.2.1: Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften von TC-Neuronen

## Beeinflusst Xenon die synaptische Transmission thalamokortikaler Schaltneurone (TC-Neurone)?

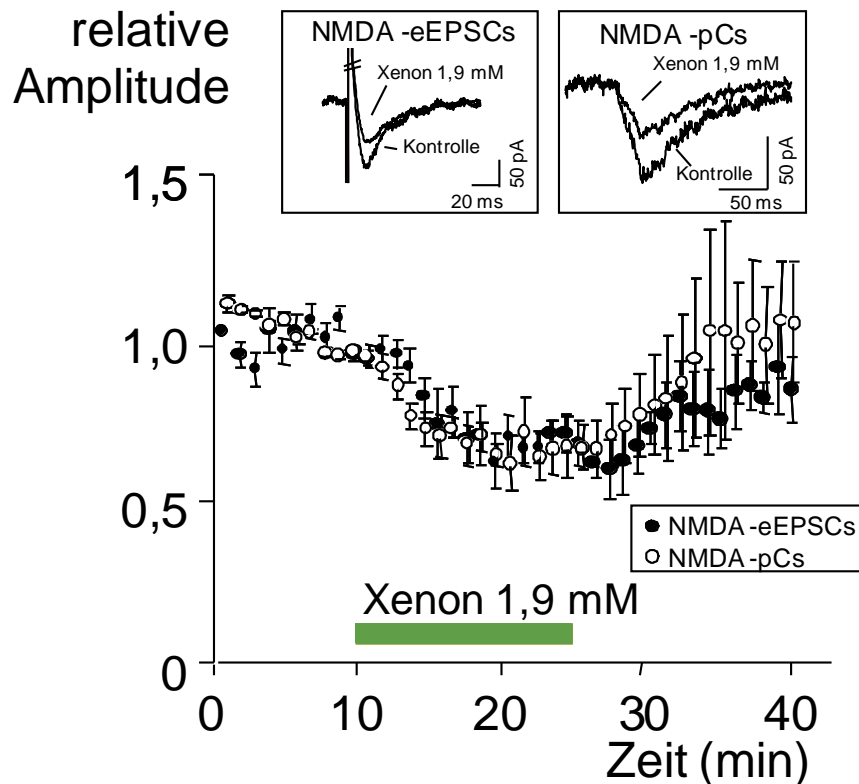
**A:** Neurobiotin-Cy3-Streptavidin-Färbung von 2 Typen von TC-Neuronen: Buschzelle (l), Strahlzelle (r) **B:** Zur Identifizierung von TC-Neuronen wird ein negativer Strompuls angelegt, dieser aktiviert einen Kationen-Einwärtsstrom, der „voltage sag“ genannt wird und das Membranpotential wieder depolarisiert. Zusätzlich wird ein „rebound burst“ induziert, gefolgt von einer Nach-Depolarisation (ADP). **C:** Als Antwort auf einen depolarisierenden Strompuls generieren TC-Neurone, deren Membranpotential sich im depolarisierten Bereich befindet, einzelne aufeinanderfolgende Aktionspotentiale im sogenannten tonischen Aktivitätszustand. **D:** Bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen werden Entladungssalven von Aktionspotentialen (sog. Bursts) als Reaktion auf einen depolarisierenden Strompuls generiert (sog. Burstmodus).

### 3.2.2 Xenon reduziert die exzitatorische glutamaterge Transmission

Die glutamaterge Transmission wird über NMDA- und AMPA-Rezeptoren vermittelt. Die exzitatorischen postsynaptischen Stromantworten (EPSCs) wurden durch elektrische Stimulation der inneren Kapsel hervorgerufen, während sog. photo-Currents (pCs) durch photolytische Freisetzung von Glutamat evoziert wurden. Jeweils Rezeptor-spezifische EPSCs/pCs wurden pharmakologisch durch Inkubation des Schnittpräparates mit spezifischen Antagonisten isoliert.

#### 3.2.2.1 NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten

Entsprechend den Versuchen im Hippocampus wurden NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten durch Zugabe der spezifischen Antagonisten NBQX (5  $\mu$ M), CGP 35348 (200  $\mu$ M) und Bicucullin Methiodid (20  $\mu$ M) pharmakologisch isoliert und im „Voltage-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -40 mV gemessen. Die Applikation von 1,9 mM Xenon führte zu einer Reduktion der Amplitude der NMDA-EPSCs ( $62,7 \pm 3,2$  %;  $n=7$   $p < 0,001$ ) und der NMDA-pCs ( $67,8 \pm 4,5$  %;  $n=7$   $p < 0,001$ ), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der Xenonwirkung auf NMDA-EPSCs und auf NMDA-pCs ( $p=0,449$ ) festzustellen war. Nach Beendigung der Xenonapplikation erreichten die EPSCs und pCs wieder das Ausgangsniveau (Abb. 3.2.2).

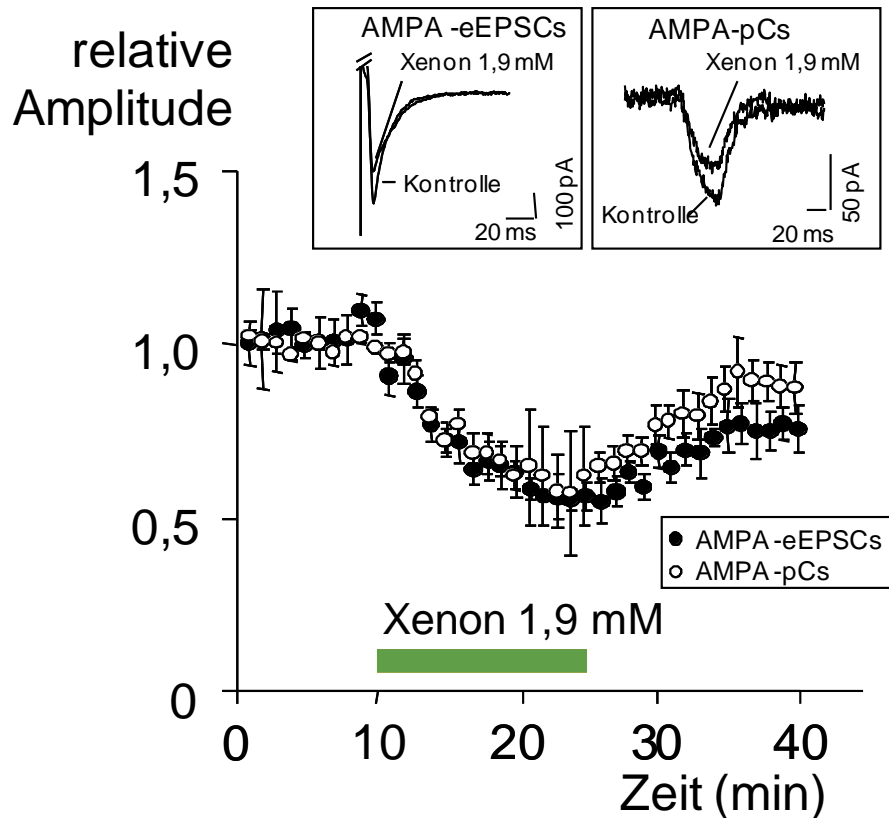


**Abb. 3.2.2 Xenon reduziert NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten bei elektrischer und photolytischer Stimulation gleichermaßen**

In vitalen Schnittpräparaten des Thalamus wurden sowohl durch elektrische Stimulation (NMDA EPSCs; schwarze Symbole) als auch durch photolytische Spaltung von CNB-caged-Glutamat (100  $\mu$ M) (NMDA pCs; weiße Symbole) NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten evoziert. 1,9 mM Xenon reduzierte NMDA-EPSCs auf  $62,7 \pm 3,2$  % ( $n=7$ ;  $p<0,001$ ) und NMDA-pCs auf  $67,8 \pm 4,5$  % ( $n=7$ ;  $p<0,001$ ). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Xenonreduktion zwischen NMDA-EPSCs und NMDA-pCs. Die im Einschub abgebildeten Stromkurven zeigen NMDA-EPSCs und NMDA-pCs eines repräsentativen Experiments.

### 3.2.2.2 AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten

Die Untersuchung der Xenonwirkung auf AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten wurde im „Voltage-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -70 mV durchgeführt. In Anwesenheit spezifischer Antagonisten wurden durch elektrische Stimulation AMPA-EPSCs und durch photolytische Freisetzung von Glutamat AMPA-pC evoziert. Die Applikation von Xenon verminderte die Amplitude der AMPA-EPSCs signifikant auf  $60,9 \pm 5,6$  % ( $n=7$ ,  $p<0,001$ ). Die Amplitude der photolytisch induzierten AMPA-Rezeptor vermittelten Ströme wurde gleichermaßen auf  $66,0 \pm 4,0$  % ( $n=7$ ;  $p<0,001$ ) reduziert. Die Reduktion der Amplitude war bei beiden Stimulationsarten reversibel und nicht verschieden ( $p=0,473$ ; Abb.3.2.3).

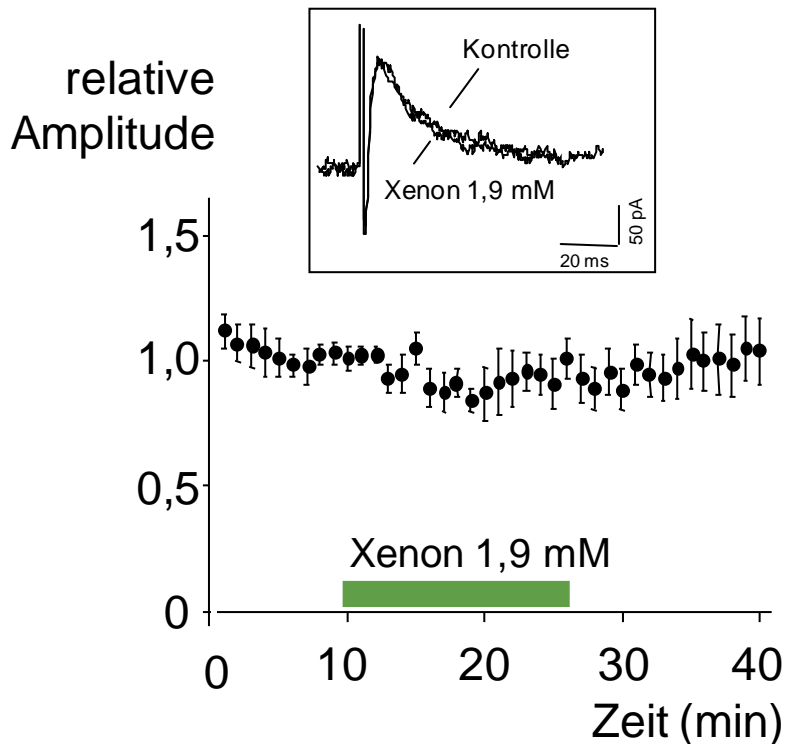


**Abb. 3.2.3 Xenon reduziert AMPA-Rezeptor vermittelte Stromantworten bei elektrischer und photolytischer Stimulation gleichermaßen**

Für die Untersuchung AMPA-Rezeptor vermittelter Stromantworten wurden AMPA-EPSCs durch elektrische Stimulation und AMPA-pCs durch photolytische Freisetzung von Glutamat evoziert. Die Applikation von 1,9 mM Xenon führte zu einer Reduktion der Amplitude von AMPA-EPSCs auf  $60,6 \pm 5,6\%$  ( $n=7$ ,  $p<0,001$ ) und der AMPA-pCs auf  $66,0 \pm 4,0\%$  ( $n=7$ ;  $p<0,001$ ). Der Effekt war jeweils reversibel auswaschbar und nicht signifikant verschieden ( $p=0,473$ ). Im Einschub: Original-Stromantworten aus einem repräsentativen Experiment.

### 3.2.3 Xenon hat keine Wirkung auf die inhibitorische GABAerge Transmission

Die Wirkung von Xenon auf die inhibitorische GABAerge Transmission wurde in der Ganzzelleableitung im „Voltage-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -50 mV untersucht. Für die Ableitung GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelter IPSCs wurden die exzitatorischen Rezeptoren und der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor pharmakologisch durch Zugabe von AP5, NBQX und CGP 35348 blockiert und IPSCs durch elektrische Stimulation evoziert. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung der Amplitude der GABA<sub>A</sub>-IPSCs ( $96,9 \pm 8,8\%$  versus Kontrolle,  $n=7$ , Abb.3.2.4).



**Abb. 3.2.4 Xenon beeinflusst die Amplitude von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelter IPSCs nicht.**

Der Einfluss von Xenon auf die inhibitorische GABAerge Transmission wurde in TC-Neuronen untersucht. Durch Zugabe spezifischer Antagonisten AP5, NBQX und CGP 35348 wurden GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Stromantworten (IPSCs) pharmakologisch isoliert und bei einem Haltepotential von -50mV aufgezeichnet. Xenon bewirkte keine Veränderung der Amplitude der GABA<sub>A</sub> IPSCs.

GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Stromantworten weisen typischerweise einen biexponentiellen Verlauf der Deaktivierungskurve auf und können durch zwei Zeitkonstanten beschrieben werden. Das Inhalationsanästhetikum Xenon veränderte keine der beiden Zeitkonstanten. Gleichermäßen wurde der Ladungstransfer und somit das Ausmaß der synaptischen Inhibition durch Xenon nicht verändert ( $102,9 \pm 15,5$  % versus Kontrolle).

**Tab. 3.2-1: Das Inhalationsanästhetikum Xenon verändert die Deaktivierungszeitkonstanten und den Ladungstransfer nicht.**

	Kontrolle	1,9 mM Xenon	Auswasch
$\tau_{\text{decay}}$ schnell (ms)	14,2±1,9	13,3±2,1 (#)	16,1±2,7 (##)
$\tau_{\text{decay}}$ langsam (ms)	20,4±2,5	27,5±4,8 (#)	31,2±8,1 (##)
Ladungstransfer (pC)	175,8±27,7	191,3±21,1 (#)	198,2±30,6 (##)

Die Deaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{decay}}$  schnell,  $\tau_{\text{decay}}$  langsam) und der Ladungstransfer wurden durch Xenon nicht beeinflusst. # nicht signifikant versus Kontrolle, ## nicht signifikant versus Xenon, pC = piko-Coulomb.

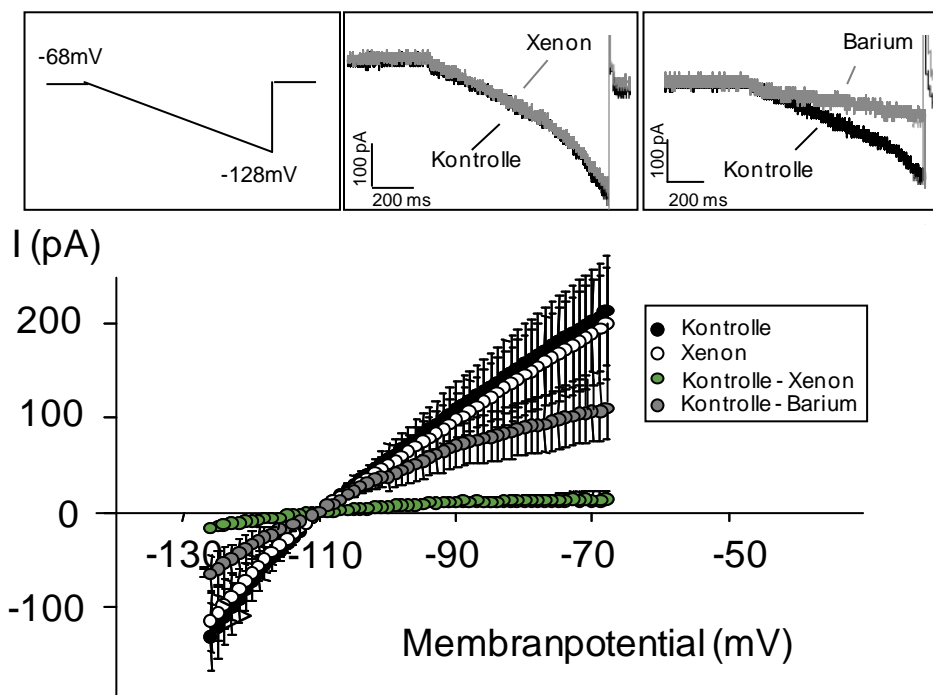


Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

### 3.3 Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

#### 3.3.1 TASK-Rezeptor vermittelte Ströme

TASK-Kanäle gehören zu der  $K_2P$ -Familie, welche weitgehend zeit- und spannungsunabhängig  $K^+$ -Hintergrundströme vermitteln. Im Folgenden werden Hintergrundleitfähigkeiten untersucht, die eine wichtige Rolle in der Konstitution des Membranpotentials spielen und somit funktionell den Aktivitätsmodus thalamischer Neurone bestimmen. TASK-Ströme sind am  $K^+$ -getragenen Auswärtsstrom ( $I_{KSO}$ ) beteiligt, welchen TC-Neurone bei Haltepotentialen zwischen  $-58$  und  $-68$  mV zeigen.  $I_{TASK}$  wurde durch ein Protokoll der basalen Spannungsrampe, bei dem die Membran über 800 ms von  $-68$  mV auf  $-128$  mV hyperpolarisiert wurde, analysiert. Die Offenwahrscheinlichkeit nimmt mit zunehmender Hyperpolarisation ab, weshalb eine Aktivierung der Kanäle das Membranpotential hyperpolarisieren und damit den oszillatorischen Burst-Modus anregen würde. Nach der Applikation von Xenon wurden die jeweiligen Rampenströme, durch graphische Subtraktion der Ströme unter Kontrollbedingungen und während der Xenonapplikation, bestimmt. Das Inhalationsanästhetikum Xenon zeigt keine Wirkung auf TASK-Kanäle, der Subtraktionsstrom (grüne Symbole) ist  $< 5$  pA im Verlauf des Rampenprotokolls.



**Abb. 3.3.1** Das Inhalationsanästhetikum Xenon zeigt keinen Einfluss auf TASK-Rezeptor vermittelte Ströme.

Der Kationenauswärtsstrom durch TASK-Kanäle wurde durch ein Rampenprotokoll von  $-68$  mV auf  $-128$  mV in 800 ms evoziert. Nach Applikation von Xenon wurden durch graphische Subtraktion die

Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

jeweiligen Rampenströme bestimmt, indem die Ströme unter Kontrollbedingungen (schwarze Symbole) von den Strömen während der Xenonapplikation (weiße Symbole) abgezogen wurden. Der Subtraktionsstrom (grüne Symbole) zeigt den Xenon-sensitiven Strom ( $< 5 \text{ pA}$ ). Barium, ein TASK-Kanal Antagonist diente zur Kontrolle, der am Auswärtsstrom beteiligten TASK-Komponente. Graue Symbole zeigen den Barium-sensitiven Anteil des Auswärtsstroms. Die oben abgebildeten Stromspuren sind Originalspuren eines repräsentativen Experiments unter Xenon- und Bariumapplikation.

$\text{Ba}^{2+}$ , ein Inhibitor der TASK-Kanäle wurde zur weiteren Charakterisierung genutzt. Die Applikation von Barium führte zu einer Reduktion des Auswärtsstrom. Die Barium-sensitive Komponente wurde durch anschließende Subtraktion des Stroms unter Barium-Einfluss von dem Strom unter Kontrollbedingungen (Kontrolle-Barium) gewonnen (graue Symbole).

### 3.3.2 Durch native HCN-Rezeptoren vermittelte Ströme

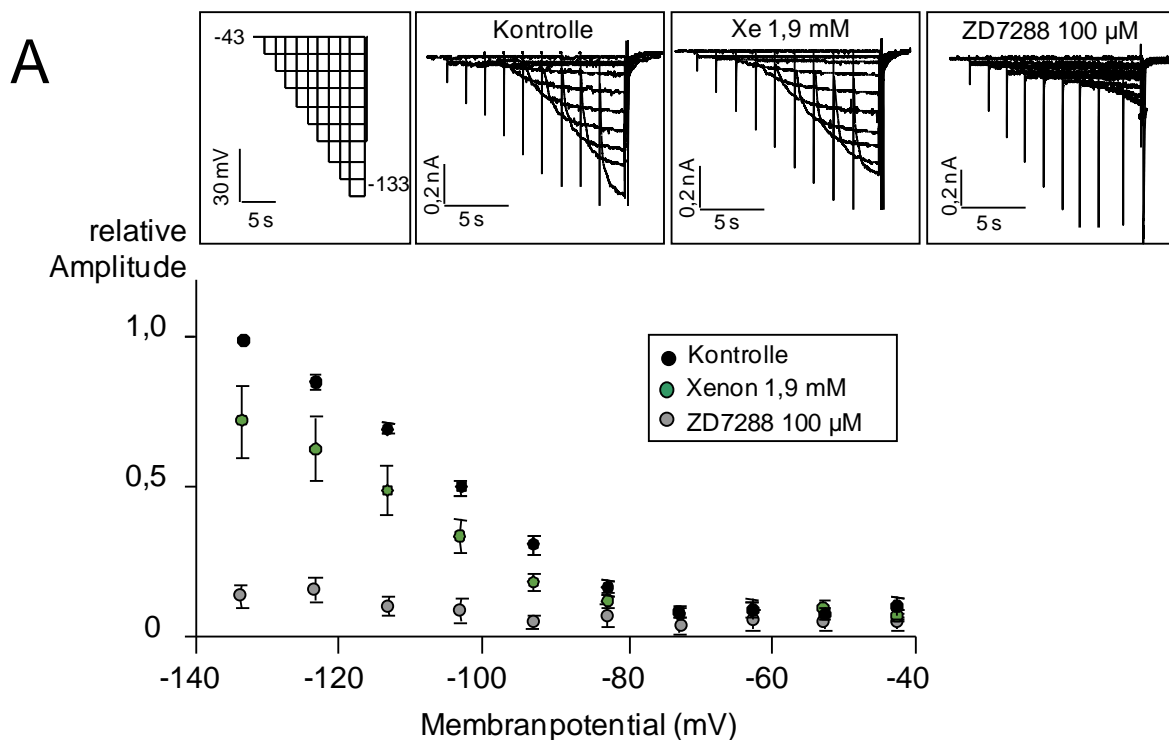
Der  $I_h$  Strom, welcher über HCN-Kanäle vermittelt wird, ist ebenso wie die durch TASK-Kanäle vermittelte Hintergrundleitfähigkeit am Auswärtsstrom der TC-Neuronen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Erregbarkeit der Zellen. Bei Hyperpolarisation vermitteln HCN-Kanäle einen depolarisierenden Einwärtsstrom, der das Membranpotential in depolarisierende Bereiche verschiebt.

Die Aktivierung des  $I_h$  erfolgte durch schrittweise Hyperpolarisation von  $-43 \text{ mV}$  bis  $-133 \text{ mV}$  ( $\Delta mV = 10 \text{ mV}$ ) der Zellmembran in der Ganzzelleableitung im „Voltage-Clamp“-Modus. Mit zunehmender Hyperpolarisation der Zellmembran ist auch eine Zunahme der Amplitude des Einwärtsstroms zu erkennen. Dieser Strom inaktiviert nicht, solange die Membran hyperpolarisiert wird. Nach jedem Spannungssprung wird die Zelle auf ein Bezugspotential von  $-103 \text{ mV}$  gebracht, der Haltestrom blieb zunächst erhöht („Tail“-Ströme) und kehrte durch einen erneuten Spannungssprung auf das Haltepotential ( $-43 \text{ mV}$ ) zurück, wodurch die Deaktivierung der HCN-Kanäle angezeigt wird (Abb.3.3.2.A Einschub links, Spannungsprotokoll). Anhand der Amplituden der „Tail“-Ströme ist es möglich, den Anteil der geöffneten Kanäle und damit die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu bestimmen. Aus der Spannungsabhängigkeit der „Tail“-Ströme erhält man durch eine Normalisierung die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle bei der jeweiligen Membranspannung. Die maximale Offenwahrscheinlichkeit ( $P_{O_{\text{Max}}}$ ) wird auf 1 und die minimale Offenwahrscheinlichkeit ( $P_{O_{\text{Min}}}$ ) auf 0 gesetzt. Die daraus resultierende Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit ist in Abbildung 3.3.2.B dargestellt.

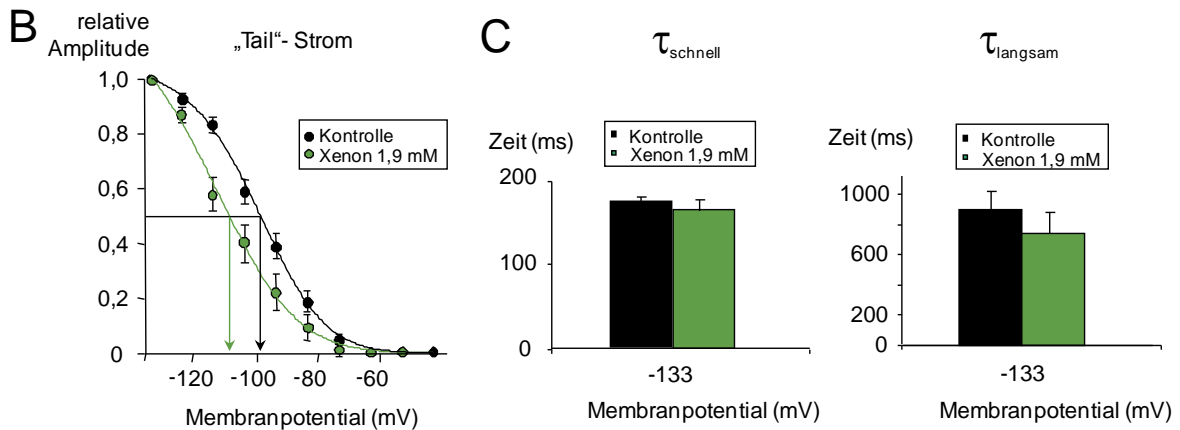
Die Ableitungen wurden in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  ( $150 \text{ }\mu\text{M}$ ) durchgeführt, um eine Beeinflussung von TASK- und einwärts-rektifizierende  $\text{K}^+$ -Strömen ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ; inwardly rectifying) zu verhindern (Meuth et al. 2006). Die Applikation von Xenon führte zu einer signifikanten Verminderung der  $I_h$  Amplitude von  $11,03 \pm 3,3 \%$  ( $-93 \text{ mV}$ ) bis  $31,96 \pm 12,9 \%$  ( $-143 \text{ mV}$ ;  $n=7$ ;

Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

$p < 0,05$  bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen negativer als  $-93$  mV (Abb. 3.3.2.A). Nach Zugabe des HCN-Kanal-Blockers ZD7288 ( $100 \mu\text{M}$ ) verringerte sich signifikant die Amplitude des  $I_h$  Stroms im Bereich von  $4,5 \pm 0,9$  % bis  $84,4 \pm 3,2$  % ( $n=8$ ;  $p < 0,05$  für entsprechende Membranpotentiale) bei Membranpotentialen kleiner als  $-73$  mV. Die spannungsabhängige Aktivierungskurve zeigte unter Kontrollbedingungen einen sigmoiden Verlauf, wohingegen unter Xenonapplikation die Kurve in Bereiche hyperpolarisierender Membranpotentiale verschoben wurde. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$  lag bei  $-99,9 \pm 1,5$  mV ( $n=8$ ) und wurde in Anwesenheit von Xenon auf  $-108,1 \pm 3,6$  mV ( $n=8$ ;  $p=0,042$ ) verschoben (Abb. 3.3.2.B). Die Aktivierungskinetik von HCN-Strömen nimmt mit zunehmender Hyperpolarisation zu und wird typischerweise durch eine biexponentielle Funktion beschrieben. Die Auswertung der spannungsabhängigen Zeitkonstanten  $T_{\text{schnell}}$  und  $T_{\text{langsam}}$  für das Membranpotential  $-133$  mV sind in Abbildung 3.3.2.C dargestellt. Xenon zeigte keinen spannungsabhängigen Einfluss auf die Aktivierungszeitkonstanten  $T_{\text{schnell}}$  und  $T_{\text{langsam}}$  der HCN-Kanäle ( $T_{\text{schnell}}$   $162,8 \pm 10,1$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $1161,2 \pm 433,6$  ms;  $n=6$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $T_{\text{schnell}}$   $178,7 \pm 10,88$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $913,3 \pm 108,0$  ms;  $n=6$ ).



## Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?



**Abb. 3.3.2:** In TC-Neuronen führt Xenon zu einer Reduktion der Amplitude des  $I_h$  und zu einer Verschiebung der Spannungsaktivierungskurve in hyperpolarisierende Bereiche des Membranpotentials, bei unveränderter Aktivierungskinetik.

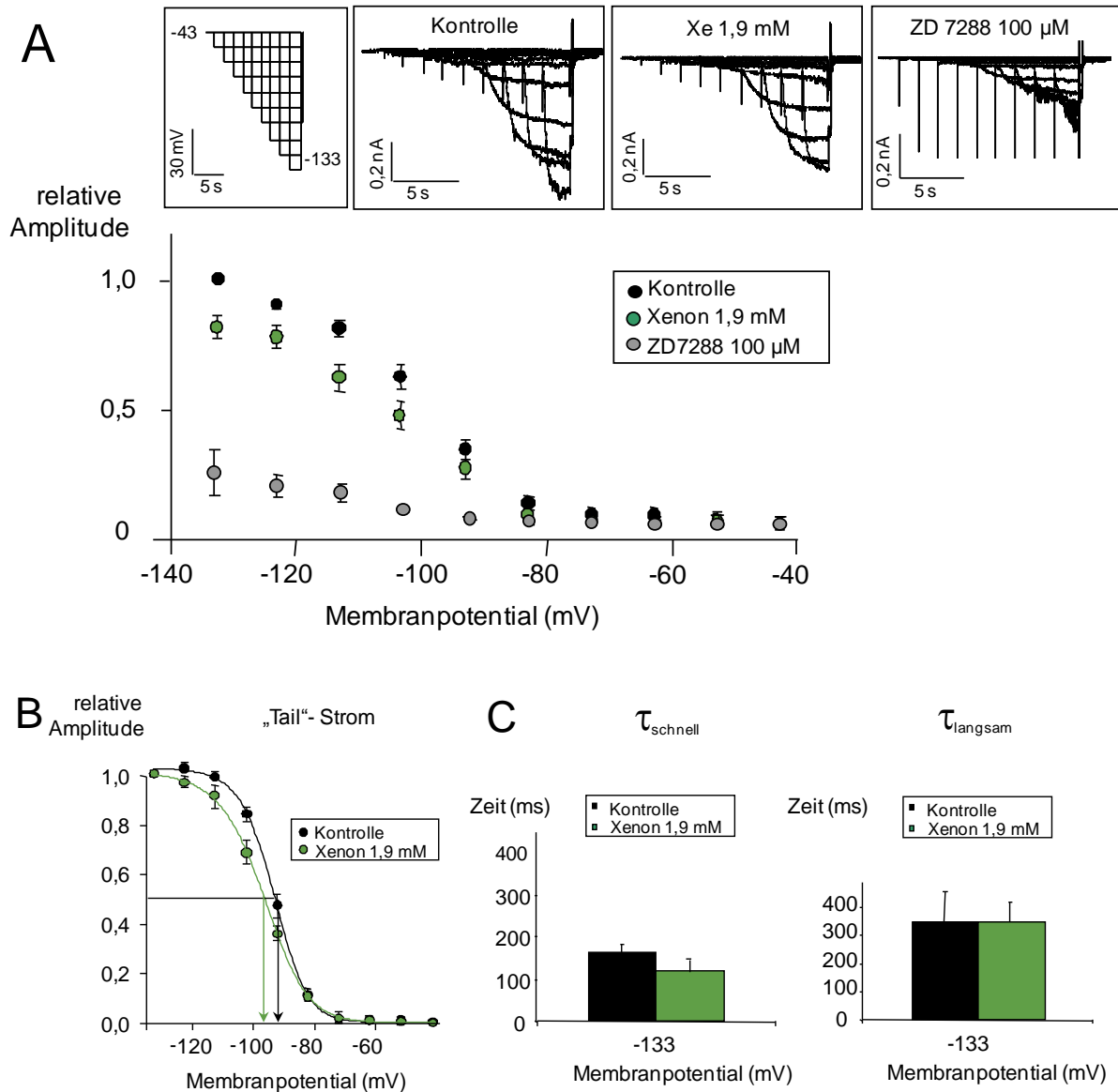
**A:** Der  $I_h$ -Strom wurde durch Spannungssprünge von -43 mV bis -133 mV ( $\Delta mV = 10$  mV) im „Voltage-Clamp“-Modus hervorgerufen. Mit zunehmender Hyperpolarisation steigt die Amplitude des durch Kationen getragenen Einwärtsstroms (schwarze Symbole). Die Applikation von Xenon führte spannungsabhängig zu einer signifikanten Verminderung der Amplitude bei Membranpotentialen kleiner -93 mV ( $11,0 \pm 3,3$  % bis  $32,0 \pm 12,9$  %;  $n=7$ ;  $p < 0,05$ ; grüne Symbole). Der HCN-Kanal-Blocker ZD7288 inhibiert die Amplitude des  $I_h$  Stroms signifikant (graue Symbole). Die oben abgebildeten Stromspuren zeigen ein repräsentatives Experiment unter Kontrollbedingungen, Xenon- und ZD7288-Applikation, sowie das verwendete Spannungsprotokoll. **B:** Nach jedem Spannungsschritt wird die Zelle auf ein Bezugspotential (-103 mV) gebracht, aus welchem die „Tail-Ströme“ analysiert werden können. „Tail“-Strom Amplituden wurden dann normalisiert und gegen das jeweilige Membranpotential aufgetragen. Mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung wurde eine spannungsabhängige Aktivierungskurve erstellt. Die Applikation von Xenon (grüne Symbole) führt im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (schwarze Symbole) zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve in hyperpolarisierende Bereiche der Membranpotentiale. Die halbmaximale Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) des nativen HCN-Kanals unter Kontrollbedingungen lag bei  $-99,9 \pm 1,6$  mV ( $n=7$ ) und wurde unter Xenonapplikation in Richtung negativerer Membranpotentiale um  $-108,1 \pm 1,5$  mV ( $n=7$ ;  $p=0,042$ ) signifikant verschoben. **C:** Die Aktivierungskonstanten  $\tau_{\text{schnell}}$  und  $\tau_{\text{langsam}}$  wurden bei einem Potential von -133 mV analysiert. Die Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle änderte sich durch Applikation von Xenon nicht signifikant.

### 3.3.3 Durch heterolog exprimierte mHCN2-Rezeptoren vermittelte Ströme

Für die Verifizierung und den Vergleich der Wirkung von Xenon auf native HCN-Kanäle in TC-Neuronen wurden im folgenden HEK-Zellen unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen und Spannungsprotokoll der stabil transfizierten mHCN2-HEK Zelllinie elektrophysiologisch untersucht. Die Applikation von Xenon führte zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude der  $I_h$ -Ströme bei Membranpotentialen kleiner -103 mV (Abb.3.3.3 A). Die Amplitude verringerte sich von  $9,5 \pm 4,0$  % (-93 mV) bis  $16,1 \pm 3,9$  % (-143 mV  $n=10$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Der Antagonist ZD7288 (100  $\mu$ M) inhibierte HCN2-Rezeptor vermittelte Ströme signifikant auf  $5,4 \pm 2,9$  % bis  $78,3 \pm 8,5$  % bei Membranpotentialen von -73 mV bis -133 mV.  $V_{1/2}$  lag unter Kontrollbedingungen bei  $-93,9 \pm 0,8$  mV ( $n=11$ ) und wurde in Anwesenheit von Xenon auf  $-98,7 \pm 1,5$  mV ( $n=11$ ;  $p=0,021$ ) (Abb. 3.3.3.B) verschoben. Abbildung 3.3.3.C stellt die Analyse der biexponentiellen Zeitaktivierungskonstanten  $T$  dar. Die Aktivierungskinetik der

Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

heterolog exprimierten mHCN2-Rezeptor vermittelten Ströme ( $T_{\text{schnell}}$ :  $162,3 \pm 20,5$  ms;  $T_{\text{langsam}}$ :  $346,6 \pm 110,7$  ms;  $n=11$ ) wurde durch das Inhalationsanästhetikum Xenon nicht beeinflusst ( $T_{\text{schnell}}$ :  $116,4 \pm 29,1$  ms;  $T_{\text{langsam}}$ :  $348,4 \pm 72,6$  ms;  $n=11$ ) und unterschieden sich nicht signifikant von der Aktivierungskinetik nativer HCN-Kanäle in TC-Neurone.



**Abb.3.3.3: In heterolog exprimierten mHCN2-Kanälen führt Xenon zu einer Reduktion der Amplitude des  $I_h$  und zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in hyperpolarisierende Bereiche des Membranpotentials, bei unveränderter Aktivierungskinetik.**

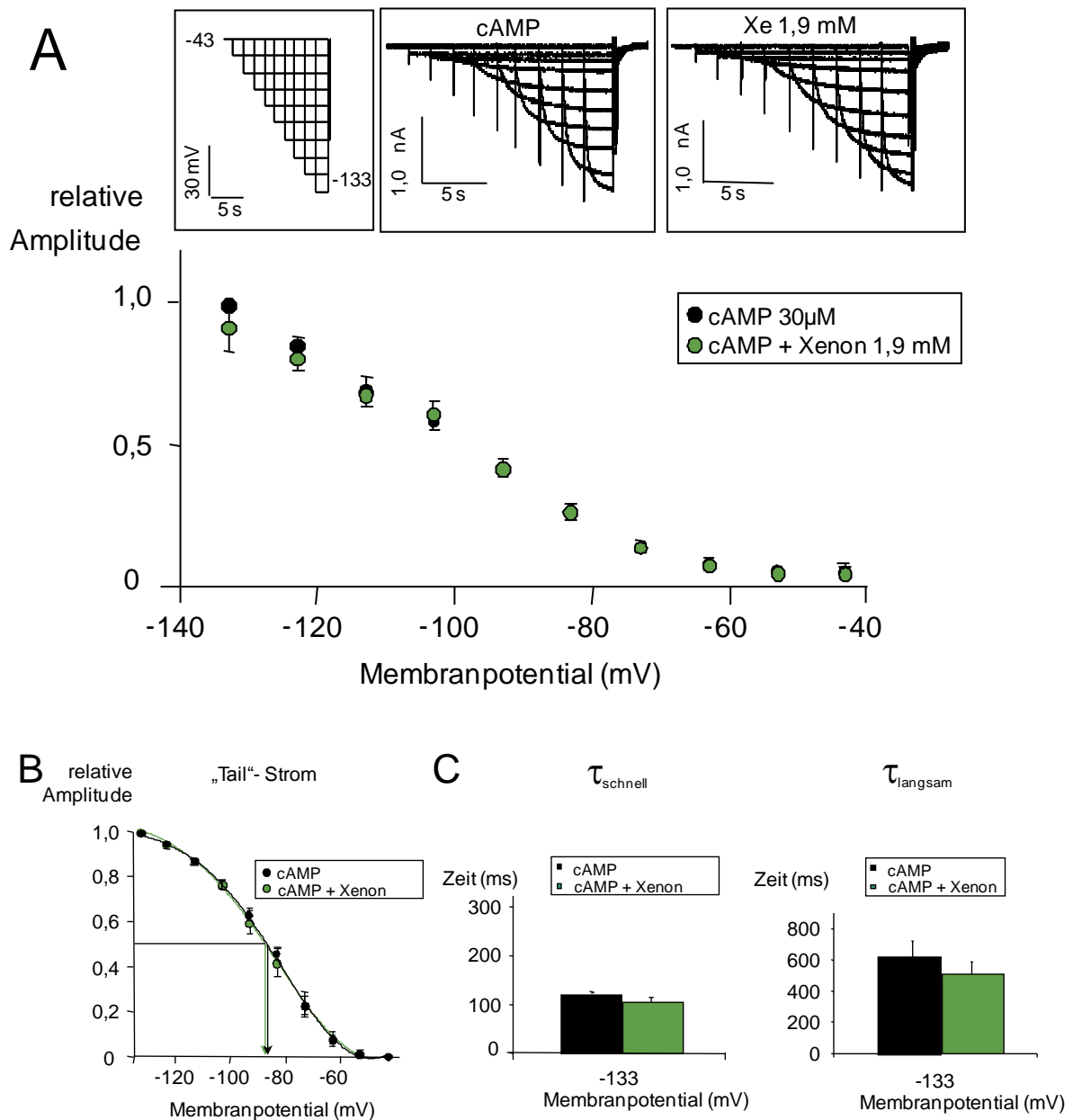
**A:** Die Applikation von 1,9 mM Xenon führte in m-HCN2-Hek Zellen zu einer signifikanten Verminderung der  $I_h$ -Amplitude bei Membranpotentialen von  $-103$  mV bis  $-133$  mV ( $9,5 \pm 0,9$  % bis  $16,1 \pm 3,9$  % ( $n=10$ ,  $p < 0,05$  für die jeweiligen Membranpotentiale). In Anwesenheit des HCN-Kanal-Blockers ZD7288 wurde die  $I_h$ -Amplitude signifikant inhibiert ( $5,4 \pm 2,9$  % bis  $78,2 \pm 8,5$  %;  $n=4$ ;  $p < 0,05$  für Membranpotentiale von  $-73$  mV bis  $-133$  mV). Die oben abgebildeten Stromspuren zeigen ein repräsentatives Experiment unter Xenon- und ZD7288-Applikation. **B:** Das Inhalationsanästhetikum Xenon verschiebt die Aktivierungskurve in Richtung negativer Membranpotentiale. Die halbmaximale Aktivierung der exprimierten Isoform HCN2 lag unter Kontrollbedingungen bei  $-93,9 \pm 0,8$  mV ( $n=10$ ) und wurde unter Xenonapplikation signifikant auf  $-98,7 \pm 1,5$  mV ( $n=10$ ;  $p=0,021$ ) verschoben. **C:** Die Aktivierungskinetik der mHCN2-Ströme wird durch Xenon nicht verändert.

Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

### 3.3.4 Wirkung von Xenon auf native cAMP-modulierte HCN-Kanal vermittelte Ströme

$I_h$ -Kanäle weisen im C-terminalen Ende eine CNBD-Bindestelle für zyklische Nukleotide auf. Die Erhöhung der Konzentration von cAMP verschiebt bei HCN-Isoformen 1, 2 und 4 die Aktivierungsschwelle in positivere Richtung und umgekehrt führt eine ausbleibende cAMP-Bindung durch Absenken der Konzentration zu einer Verschiebung in Richtung negativerer Membranpotentiale. Für die folgenden Experimente wurde 30  $\mu\text{M}$  cAMP der Intrazellulärlösung beigegeben, um eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration und somit eine Sättigung der HCN-Kanäle mit cAMP zu erreichen. In TC-Neuronen wurde die halbmaximale Aktivierung durch Anwesenheit von 30  $\mu\text{M}$  cAMP in depolarisierte Bereiche auf  $-87,3 \pm 1,6$  mV ( $n=6$ ;  $p < 0,001$ ) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ( $-99,9 \pm 2,5$  mV;  $n=8$ ) verschoben. Die Bindung von cAMP erleichtert das spannungsabhängige Öffnen der Kanäle und beschleunigt zudem die Aktivierungskinetik. Die Aktivierungszeitkonstanten  $T_{\text{schnell}}$  ( $118,6 \pm 7,2$  ms) und  $T_{\text{langsam}}$  ( $614,3 \pm 100,7$  ms,  $n=5$ ;  $p=0,001$ ) wurden in Anwesenheit von cAMP verlängert (Kontrolle:  $T_{\text{schnell}}$   $178,7 \pm 10,88$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $913,3 \pm 108,0$  ms;  $n=5$ ;  $p=0,311$ ).

Die Applikation von Xenon zeigte keinen Einfluss auf die Amplitude der HCN-Rezeptor vermittelten  $I_h$ -Ströme in Anwesenheit von 30  $\mu\text{M}$  cAMP. Die halbmaximale Aktivierung der  $I_h$ -Kanäle lag unter Kontrollbedingungen bei  $-86,2 \pm 1,6$  mV und während Xenon-Applikation bei  $-87,1 \pm 2,4$  mV ( $n=5$ ). Die Aktivierungskinetik blieb in Anwesenheit von intrazellulärem cAMP und Xenon-Applikation unverändert ( $T_{\text{schnell}}$   $101,4 \pm 11,4$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $506,2 \pm 80,9$  ms ( $n=6$ ;  $p=0,380$ )).



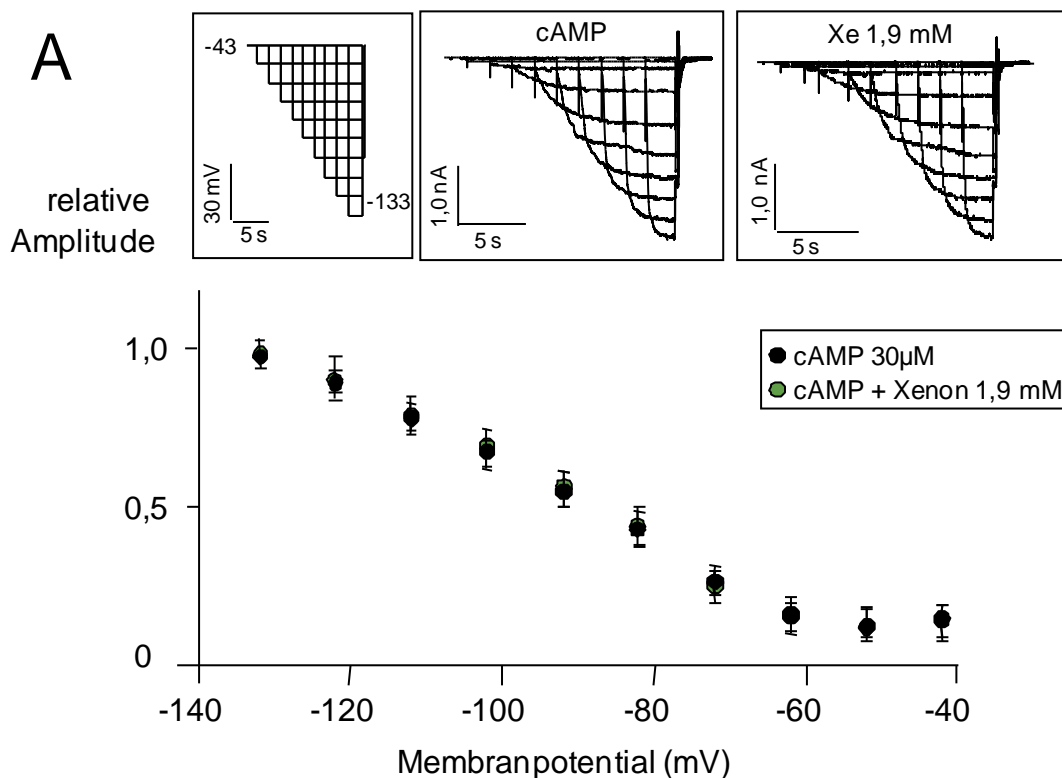
**Abb.3.3.4:** In TC-Neuronen bewirkt Xenon keine Veränderung der  $I_h$ -Amplitude, der Spannungsaktivierungskurve sowie der Aktivierungszeitkonstanten auf native cAMP-modulierte HCN-Rezeptor vermittelte Ströme.

**A:** Die Applikation des Inhalationsanästhetikums Xenon beeinflusste nicht die Amplitude der  $I_h$ -Ströme in Anwesenheit von 30  $\mu$ M cAMP. Repräsentative Stromspuren in Anwesenheit von cAMP sind im Einschub dargestellt. **B:** Xenon zeigte keine Wirkung auf  $V_{1/2}$  ( $-87,1 \pm 2,4$  mV versus  $-86,1 \pm 1,6$  mV unter Kontrollbedingungen;  $n=5$ ) **C:** Die Aktivierungszeitkonstanten  $T$  bei einem Membranpotential von  $-133$  mV wurden nicht vergrößert  $T_{\text{schnell}}$   $101,4 \pm 11,4$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $506,2 \pm 80,9$  ms ( $n=5$ ;  $p=0,427$ ).

Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

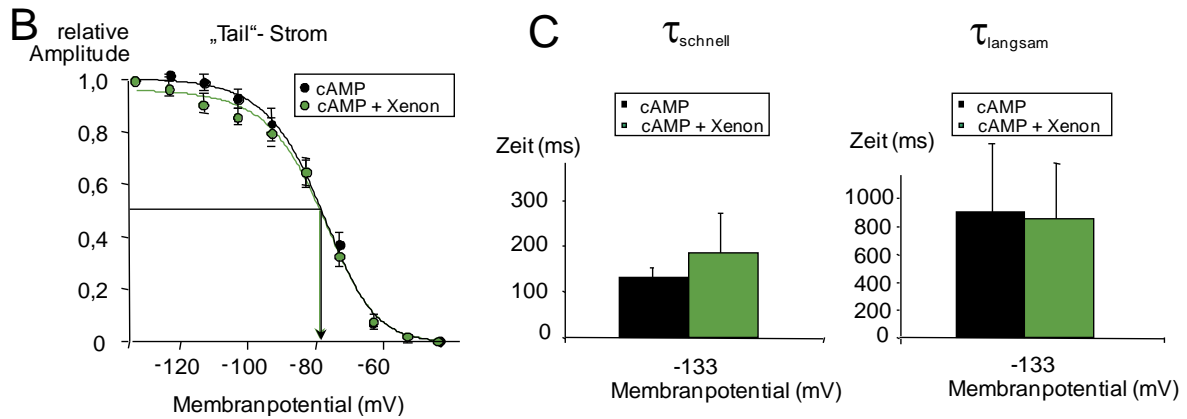
### 3.3.5 Wirkung von Xenon auf cAMP-modulierte mHCN2-Rezeptor vermittelte Stromantworten in HEK-Zellen

In TC-Neuronen zeigte die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Xenon auf HCN-Rezeptor vermittelte Ströme eine Abhängigkeit von der intrazellulären cAMP-Konzentration. In einer weiteren Experimentserie sollte untersucht werden, ob sich diese cAMP-Abhängigkeit auch bei Stromantworten von heterolog exprimierten mHCN2-Rezeptoren zeigt. Xenon zeigte keine Wirkung auf die Amplitude der  $I_h$ -Ströme, im Bereich von -93 mV bis -133 mV unter erhöhtem intrazellulärem cAMP-Gehalt (Zugabe von 30  $\mu$ M cAMP).  $V_{1/2}$  der mHCN2-Kanäle wurde in Anwesenheit von cAMP und Xenon nicht verschoben ( $-76,8 \pm 1,6$  %; im Vergleich zur Kontrolle  $-78,5 \pm 1,7$  %;  $n=10$ ). Die Aktivierungszeitkonstanten  $T_{\text{schnell}}$  und  $T_{\text{langsam}}$  blieben unverändert ( $T_{\text{schnell}}$ : Kontrolle:  $129,3 \pm 21,9$  ms versus Xenon:  $187,6 \pm 83,8$  ms;  $T_{\text{langsam}}$ : Kontrolle:  $909,1 \pm 458,2$  ms versus Xenon:  $860,1 \pm 390,3$  ms;  $n=8$ ). Die von der cAMP-Konzentration abhängige Wirkung von Xenon auf HCN-Rezeptor vermittelte Ströme in TC-Neuronen konnte für mHCN2-Rezeptoren in heterologen Genexpressionssystemen also bestätigt werden.





## Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

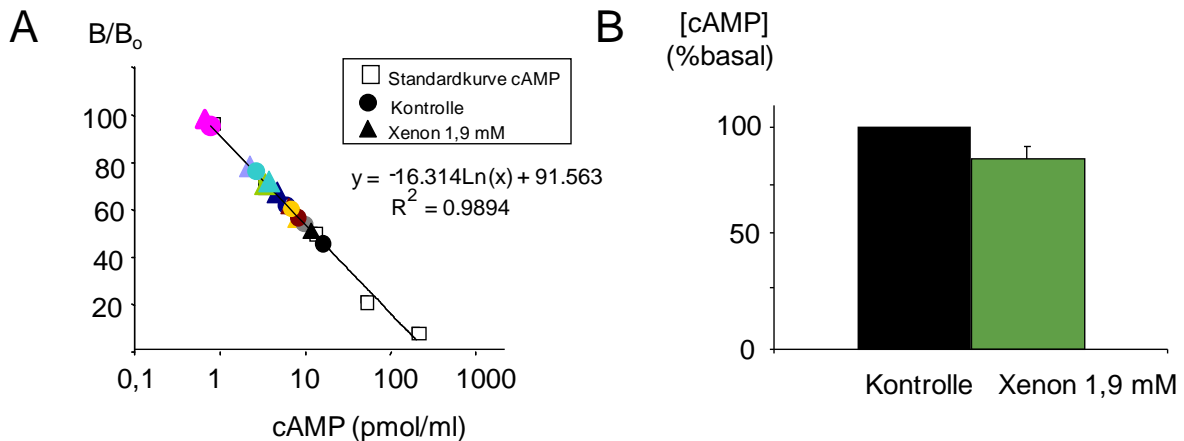


**Abb. 3.3.5: An heterolog exprimierten mHCN2-Kanälen bewirkte Xenon keine Veränderung der Stromamplitude des  $I_h$ , der Spannungsabhängigkeit, sowie der Kinetik in cAMP-modulierten mHCN2-Rezeptor vermittelten Stromantworten in HEK-Zellen.**

**A:** Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verhinderte eine Wirkung des Inhalationsanästhetikums Xenon an mHCN2-Rezeptoren in HEK-Zellen. Die Amplituden, der über mHCN2-Rezeptoren vermittelten  $I_h$ -Ströme, wurden durch die Applikation von Xenon nicht beeinträchtigt. Im Einschub sind repräsentative Stromspuren in Anwesenheit von cAMP dargestellt. **B:**  $V_{1/2}$  der spannungsabhängigen Aktivierungskurve lag bei Applikation von cAMP ( $-76,8 \pm 1,6$  %) und wurde durch Ko-Applikation von Xenon nicht verändert ( $76,8 \pm 1,6$  %;  $n=10$ ). **C:** Die Aktivierungskinetik wurde unter Xenon-Zufuhr bei einem Membranpotential von  $-133$  mV ( $T_{\text{schnell}} 187,6 \pm 83,8$  ms;  $T_{\text{langsam}} 860,1 \pm 390,3$  (n=6) nicht beeinflusst.

### 3.3.6 Xenon senkt die basale intrazelluläre cAMP Menge

Aufgrund der cAMP-abhängigen Wirkung von Xenon auf HCN-Rezeptor vermittelte Ströme wurde untersucht, ob Xenon die intrazelluläre cAMP-Konzentration in mHCN2-HEK Zellen verändert. Hierfür wurde ein immunologisches Verfahren beruhend auf dem Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) verwendet. Die cAMP-Konzentration wurde in mHCN2-HEK Zellen in Doppelbestimmungen gemessen. In Abhängigkeit der Zellzahl und der inkubierten Proben variieren die Ergebnisse der cAMP-Konzentrationen zwischen 1 und 10 pmol/ml innerhalb der Einzelexperimente. Die Zufuhr von Xenon (dreieckige Symbole) bewirkt eine Senkung der cAMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (runde Symbole mit entsprechender Farbkodierung; Abb. 3.3.6 A). In Abbildung 3.3.6 B ist die basale cAMP-Menge in Ab- und Anwesenheit von Xenon dargestellt.



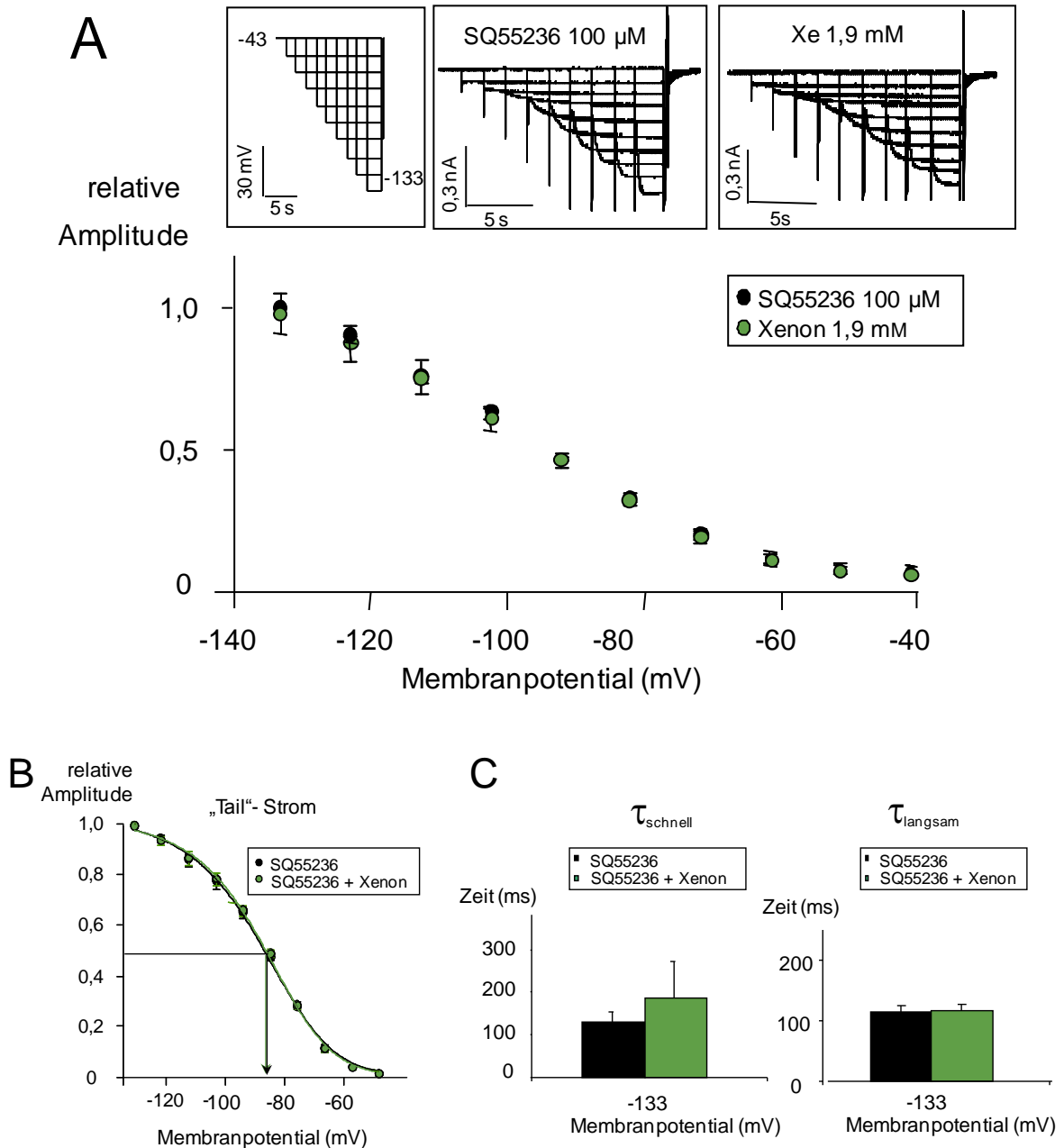
**Abb. 3.3.6 Xenon senkt die intrazelluläre cAMP-Menge in mHCN2-HEK Zellen**

Die Menge des intrazellulären cAMP wurde mithilfe der ELISA-Technik bestimmt. **A:** Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Quadrate bilden eine Standardkurve, aus welcher anhand  $B/B_0$  die cAMP-Konzentrationen bestimmt werden konnten. Runde Symbole entsprechen den Proben, die mit Kontrollgas inkubiert, die Dreiecke, den Proben die mit dem Xenongasgemisch inkubiert wurden. **B:** Xenon senkt die basale Menge an [cAMP] in mHCN2-HEK-Zellen signifikant ( $85,7 \pm 6,0$  %;  $n=9$ ;  $p=0,031$ ).

### 3.3.7 Wirkung von Xenon auf HCN-Rezeptor vermittelte Stromantworten in Anwesenheit des Adenylatzyklase-Inhibitors SQ55236 in TC-Neuronen

Die Senkung der intrazellulären cAMP-Menge durch Xenon könnte aus der Inhibition bzw. Modulation der Adenylatzyklasen (AC) resultieren. Im folgendem wurden HCN-Rezeptor vermittelte Ströme in TC-Neuronen im Schnittpräparat gemessen, welche mit dem AC-Inhibitor SQ55236 (100  $\mu$ M) präinkubiert waren. In Anwesenheit von  $Ba^{2+}$  (150  $\mu$ M) und SQ55236 lag  $V_{1/2}$  bei  $-91,9 \pm 5,1$  mV ( $n=8$ ). Die Applikation des Inhalationsanästhetikums Xenon führte zu keiner Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve ( $-91,8 \pm 5,0$  mV;  $n=8$ ;  $p=0,54$ ) und zeigte keine Wirkung auf die Amplitude der  $I_h$ -Ströme. Die Zeitkonstanten der Aktivierungskinetik  $T_{\text{schnell}}$   $116,5 \pm 11,7$  ms und  $T_{\text{langsam}}$   $717,2 \pm 118,1$  ms ( $n=7$ ) blieben im Vergleich zu den Kontrollbedingungen  $T_{\text{schnell}}$   $113,6 \pm 11,7$  ms und  $T_{\text{langsam}}$   $580,9 \pm 118,1$  ms ( $n=7$ ) unverändert. Xenon zeigte also in Anwesenheit von SQ55236 keine Wirkung auf HCN-Rezeptor vermittelte Stromantworten.

## Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?



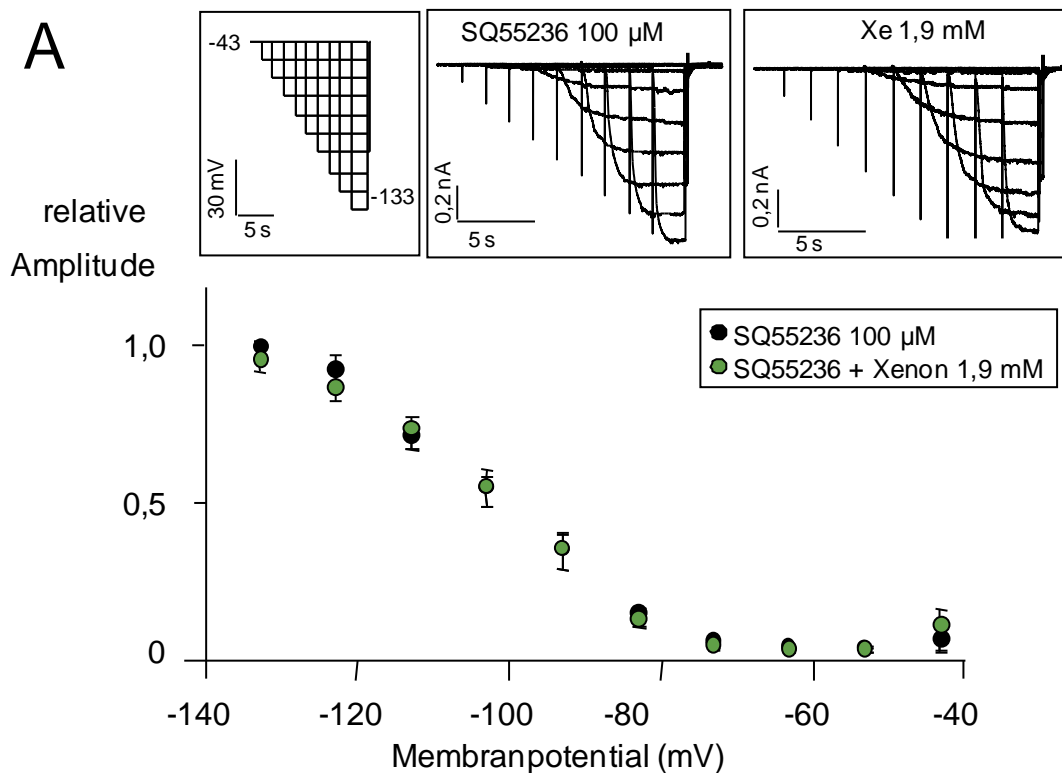
**Abb. 3.3.7:** In Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ55236 zeigte Xenon keine Wirkung auf die Amplitude der  $I_h$ -Ströme, die Spannungsabhängigkeit und die Aktivierungszeitkonstanten in TC-Neuronen.

**A:** Thalamokortikale Schnittpräparate wurden mit dem AC-Inhibitor SQ55236 präinkubiert. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung der Amplitude der HCN-Rezeptor vermittelten Ströme. Repräsentative Stromspuren eines Experiments sind im Einschub dargestellt. **B:** In Anwesenheit von SQ55236 (100  $\mu$ M) lag  $V_{1/2}$  bei  $-91,9 \pm 5,1$  mV ( $n=8$ ). Xenon Applikation zeigte keine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve ( $-91,8 \pm 5,0$  mV;  $n=8$ ;  $p=0,54$ ). **C:** Die Aktivierungskinetik wurde unter Koapplikation von SQ55236 und Xenon nicht verändert ( $T_{\text{schnell}}$   $116,5 \pm 11,7$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $717,2 \pm 118,1$  ms vs.  $T_{\text{schnell}}$   $113,6 \pm 11,7$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $580,9 \pm 118,1$  ms ( $n=7$ )).

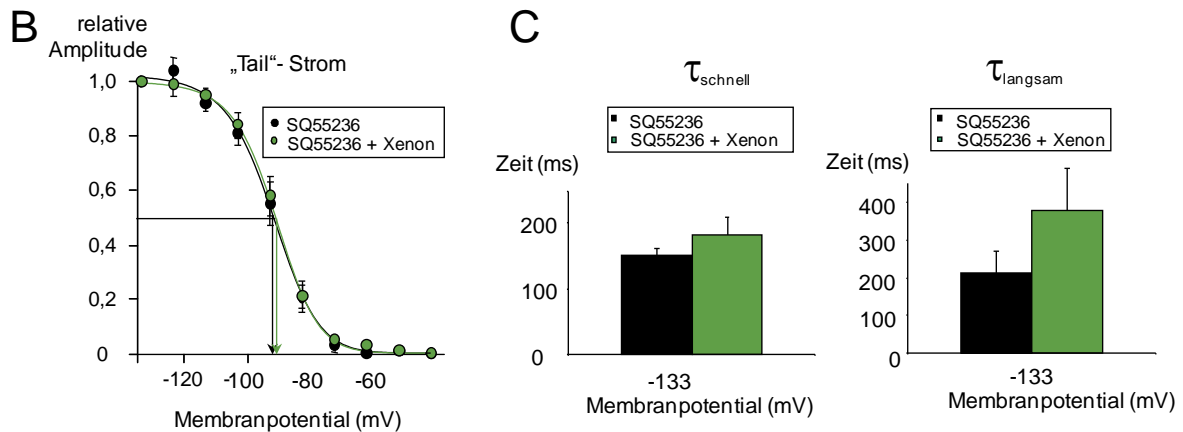
Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?

### 3.3.8 Wirkung von Xenon auf mHCN2-Rezeptor vermittelte Stromantworten in Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ55236 in HEK-Zellen

Im folgendem wurden mHCN2 HEK Zellen in Anwesenheit des AC-Inhibitor SQ55236 (100  $\mu\text{M}$ ) untersucht, um die Wirkung von Xenon in TC-Neuronen in Anwesenheit des Inhibitors zu verifizieren. In Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  (150  $\mu\text{M}$ ) und SQ55236 lag  $V_{1/2}$  bei  $-93,2 \pm 2,4$  mV ( $n=7$ ). Die Applikation von Xenon beeinflusste weder die Spannungsaktivierungskurve ( $-93,1 \pm 2,5$  mV) noch die Amplitude der  $I_h$ -Ströme. Die Aktivierungskinetik  $T_{\text{schnell}}$  149,7  $\pm 11,0$  ms und  $T_{\text{langsam}}$  215,1  $\pm 55,0$  ms ( $n=5$ ) zeigte in Anwesenheit von Xenon keine Veränderung ( $T_{\text{schnell}}$  182,1  $\pm 26,6$  ms;  $T_{\text{langsam}}$  378,8  $\pm 113,8$  ms; Abb.3.3.8). Die Xenon-vermittelte Inhibition der HCN-Kanäle wurde in Anwesenheit des AC-Inhibitors in TC-Neuronen und mHCN2 HEK Zellen aufgehoben.



## Beeinflusst Xenon die an der Konstitution des Membranpotentials beteiligten Kanäle in TC-Neuronen?



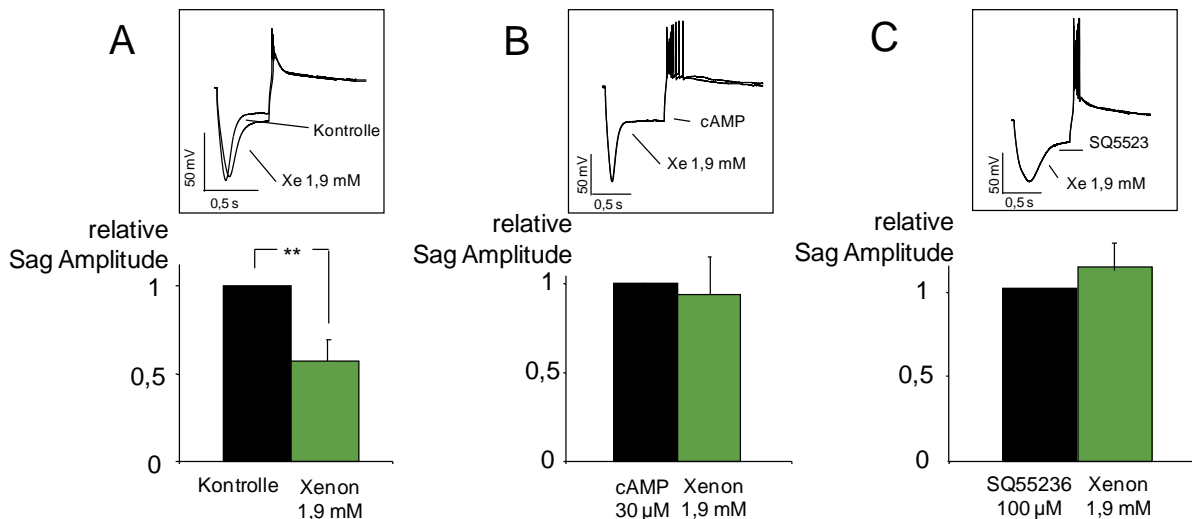
**Abb. 3.3.8:** In Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ55236 zeigte Xenon keine Wirkung auf die Amplitude der  $I_h$ -Ströme, die Spannungsabhängigkeit und der Aktivierungszeitkonstanten in mHCN2 HEK Zellen.

**A:** mHCN2 HEK Zellen wurden mit dem AC-Inhibitor SQ55236 präinkubiert. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung der Amplitude der HCN-Rezeptor vermittelten Ströme. Repräsentative Stromspuren eines Experiments sind im Einschub dargestellt. **B:** In Anwesenheit von SQ55236 (100  $\mu\text{M}$ ) lag  $V_{1/2}$  bei  $-93,2 \pm 2,4$  mV. Xenon Applikation zeigte keine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve  $-93,1 \pm 2,5$  mV;  $n=8$ ;  $p=0,9$ . **C:** Die Aktivierungskinetik wurde unter Koapplikation von SQ55236 und Xenon nicht verändert ( $T_{\text{schnell}}$   $149,7 \pm 11,0$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $215,1 \pm 55,0$  ms vs.  $T_{\text{schnell}}$   $182,1 \pm 26,6$  ms;  $T_{\text{langsam}}$   $378,8 \pm 113,8$  ms ( $n=5$ ).

### 3.3.9 HCN Kanal vermittelter „voltage sag“

Ein charakteristisches Merkmal von TC-Neuronen ist der „voltage sag“. Experimentell durch eine Strominjektion induzierte Membranhyperpolarisation lässt sich eine transiente Depolarisation auslösen. Mit zunehmender Hyperpolarisation wird der einwärts gerichtete Kationenstrom immer stärker, wodurch die Hyperpolarisation kontinuierlich abnimmt („voltage sag“). Diese transiente Depolarisation beruht auf der langsamen Deaktivierungskinetik der HCN-Kanäle (Bayliss et al. 1994) und resultiert in einem stationären Plateau.

Die Ganzzelleableitungen wurden im „Current-Clamp“-Modus in Anwesenheit von  $\text{Ba}^{2+}$  durchgeführt, um einwärts-rectifizierende Kalium-Kanäle ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ) zu inhibieren. Die Applikation von Xenon führte zu einer signifikanten Verminderung der Amplitude der Potentialdifferenz, welche durch den einwärts gerichteten  $I_h$ -Strom getragen wird und das Membranpotential in Richtung depolarisierende Werte ( $57,1 \pm 12,4$  %;  $n=5$ ;  $p=0,008$ ) (Abb.3.3.9.A) verschiebt.



**Abb. 3.3.9: Xenon bewirkt eine Verminderung der Amplitude der Potentialdifferenz unter Kontrollbedingungen. Unter erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration, sowie unter Präinkubation der Schnittpräparate mit dem AC Inhibitor SQ55236 wird die Wirkung von Xenon auf die Amplitude der Potentialdifferenz in TC-Neuronen aufgehoben.**

**A:** Xenon bewirkt eine signifikante Reduktion, der durch Membranhyperpolarisation induzierten Potentialdifferenz, getragen durch den einwärts gerichteten Kationenstrom ( $57,1 \pm 12,4$  %;  $n=5$ ;  $p=0,008$ ). **B:** Unter erhöhter cAMP-Konzentration in der Pipette wurde von Xenon die Amplitude des „voltage sag“ nicht verändert ( $94,2 \pm 20,9$  % versus Kontrolle;  $n=5$ ;  $p=0,78$ ). **C:** Nach Inhibition der AC durch SQ55236 hatte Xenon keine Wirkung auf die Amplitude der Potentialdifferenz. In den Einschüben sind jeweils repräsentative Originalspuren dargestellt.

Unter erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration führte die Applikation von Xenon zu keiner Änderung der Potentialdifferenz ( $94,2 \pm 0,21$  %;  $n=5$ ; Abb. 3.3.9.B). HCN-Kanäle werden offensichtlich in Abhängigkeit von der intrazellulären cAMP Konzentration blockiert. Auch unter Blockade der AC hatte Xenon keinen Einfluss auf die Sag-Amplitude ( $112,5 \pm 18,1$  %,  $n=5$ ,  $p=0,5$ ; Abb. 3.3.9.C). Xenon zeigte, wie in den „Voltage-Clamp“-Messungen, keine Wirkung auf die durch HCN-Kanäle vermittelte transiente Depolarisation (sag) in Anwesenheit von SQ55236, was auf eine cAMP-abhängige Wirkung von Xenon schließen lässt.

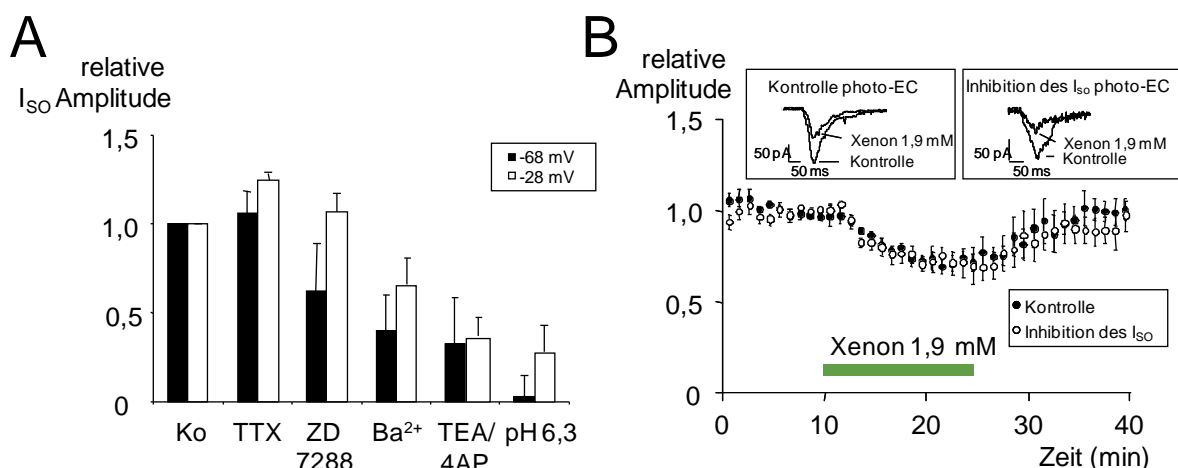
### 3.4 Stehender Auswärtsstrom in TC-Neuronen

TC-Neurone zeigen im Bereich des physiologischen Ruhemembranpotentials einen auswärtsgerichteten Kationenstrom („standing outward current,  $I_{so}$ ) an dem unterschiedliche Ionenkanäle beteiligt sind. Zum stehenden Auswärtsstrom tragen anhaltende  $Na^+$ -Ströme, einwärts-gleichrichtende  $K^+$ -Ströme und HCN-Kanal vermittelte Ströme bei (Meuth et al. 2006).

Im folgendem sollte geklärt werden, ob die Xenon-bedingte Reduktion der exzitatorischen synaptischen Transmission abhängig von einer eventuellen Modulation der zum  $I_{so}$  beitragenden Kanäle ist.

Bei einem Haltepotential von -68 mV wurde unter sukzessiver Zugabe spezifischer Antagonisten ein pharmakologisches Profil des  $I_{SO}$  erstellt. Um die Amplitude des  $I_{SO}$  zu vergrößern, wurde dieser zusätzlich bei einem positiveren, depolarisierten Membranpotential von -28 mV aufgezeichnet.  $I_{SO}$  lag bei einem Membranpotential von -68 mV (-28 mV) bei  $34,8 \pm 13,7$  ( $157,5 \pm 24,9$  pA; jeweils  $n=6$ ). Die Applikation von TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) führte bei einem Membranpotential von -28 mV zu einer Zunahme des  $I_{SO}$  auf  $122,3 \pm 8,1$  % ( $n=6$ ), eine zusätzliche Zugabe von ZD7288 ( $100 \mu\text{M}$ ) verringerte den  $I_{SO}$  auf  $115,2 \pm 26,9$  % ( $n=6$ ). In Anwesenheit von TTX und ZD7288 wurden  $\text{Ba}^{2+}$  ( $150 \mu\text{M}$ ) und TEA/4AP ( $6 \text{ mM}$ ) appliziert. Dies führte zu einer weiteren Reduktion des  $I_{SO}$  auf  $62,7 \pm 7,9$  % ( $n=6$ ) und  $28,5 \pm 20,7$  % ( $n=6$ ). Die Veränderung des pH-Wertes des ACSF von 7,3 auf 6,3 bewirkte eine weitere Verminderung der Stromamplitude auf  $26,6 \pm 10,6$  % ( $n=6$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.4.1 A).

Nach Erstellung dieses pharmakologischen Profils des  $I_{SO}$  wurde die Xenonwirkung auf die basale synaptische Transmission in TC-Neuronen untersucht, und zwar ohne und in Gegenwart oben genannter Inhibitoren des  $I_{SO}$ . Durch photolytische Stimulation wurden postsynaptische Stromantworten bei einem Haltepotential von -70 mV evoziert. 15 minütige Xenonapplikation führte zu einer Reduktion der Summen-photo-EC auf  $72,1 \pm 4,2$  % ( $n=6$ ;  $p < 0,001$ ). Nach Beendigung der Xenonapplikation erreichte die Amplitude der Antworten wieder Ausgangsniveau (Abb. 3.4.1.B. schwarze Symbole). Wurde der  $I_{SO}$  inhibiert, blieb die durch Xenon induzierte Reduktion der photo-EC Amplituden unverändert ( $68,6 \pm 5,2$  %;  $n=6$ ;  $p < 0,001$ ;  $I_{SO}$  versus ohne  $I_{SO}$ :  $p=0,77$ ). Die Wirkung von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission ist also unabhängig von einer Modulation der zum  $I_{SO}$  beitragenden Kanäle.



**Abb. 3.4.1: Die Xenon induzierte Reduktion der basalen synaptische Transmission ist unabhängig vom stehenden Auswärtsstrom.**

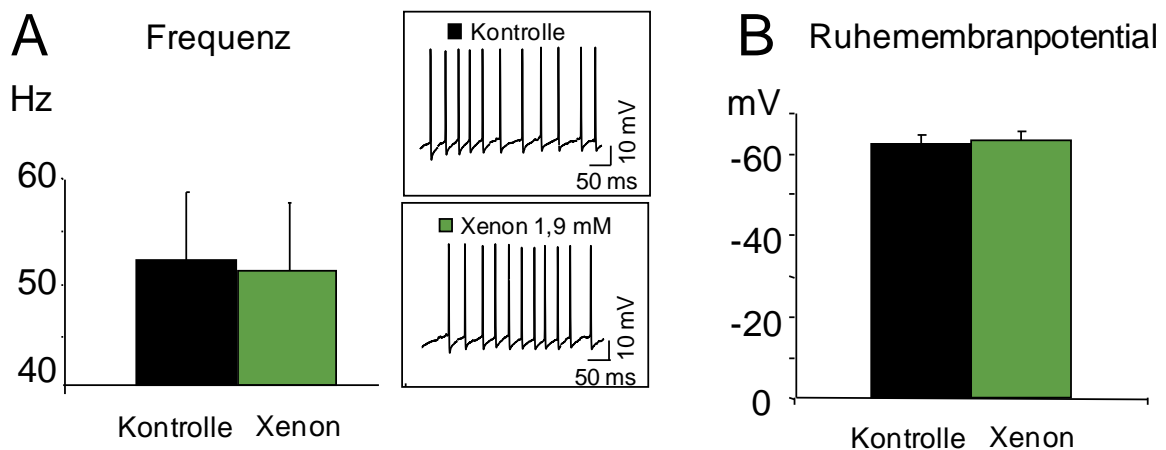
**A:** Pharmakologisches Profil des stehenden Auswärtsstrom von TC-Neuronen.  $I_{SO}$  wurde bei -68 mV ( $8,9 \pm 28,8$  %,  $n=6$ ;  $p < 0,001$ ) und -28 mV ( $30,0 \pm 19,2$  %;  $n=6$ ;  $p < 0,001$ ) durch sukzessive Zugabe spezifischer Antagonisten (TTX; ZD7288;  $\text{Ba}^{2+}$ ; TEA/4AP; pH 6,3) signifikant inhibiert. **B:** Photolytisch

evozierte postsynaptische Stromantworten wurden bei einem Haltepotential von -70 mV im „Voltage-Clamp“-Modus aufgezeichnet. Xenon reduzierte diese photo-ECs unabhängig davon, ob die zum  $I_{SO}$  beitragenden Kanäle durch TTX-, ZD7288-,  $Ba^{2+}$ -, TEA/4AP-Zugabe und Azidifikation blockiert waren (Reduktion auf  $68,6 \pm 5,2$  %;  $n=6$ ;  $p<0,001$ ) oder nicht (Reduktion auf  $72,1 \pm 4,2$  %;  $n=6$ ;  $p<0,001$ ). Das Ausmaß der Reduktion beider Versuchsansätze war nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,77$ ). Im Einschub: Repräsentative Originalstromantworten.

### 3.5 Beeinflusst Xenon die Erregbarkeit von TC-Neuronen?

#### 3.5.1 Die Wirkung von Xenon auf die Frequenz der tonischen Generierung von Aktionspotentialen und das Ruhemembranpotential in TC-Neuronen

Im folgendem wurde der Einfluss von Xenon auf die Frequenz der Aktionspotentiale in TC-Neuronen als Antwort auf einen depolarisierenden Stimulus untersucht. Die Messungen erfolgten im „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -65 mV. Membrandepolarisation wurde durch Strominjektion von +180 pA und +190 pA für 500 ms induziert und anschließend die Frequenz der Einzelpulse ermittelt. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung der mittleren Aktionspotentialfrequenz verglichen mit der Kontrolle ( $51,7 \pm 6,5$  Hz versus  $50,8 \pm 6,4$  Hz;  $n=10$ ,  $p=0,91$ ). Das Ruhemembranpotential wurde im „Brücken“-Modus abgelesen und betrug unter Kontrollbedingungen  $-62,5 \pm 2,2$  mV. Xenon zeigte keinen Einfluss auf das Ruhemembranpotential ( $-63,2 \pm 2,2$  mV,  $n=12$ ;  $p=0,56$ ).



**Abb.3.5.1: Xenon beeinträchtigte nicht die mittlere Frequenz von Aktionspotentialen in TC-Neuronen abgeleitet in „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Messungen bei einem Haltepotential von -65 mV und das Ruhemembranpotential abgeleitet in „Brücken“-Modus.**

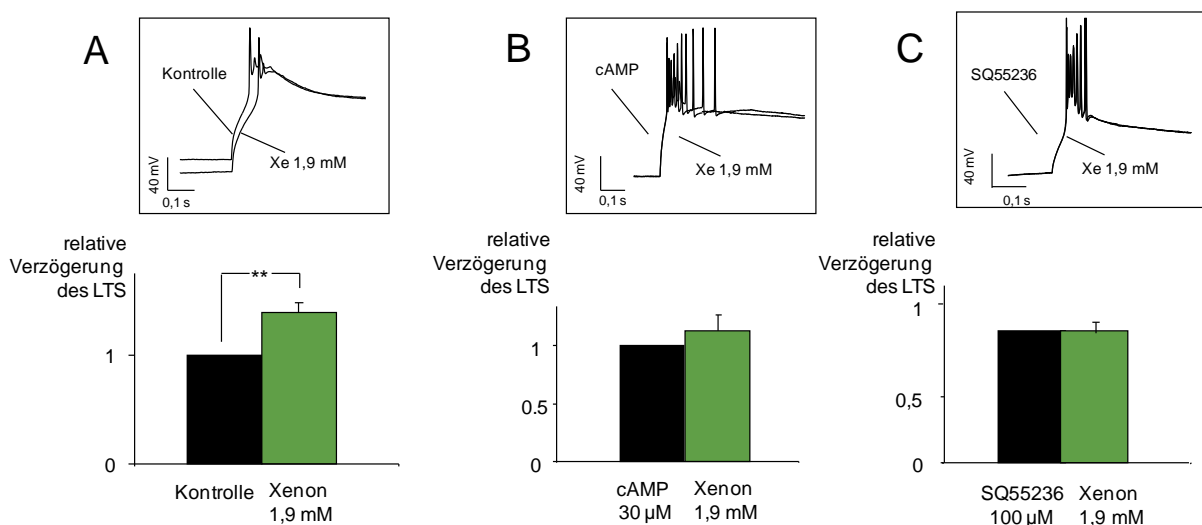
**A:** Durch eine depolarisierende Strominjektion wurden in TC-Neuronen tonische Abfolgen von Aktionspotentialen induziert. Die Applikation von Xenon führt zu keiner Veränderung der Aktionspotential-Frequenz im Vergleich zur Kontrolle ( $50,8 \pm 6,4$  Hz versus  $51,7 \pm 6,5$  Hz;  $n=10$ ,  $p=0,91$ ). Originalspuren eines Experiments sind rechts abgebildet. **B:** Das Ruhemembranpotential wurde durch das Inhalationsanästhetikum Xenon nicht verändert (Kontrolle:  $-62,5 \pm 2,2$  mV; Xenon:  $-63,2 \pm 2,2$  mV;  $n=12$ ,  $p=0,56$ ).



### 3.5.2 Niederschwelliges Ca<sup>2+</sup>-Aktionspotential in TC-Neuronen

Durch Hyperpolarisation des Membranpotentials können Inhalationsnarkotika die Erregbarkeit von TC-Neuronen hemmen (Franks 2008). Die beobachtete Senkung der basalen cAMP-Menge durch Xenon (Abb. 3.3.6) führt über eine Inhibition der HCN-Rezeptoren zu einer verminderten transienten Depolarisation des Membranpotentials (Abb. 3.3.8 und Abb. 3.3.2). Im Zusammenspiel der HCN-Kanäle mit T-Typ-Kalziumkanälen wird durch die transiente Depolarisation bei erregbaren Zellen ein niederschwelliges Ca<sup>2+</sup>-Aktionspotential (LTS) ausgelöst (Akasu et al. 1993), welches charakteristisch für den oszillatorischen, mit dem Zustand des Schlafes assoziierten Burst-Modus ist.

Die Ableitungen wurden unter Ba<sup>2+</sup> im „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Modus (sog. slow-mode) bei einem Haltepotential von -65 mV durchgeführt. Das Inhalationsanästhetikum Xenon verringert die transiente Depolarisation und vermindert dadurch die Erregbarkeit der TC-Neurone. Die reduzierte Depolarisation führt zu einer signifikanten Verzögerung der Auslösung des LTS (139,5±8,8 %; n=5; p=0,002). Die Amplitude der auf dem LTS sitzenden Aktionspotentiale sowie die Fläche unter der Kurve (AUC) änderten sich nicht (Kontrolle: Amplitude 57,5±2,9 mV, n=10; AUC 276,4±0,8 mV/ms, n= 10; Xenon: Amplitude 55,6±3,2 mV; n=10, p=0,7; AUC 254,1±0,8 mV/ms, n=10, p=0,8). Unter gesättigter cAMP-Konzentration wurde der einwärts-gerichtete Kationenstrom I<sub>h</sub> nicht beeinflusst, wodurch eine schnelle Depolarisation erreicht und der LTS ohne Verzögerung ausgelöst wurde (113,1±13,3 %, n= 5, p=0,3). Ein ähnliches Ergebnis wurde unter Inkubation der Schnittpräparate mit dem AC-Inhibitor SQ55236 beobachtet: Xenon bewirkte keine Verzögerung des LTS (98,2±8,2 %, n=5, p=0,8).

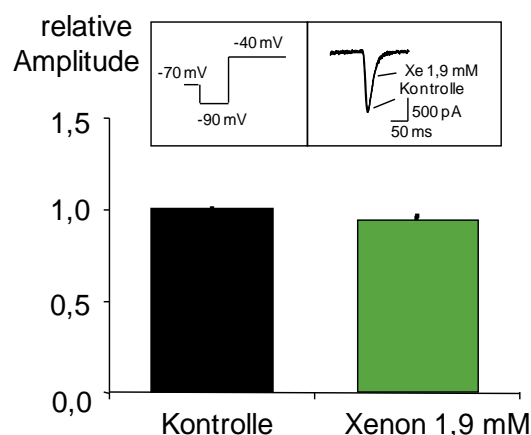


**Abb. 3.5.2: Xenon verzögert die Auslösung des LTS unter Kontrollbedingungen. Unter erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration sowie unter AC-Inhibition durch SQ55236 wird die Xenonbedingte Verzögerung des LTS in TC-Neuronen aufgehoben.**

**A:** In „Voltage-Controlled-Current-Clamp“ Ableitungen führt die Applikation von Xenon zu einer signifikanten Verzögerung der LTS ( $139,5 \pm 8,8$  %;  $n=5$ ;  $p=0,002$ ), welcher durch hyperpolarisierende Strominjektion evoziert wurde. **B:** Unter erhöhter cAMP-Konzentration ( $30 \mu\text{M}$ ) in der Intrazellulärlösung zeigte Xenon keine Auswirkung auf den LTS ( $113,1 \pm 13,3$  %;  $n=5$ ,  $p=0,3$ ). **C:** Durch eine Inhibition der Adenylatzyklase wurde die Xenonwirkung auf die transiente Depolarisation und die Auslösung des LTS ebenfalls aufgehoben ( $98,2 \pm 8,2$  %;  $n=5$ ,  $p=0,8$ ). Repräsentative Originalspuren der jeweiligen Experimente unter Kontrollbedingungen und Xenonapplikation sind im Einschub dargestellt.

### 3.5.3 Xenon zeigt keinen Einfluss auf spannungsabhängige T-Typ-Kalziumkanäle

In einer weiteren Experimentserie wurde der Einfluss von Xenon auf T-Typ Kalziumkanäle im „Voltage-Clamp“-Modus untersucht, da diese zusammen mit den HCN-Kanälen spannungsabhängig das niederschwellige  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotential initiieren. T-Typ-Kalziumkanäle gehören zu den LVA-(low voltage activated)-Kalziumkanälen und werden schon durch geringe Depolarisation aktiviert. Durch Zugabe von TTX ( $1 \mu\text{M}$ ),  $\omega$ -Agatoxin ( $100 \text{ nM}$ ),  $\omega$ -Conotoxin ( $1 \mu\text{M}$ ) und Nifedipin ( $5 \mu\text{M}$ ) wurden T-Typ-Kalziumkanäle pharmakologisch isoliert und Stromantworten durch diese Kanäle mittels eines Spannungssprungs von  $-90 \text{ mV}$  auf  $-40 \text{ mV}$  hervorgerufen. Die Applikation von  $1,9 \text{ mM}$  Xenon zeigte keine Veränderung der Amplitude der T-Typ-Kalziumkanal vermittelten Stromantworten ( $95,5 \pm 3,6$  %;  $n=7$ ;  $p=0,170$ ). Desweiteren blieben auch Ladungstransfer ( $95,7 \pm 5,7$  %;  $n=7$ ;  $p=0,440$ ) und die Deaktivierungszeitkonstante ( $106,7 \pm 6,2$  %;  $n=7$ ;  $p=0,331$ ) von Xenon unbeeinflusst. Die Zugabe des spezifischen T-Typ-Kalziumkanal Antagonisten  $\text{Ni}^{2+}$  verminderte die Amplitude auf  $48,2 \pm 11,7$  % ( $n=7$ ;  $p<0,001$ ).  $\text{Cd}^{2+}$ , ein unspezifischer Kalziumkanalblocker, reduzierte die Amplitude auf  $24,1 \pm 5,8$  % ( $n=5$ ;  $p<0,001$ ).



**Abb. 3.5.3:** Das Inhalationsanästhetikum Xenon zeigte keinen Einfluss auf die Amplitude der T-Typ Kalziumkanäle.

Durch Zugabe spezifischer Antagonisten (TTX,  $\omega$ -Agatoxin,  $\omega$ -Conotoxin, Nifedipin) wurden T-Typ-Kalziumkanal-vermittelte Stromantworten durch einen Spannungssprung von  $-90 \text{ mV}$  auf  $-40 \text{ mV}$  im „Voltage-Clamp“-Modus hervorgerufen. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung

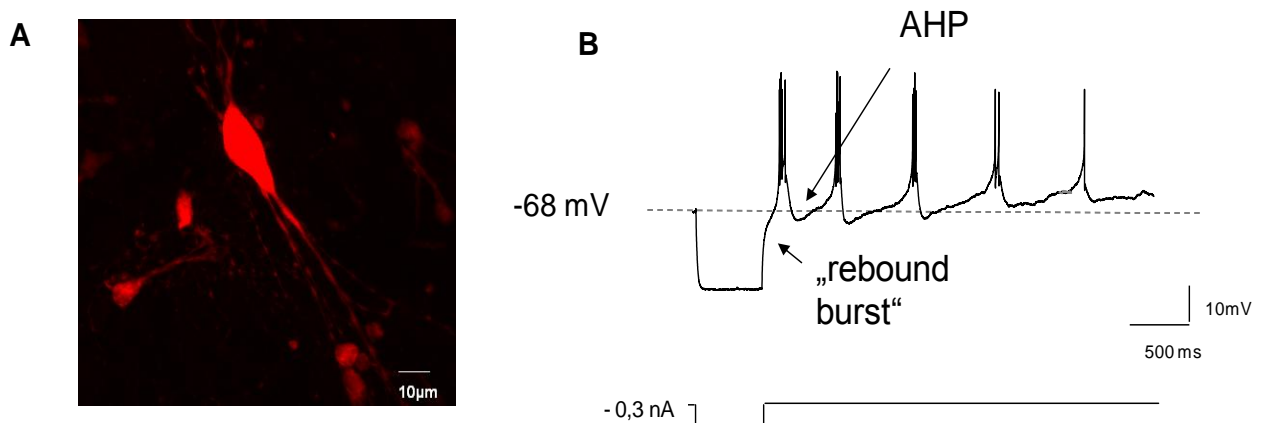
## Beeinflusst Xenon die Erregbarkeit von Retikulariszellen (RTN-Neuronen)?

dieser Stromantworten. Einschub: Spannungssprung und Stromspuren eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen und Xenonapplikation.

### 3.6 Beeinflusst Xenon die Erregbarkeit von Retikulariszellen (RTN-Neuronen)?

#### 3.6.1 Charakterisierung von RTN-Neuronen

Neurone im Nucleus reticularis thalami (RTN-Neurone) wirken inhibierend auf TC-Neurone. Ähnlich wie diese zeigen auch RTN-Neurone charakteristische Membraneigenschaften, die experimentell durch Membranhypervolarisation auslösbar sind. RTN-Neurone weisen eine geringe somatische Expression der HCN-Kanäle auf und weisen somit im Vergleich zu TC-Neuronen nur ca. 1/10 des  $I_h$ -Stromes auf (Abbas et al. 2006). Die Spannungsabhängigkeit des LTS der RTN-Neurone ist in Richtung positiverer Membranpotentiale verschoben. Daher können RTN-Neurone schon bei -65 mV einen LTS auslösen (Huguenard und Prince 1992). Durch die Depolarisation werden im Verlauf des LTS HVA-Kalziumkanäle aktiviert. Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom vermittelt die Aktivierung von Apamin-sensitiven  $Ca^{2+}$ -aktivierten- $K^+$ -Leitfähigkeiten, welche für eine charakteristische Nach-Hyperpolarisation verantwortlich sind, die dem LTS folgt (Abbildung 3.6.1). Die Dauer und Amplitude der Nachhyperpolarisation beeinflusst die Inaktivierung von  $I_T$  in RTN-Neuronen und damit die weitere Generierung darauffolgender LTS.

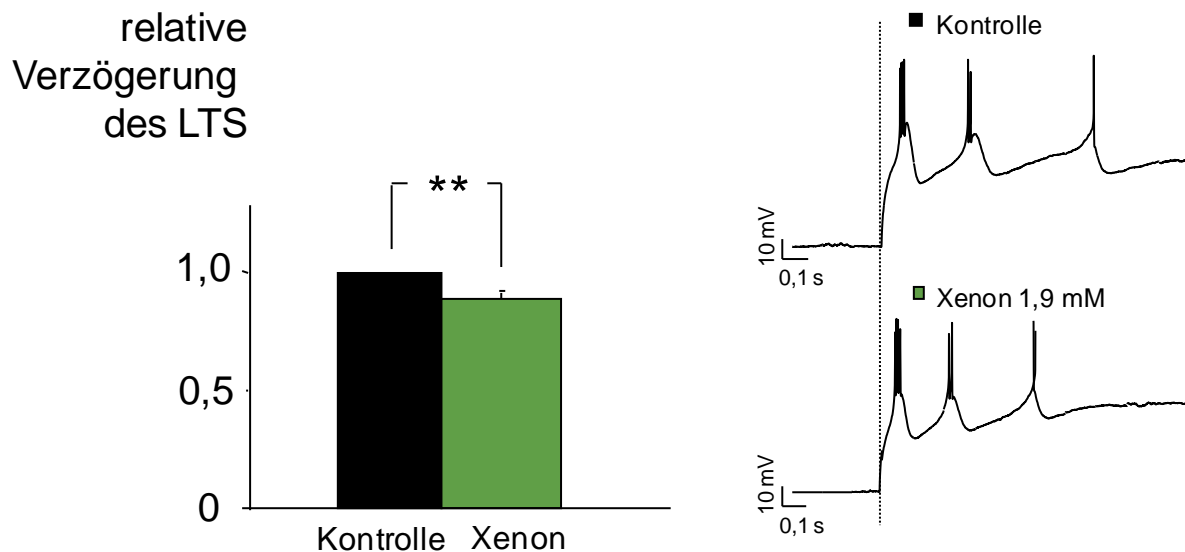


**Abb. 3.6.1: Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften von RTN-Neuronen**

**A:** Neurobiotin-Cy3-Streptavidin-Färbung eines RTN-Neurons. **B:** Applikation eines negativen Strompulses (-150 pA für 500 ms) führt zur Aktivierung eines „rebound bursts“ mit charakteristischer Nach-Hyperpolarisation (AHP). „Rebound Bursts“ gehen in tonische Entladung von Aktionspotentialen über, wenn die Amplitude der Nach-Hyperpolarisation abnimmt.

### 3.6.2 Niederschwelliges $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotential in RTN-Neuronen

Im folgendem wurde der Einfluss von Xenon auf die Induktion der „rebound Bursts“ in RTN Neuronen untersucht, welche wiederum inhibierend auf TC-Neurone wirken. Die Ableitungen wurden im „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -65 mV durchgeführt. Die Zufuhr von Xenon führte zu einer signifikant geringeren Verzögerung ( $88,2 \pm 3,3$  %,  $n=9$ ,  $p=0,002$ ) des LTS in RTN Neuronen (Abbildung 3.6.2). Diese schnellere Ausbildung der „rebound bursts“ weist auf eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit der RTN-Neurone hin.



**Abb. 3.6.2: Xenon führt zu einer geringeren Verzögerung des LTS in RTN-Neuronen.**

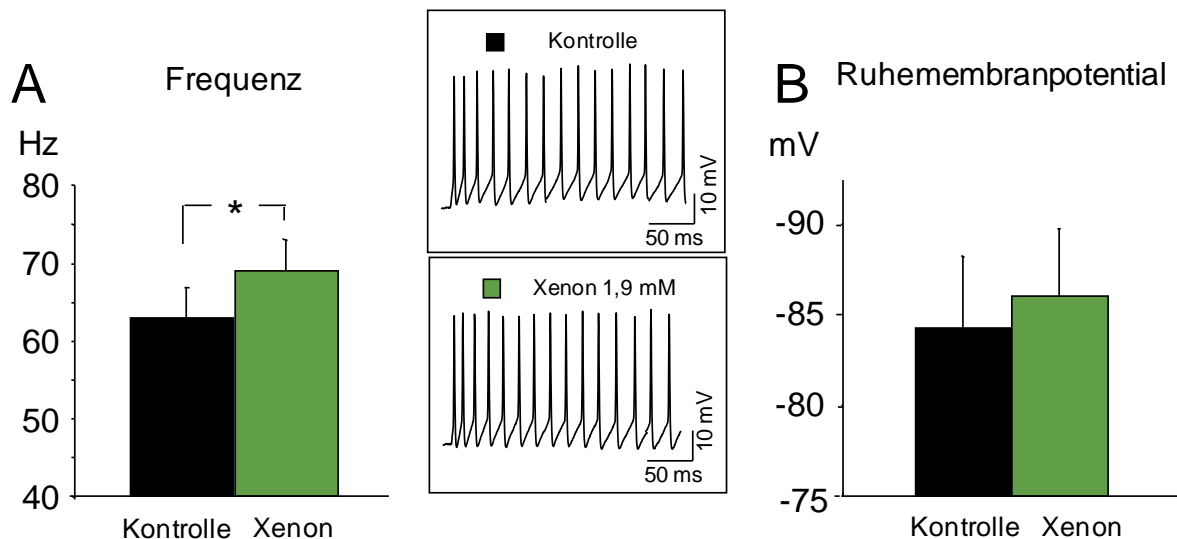
Eine Strominjektion von -200 pA für 500 ms führte in „Voltage-Controlled-Current-Clamp“ Messungen bei einem Haltepotential von -65 mV zur Auslösung des LTS. Die Applikation von Xenon resultierte in einer signifikant schnelleren Ausbildung des LTS ( $88,2 \pm 3,3$  %,  $n=9$ ,  $p=0,002$ ). Darstellung eines repräsentativen Experiment zur Ausbildung des LTS unter Xenonwirkung (r).

Die mittlere Burstdauer eines rebound bursts in RTN-Neuronen betrug  $75,5 \pm 9,3$  ms ( $n=8$ ) und das Interburst-Intervall  $184,3 \pm 27,5$  ms. Die Applikation von Xenon führte zu keiner Veränderung der Burstdauer sowie des Interburst-Intervalls ( $79,7 \pm 14,5$  ms,  $n=8$ ,  $p=0,81$ ;  $175,11 \pm 19,0$  ms,  $n=9$ ,  $p=0,78$ ).

TC-Neuronen weisen eine deutlich kürzere Burstdauer mit  $18,6 \pm 5,0$  ms ( $n=7$ ) auf, die sich während Xenonapplikation ( $19,62 \pm 7,3$  ms;  $n=8$ ;  $p=0,91$ ) nicht veränderte.

### 3.6.3 Die Wirkung von Xenon auf die Frequenz der tonischen Generierung von Aktionspotentialen und das Ruhemembranpotential in RTN-Neuronen

Im Folgenden wurde der Einfluss von Xenon auf die Frequenz der Aktionspotentiale in RTN-Neuronen untersucht. Die Messungen erfolgten im „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Modus bei einem Haltepotential von -65 mV. Membrandepolarisation wurde durch Strominjektion von +180 pA und +190 pA für 500 ms induziert und anschließend die Frequenz der Einzelpulse gemittelt. In RTN-Neuronen führte Xenon zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Frequenz verglichen mit der Kontrolle (69,9±4,0 Hz versus 62,9±3,9 Hz; n=10; p=0,042). Diese Erhöhung der Feuerrate der GABAergen RTN-Neurone durch das Inhalationsanästhetikum Xenon könnte zu einer vermehrten inhibitorischen Wirkung auf TC-Neurone führen. Das Ruhemembranpotential hingegen wurde durch das Inhalationsanästhetikum Xenon nicht beeinflusst (Kontrolle: -84,2±3,9 mV; Xenon: -86,0±3,6 mV; n=8; p=0,75).



**Abb.3.6.3: Xenon erhöht die mittlere Frequenz von Aktionspotentialen in RTN-Neuronen abgeleitet in „Voltage-Controlled-Current-Clamp“-Messungen bei einem Haltepotential von -65 mV ohne das Ruhemembranpotential abgeleitet im „Brücken“-Modus zu beeinflussen.**

**A:** Durch eine depolarisierende Strominjektion wurden in RTN-Neuronen tonische Abfolgen von Aktionspotentialen induziert. Die Applikation von Xenon führt zu einer signifikanten Erhöhung der Frequenz im Vergleich zur Kontrolle (69,0±4,0 Hz versus 62,9±3,9 Hz; n=10, p=0,042). (r) Darstellung von Originalspuren eines Experiments **B:** Das Ruhemembranpotential wurde durch Xenon nicht verändert (-84,2±3,9 mV versus -86,0±3,6 mV; n=8, p=0,75).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Xenon auf die hippocampale synaptische Plastizität untersucht. Die erhobenen Daten zeigen dabei, dass Xenon die synaptische Langzeitpotenzierung, welche ein *in vitro* Korrelat der Gedächtnisbildung und –konsolidierung darstellt, blockiert. Während der HFS wird durch Xenon der Kalziumeinstrom über einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus vermindert.

Zum anderen wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Xenon auf verschiedene neuronale Mechanismen im Thalamus untersucht, die an der synaptischen Übertragung und der Erregbarkeit thalamischer Neurone beteiligt sind. Das thalamokortikale Netzwerk spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Wachheit und Schlaf. Es zeigte sich, dass Xenon die exzitatorische glutamaterge synaptische Transmission im Thalamus vermindert, jedoch keine Wirkung auf die inhibitorische synaptische Transmission hat. Xenon senkt die intrazelluläre cAMP-Menge durch Modulation der Adenylatzyklen und verschiebt dadurch die spannungsabhängige Aktivierung von HCN-Kanälen in Richtung hyperpolarisierender Membranpotentiale. Zusätzlich wird die Stromamplitude des  $I_h$ -Stroms reduziert, woraus konsequenterweise eine verminderte transiente Depolarisation und somit verringerte neuronale Erregbarkeit der TC-Schaltneurone resultiert. Zusätzlich erhöht Xenon die Aktionspotentialfrequenz der RTN-Neurone, die inhibierend auf TC-Neurone wirken, und damit weiter ihre Erregbarkeit und somit den Informationstransfer aus der Körperperipherie zum Kortex dämpfen. Diese Mechanismen könnten an der Vermittlung der hypnotischen Wirkung Xenons beteiligt sein.

### 4.1 Klinische Relevanz der Xenon-Konzentration

Die Sättigung der ACSF mit 65 Vol.-% Xenon führte, gaschromatographisch bestimmt, zu einer gelösten Xenonkonzentration von 1,9 mM. In der Literatur wird die minimale alveoläre Konzentration von Xenon, bei der 50% der Probanden keine Abwehrreaktion auf einen Schmerzreiz zeigen ( $MAC_{\text{Immobilität}}$ ), mit 63 bis 71 Vol.-% (Cullen et al. 1969; Nakata et al. 2001) angegeben. Die *in-vitro*-MAC-Äquivalente von gelöstem Xenon errechnen sich aus dem Löslichkeitskoeffizienten von Xenon mit 0,0887 (Weathersby und Homer 1980) und ergeben eine Konzentration von 2,2 bis 2,5 mM. Folglich liegt die in dieser Arbeit verwendete Xenonkonzentration in einem klinisch relevanten Bereich. Allerdings wurden für den  $MAC_{\text{Immobilität}}$  von Xenon bei Nagetieren Werte im hyperbaren Bereich (1.61 atm) beschrieben (Koblin et al. 1998), sodass die Experimente dieser Arbeit mit einer Konzentration durchgeführt wurden, die unterhalb des  $MAC_{\text{Immobilität}}$  von Mäusen liegen. Somit könnten die hier beschriebenen Ergebnisse die tatsächlichen Wirkungen beim Menschen unterschätzen.

## **4.2 Xenon blockiert die synaptische LTP im Hippocampus**

Die LTP ist definiert als eine lang andauernde Steigerung der synaptischen Effizienz und wurde in den Experimenten dieser Studie durch einen hochfrequenten Reiz ausgelöst. LTP gilt als neuronal-molekulare Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge (Bliss und Collingridge 1993). Es wurde mehrfach beschrieben, dass die Unterdrückung der synaptischen Plastizität für die amnestische Eigenschaften von Anästhetika mitverantwortlich sein könnte (Simon et al. 2001; Martin et al. 2009; Rammes et al. 2009). In dieser Arbeit blockierte Xenon die Induktion der hippocampalen LTP. Für verschiedene volatile Anästhetika (Simon et al. 2001; Ishizeki et al. 2008), Propofol (Takamatsu et al. 2005) und Etomidate (Martin et al. 2009) wurde eine Blockade der LTP beschrieben. Einige Anästhetika wie Isofluran, Sevofluran und Etomidate blockieren LTP dabei durch eine Potenzierung des inhibitorischen GABAergen Transmittersystem (Simon et al. 2001; Ishizeki et al. 2008; Martin et al. 2009). Eine Verstärkung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelten synaptischen Transmission hemmt indirekt die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und damit die Induktion von LTP (Mott und Lewis 1991). Benzodiazepine z. B. beeinflussen durch erhöhte GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Funktion die Gedächtnisfunktion und dementsprechend die synaptische Plastizität (Seabrook et al. 1997). Während für die genannten Anästhetika eine Potenzierung der GABAergen Inhibition als hauptsächlicher Wirkmechanismus angenommen wird (Franks 2008), ist diese für Xenon nicht (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000; Haseneder et al. 2008) oder nur unter bestimmten Bedingungen (Hapfelmeier et al. 2000; Yamakura und Harris 2000) beschrieben. Entsprechend ist zu erwarten, dass auch die Blockade der LTP unter Xenon durch andere als GABAerge Mechanismen vonstatten geht.

### **4.2.1 Xenon senkt den Kalziumeinstrom während des HFS**

Eine wichtige Voraussetzung für die Bildung der hippocampalen LTP ist eine starke Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration im postsynaptischen Neuron (Bliss und Collingridge 1993; Malenka und Nicoll 1999). Es wurde beschrieben, dass die intrazelluläre Injektion von Kalzium-Chelatoren Vorgänge der synaptischen Plastizität hemmt (Brocher et al. 1992). Mithilfe von Kalziumfluoreszenz-Imaging konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Xenon den Kalziumeinstrom während der HFS reduziert. In Zusammenhang mit dem Anstieg des intrazellulären Kalziums während der Auslösung einer LTP wurden unterschiedliche Kalziumquellen beschrieben. Die größte Bedeutung wird dabei dem NMDA-Rezeptor und spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanälen (HVA; high voltage activated) zugesprochen. NMDA-Rezeptoren tragen zu mehreren LTP-Formen unterschiedlicher Persistenz bei, wohingegen eine L-Typ Kalziumkanal-abhängige LTP mit dem Auftreten lang anhaltender de-novo-Proteinbiosynthese assoziiert ist (Morris et al. 1986; Grover und Teyler 1990; Bliss und Collingridge 1993). Eine starke Beteiligung von Kalziumkanälen bei der in

dieser Arbeit verwendeten Form der LTP scheint eher unwahrscheinlich zu sein (Huneke et al. 2001), da die Zugabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten AP5 die Erhöhung des Kalziumeinstroms während des tetanischen Pulses nahezu vollständig aufhob.

#### **4.2.2 Wirkung von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission**

Eine Beeinträchtigung der LTP-Induktion wurde für einige NMDA-Rezeptor-Antagonisten gezeigt (Coan et al. 1987; Bashir et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Xenon reversibel die NMDA-Rezeptor vermittelte synaptische Transmission in der CA1-Region im Hippocampus mindert. Ein Antagonismus an NMDA-Rezeptoren in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems (Haseneder et al. 2008; Haseneder et al. 2009; Georgiev et al. 2010) und auch in heterolog exprimierten NMDA-Rezeptoren (Yamakura und Harris 2000) wurde vielfach beschrieben.

Ursprünglich ging man davon aus, dass dieser NMDA-Rezeptor-Antagonismus den hauptsächlichen neuronalen Wirkmechanismus Xenons darstellt (Franks et al. 1998). Neueren Studien zufolge beeinflusst Xenon jedoch auch die Funktion von glutamatergen non-NMDA-Rezeptoren. So konnte gezeigt werden, dass Xenon Stromantworten von heterolog exprimierten AMPA-Rezeptoren (Plested et al. 2004), AMPA-Rezeptor-vermittelte Antworten in kultivierten Kortexneuronen (Dinse et al. 2005) und die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission in verschiedenen ZNS-Arealen (Haseneder, 2008, Haseneder 2009) reduziert. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Wirkung in der CA1-Region des Hippocampus bestätigt werden.

#### **4.2.3 Wirkung von Xenon auf L-Typ-Kalziumkanäle**

In hippocampalen Pyramidenzellen werden im Wesentlichen zwei von insgesamt vier Isoformen des L-Typ-Kalziumkanals,  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$  exprimiert, wobei  $Ca_v1.2$ -Isoformen mit einem Anteil von über 75 % überwiegen (Hell et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde durch Zugabe von P/Q-, N- und T-Typ Kalziumkanalantagonisten der Anteil der durch den L-Typ-Kalziumkanal vermittelten Ströme erhöht. Unter diesen experimentellen Bedingungen veränderte die Applikation von Xenon die gemessenen Stromantworten nicht. Die Kalziumkanal-Stromantworten wurden durch den L-Typ Kalziumkanal Antagonisten Nifedipin zu ~50 % vermindert, was zeigt, dass unter unseren experimentellen Bedingungen ein Großteil des Gesamtstroms durch L-Typ-Kalziumkanäle getragen wurde. Die zeitgleiche Applikation aller spezifischen Antagonisten konnte den HVA- $Ca^{2+}$ -Strom nicht vollständig inhibieren. Der verbleibende Antagonisten-resistente Reststrom wurde wahrscheinlich über R-Typ-Kalziumkanäle ( $Ca_v2.3$ ) vermittelt, für welche derzeit keine spezifischen Antagonisten verfügbar sind. Da der gesamte gemessene HVA- $Ca^{2+}$ -Strom durch Xenon nicht verändert wurde, erscheint eine Modulation von L-Typ Kalziumkanälen durch Xenon unwahrscheinlich.



Dies ist konform mit einer Studie die gezeigt hat, dass Xenon keine Wirkung auf die Funktion von heterolog exprimierten L-Typ-Kalziumkanäle in Myozytenkultur hat (Huneke et al. 2001).

Unsere Ergebnisse sprechen also dafür, dass Xenon die Auslösung der LTP nicht über eine Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen sondern lediglich über einen Antagonismus am NMDA-Rezeptor verhindert. Bestätigt wird dies letztlich auch durch den Befund, der eine nahezu vollständige Blockade des Kalziumeinstroms während des HFS unter dem NMDA-Rezeptor-Antagonist AP-5 zeigte.

#### **4.2.4 Wirkung von Xenon auf extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren**

Bei der Bildung von LTP spielen neben synaptisch lokalisierten auch extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle (Lozovaya et al. 2004). Für extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren wird hauptsächlich (Li et al. 2002), aber nicht ausschließlich (Thomas et al. 2006), eine Zusammensetzung aus NR2B-Untereinheiten beschrieben. Entwicklungsabhängig verändert sich das Expressionsmuster sowie die Lokalisation der Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren. Das Verhältnis von NR2A- zu NR2B-Untereinheiten nimmt während der Entwicklung zu (Yashiro und Philpot 2008), da NR2B-Untereinheiten in den Synapsen der reifen Neurone durch NR2A-Untereinheiten ersetzt werden (Gambrill und Barria 2011). In kortikalen Neuronen findet der Austausch der Untereinheiten postnatal zwischen p4 und p9 statt und ist mit p15 nahezu abgeschlossen (Liu et al. 2004). Da es bisher keine Studien über die zeitliche Entwicklung von hippocampalen NMDA-Rezeptoren gibt, muss rückschließend aus den Daten zu kortikalen Neuronen von einem ähnlichem Entwicklungszeitraum ausgegangen werden. Es ist also wahrscheinlich, dass der entwicklungsbedingte Wechsel der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten in den Hippocampi der verwendeten Tiere (adulte Mäuse, p20- p30) schon abgeschlossen ist.

Extrasynaptische NMDA-Rezeptoren werden in geringer Dichte exprimiert, spiegeln aber wenigstens 50 % der gesamten NMDA-Rezeptor Population wieder (Groc et al. 2006). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Modulation der Proteinbiosynthese und bei langsamen Netzwerkoszillationen (Groc et al. 2009). NR2B Untereinheiten besitzen eine höhere Permeabilität für Kalziumionen (Dingledine et al. 1999), zeigen eine geringere Desensitivierung (Krupp et al. 1996) und erzeugen langsamere postsynaptische Potentiale (Flint et al. 1997). Folglich führt die Aktivierung der NR2B-enthaltenden Rezeptoren zu einem größeren Kalziumeinstrom. Dieser vermehrte Kalziumeinstrom kann einerseits intrazelluläre Kaskaden aktivieren, die letztlich über die Aktivierung von Caspasen den Zelltod herbeiführen können (Berridge et al. 1998). Neben dieser Rolle bei neurotoxischen Vorgängen spielen NR2B-Untereinheiten enthaltende NMDA-Rezeptoren jedoch auch eine

wichtige Rolle bei der Induktion der synaptischen Plastizität. So erleichtert der NR2B-vermittelte vermehrte Kalziumeinstrom die Induktion von LTP, wohingegen bei einer hohen NR2A/NR2B Relation die Induktion von LTP erschwert wird (Foster et al. 2010).

Die Aktivierung der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren erfolgt im Gegensatz zu den synaptisch lokalisierten nicht durch Freisetzung von Glutamat aus der präsynaptischen Membran, da dieses von EAAT-Transportern rasch abtransportiert und recycelt wird (Danbolt 2001). Die Freisetzung von Glutamat im millimolaren Bereich unter Bedingungen der "normalen" synaptischen Übertragung beeinträchtigt somit nicht die ambiente Glutamatkonzentration im nanomolaren Bereich außerhalb der postsynaptischen Dichte. Durch eine hoch-frequente Stimulation der glutamatergen Fasern jedoch werden extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren durch einen Überschuss an Glutamat aktiviert, da die Kapazität der EAAT-Glutamattransporter kurzzeitig überschritten wird (Diamond und Jahr 2000). Eine Stimulation zwischen 100 und 200 Hz ist ausreichend, um NMDA-Rezeptoren außerhalb der postsynaptischen Dichte zu aktivieren (Harris und Pettit 2008). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde das standardmäßig verwendete Stimulationsprotokoll von 100 Hz / 1s verwendet, eine Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren mit konsekutiver Beteiligung an der LTP-Induktion ist daher anzunehmen.

Eine exzessive, lang anhaltende Erhöhung der Glutamatkonzentration kann durch Zugabe des EAAT Inhibitors DL-TBOA verursacht werden und führt neben der Erregung synaptischer NMDA-Rezeptoren überwiegend zur Aktivierung extrasynaptisch lokalisierter NMDA-Rezeptoren (Neyton und Paoletti 2006). Unter diesen Voraussetzungen gemessene extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptor vermittelte Stromantworten wurden durch Xenonapplikation reversibel reduziert. Die Zugabe des NR2B-selektiven Antagonisten Ro-25-6981 bestätigte die Aktivierung von NR2B-enthaltenden und somit vorwiegend extrasynaptisch lokalisierten NMDA-Rezeptoren. Unter DL-TBOA führte die Applikation von Ro-25-6981 zu einer signifikant höheren Reduktion der NMDA-Rezeptor vermittelten Stromantworten. Der allosterische Antagonist Ro-25-6981 zeigt eine 3000-fach höhere Selektivität für NR1/NR2B NMDA-Rezeptoren im Gegensatz zu NR1/NR2A Untereinheiten enthaltenden Rezeptoren (Mutel et al. 1998). Ro-25-6891 wirkt nur in höheren Konzentrationen gegenüber NR2A Untereinheiten inhibierend ( $IC_{50}$  30  $\mu$ M), wohingegen für NR2B-Untereinheiten enthaltende Rezeptoren in der Literatur eine  $IC_{50}$  von 0,009  $\mu$ M angegeben wird (Malherbe et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde Ro-25-6981 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M verwendet. Diese gilt als selektiv für NMDA-Rezeptoren der Zusammensetzung NR1/NR2B (Fischer et al. 1997; Mutel et al. 1998).

Obwohl in dieser Studie NMDA-Rezeptoren, die außerhalb der postsynaptischen Dichte lokalisiert sind, nicht pharmakologisch isoliert werden konnten, war es möglich, durch

Zugabe von DL-TBOA den Anteil der NR2B-enthaltenden NMDA-Rezeptoren am Gesamtstrom zu erhöhen. Unter diesen Bedingungen führte die Applikation des inhalativen Anästhetikums Xenon zu einer reversiblen Reduktion der NMDA-Rezeptor vermittelten Stromantworten im gleichen Ausmaß wie unter Bedingungen der physiologischen synaptischen Transmission. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass Xenon extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren in vergleichbarem Ausmaß moduliert wie synaptisch lokalisierte. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien in der Amygdala die zeigen, dass Xenon NMDA-Rezeptoren unabhängig vom Vorhandensein der Untereinheiten NR2A oder NR2B (Haseneder et al. 2009) höchstwahrscheinlich durch Bindung an der Glycin-Bindestelle der NR1-Untereinheit hemmt (Dickinson et al. 2007).

Die oben beschriebenen Funktionen der extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren in Betracht ziehend könnte die Xenon-bedingte Inhibition dieser Rezeptoren nicht nur der Unterdrückung der hippocampalen LTP zugrunde liegen, sondern darüber hinaus auch an den neuroprotektiven Eigenschaften des Inhalationsanästhetikums beteiligt sein.

#### **4.2.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse**

Die Beeinträchtigung der Gedächtnisbildung während einer Operation ist ein wichtiger Endpunkt der Allgemeinanästhesie. In vielen Studien wurde eine Verminderung der synaptischen Plastizität im Hippocampus als Mechanismus der amnestischen Eigenschaften von Anästhetika vorgeschlagen (Simon et al. 2001; Ishizeki et al. 2008; Martin et al. 2010). Obwohl es unumstritten ist, dass an den sehr komplexen Vorgängen der Gedächtnisbildung und Erinnerung weitere Mechanismen und Regionen im ZNS beteiligt sind (Lachmann et al. 1990; Holscher 1999), stellt die LTP im Hippocampus doch das anerkannteste Modell für diese Vorgänge dar (Morris et al. 1986). Insofern liegt es nahe, dass diese ZNS-Region auch für die Unterdrückung der Gedächtnisbildung während einer Allgemeinanästhesie eine wesentliche Rolle spielt. Für Propofol konnte in einer Studie die Vermittlung der amnestischen Eigenschaften durch Modulation der Funktionalität des Hippocampus demonstriert werden (Ren et al. 2008).

Mittlerweile wurden Xenonnarkosen am Menschen im Rahmen mehrerer klinischer Studien (Bedi et al. 2002; Rossaint et al. 2003; Wappler et al. 2007) evaluiert. In keiner dieser Studien wurde ein Fall intraoperativer Wachheit beschrieben. Dennoch sind im Zusammenhang mit der geringen Prävalenz der intraoperativen Wachheit (Mashour et al. 2009) die Probandenzahlen in diesen Multicenter-Studien zu klein, um eine definitive Aussage zu treffen, ob Xenon zum Beispiel gegenüber anderen Anästhetika potenter in Bezug auf dessen amnestische Eigenschaften ist. Offensichtlich jedoch existiert ein Schutz vor intraoperativer Gedächtnisbildung während einer Xenonnarkose. Die Xenon induzierte

Beeinträchtigung der hippocampalen LTP, vermittelt hauptsächlich über den NMA-Rezeptor-Antagonismus, beschreibt einen Mechanismus über den Xenon seine amnestischen Eigenschaften vermitteln und Patienten vor intraoperativer Gedächtnisbildung schützen könnte.

### **4.3 Der Einfluss von Xenon im thalamokortikalen Netzwerk**

#### **4.3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der TC- und RTN-Neurone**

Mittels Patch-Clamp-Technik wurden in der vorliegenden Arbeit Infrarot-videomikroskopisch visualisierte thalamische Schaltneurone (TC-Neurone) und Retikulariszellen (RTN-Neurone) abgeleitet. Die unterschiedlichen Membraneigenschaften der glutamatergen TC-Neurone und der GABAergen RTN-Neurone ermöglichen eine klare Identifikation des jeweiligen neuronalen Typs. Als Antwort auf einen hyperpolarisierenden Strompuls weisen TC-Neuronen einen charakteristischen großen, depolarisierenden Kationen-Einwärtsstrom, den sogenannten Sag (Abb. 3.2.1) und eine langsame Nach-Depolarisation auf (Ying und Goldstein 2005). Die Ausbildung des Sag wird über HCN-Kanäle vermittelt. Im Gegensatz dazu zeigen RTN-Neurone (Abb.3.5.2.) übereinstimmend mit einer schwächeren HCN-Kanal Expression (Notomi und Shigemoto 2004), nur einen sehr flachen depolarisierenden Sag. Folgend auf eine Hyperpolarisation weisen sie üblicherweise multiple, rhythmische „rebound Bursts“ gefolgt von einer Nach-Hyperpolarisation auf (Wang et al. 2010). Zur weiteren Verifizierung der Zelltypen wurden einige Neurone während der Ableitung mit Neurobiotin gefüllt. In Abbildung 3.2.1. sind beide Erscheinungsformen für TC-Neuronen dargestellt. Eine Buschzelle mit einer kleineren Somafläche und schlankeren Dendriten sowie eine Sternzelle mit radiär angeordneten Dendriten. Abbildung 3.5.2. zeigt eine GABAerges RTN-Neuron, dessen Primärdendriten in kleinen Ästen enden (Scheibel und Scheibel 1966; Lubke 1993).

#### **4.3.2 Wirkung von Xenon auf die synaptische Transmission im thalamokortikalem Netzwerk**

Trotz zahlreicher Unterschiede, sprechen auf neurophysiologischer Ebene viele Gemeinsamkeiten zwischen Schlaf und Allgemeinanästhesie dafür, dass Teile des Phänomens Allgemeinanästhesie ähnlich wie Schlaf vermittelt werden (Tung und Mendelson 2004). Das neuronale Korrelat des Zustandes Schlaf stellen aktivitätsabhängige Änderungen innerhalb des thalamokortikalen Netzwerks dar. Innerhalb der funktionellen Achse, bestehend aus Hirnstamm, Thalamus und Kortex werden sensorische Informationen aus der Peripherie an den zerebralen Kortex zur Endverarbeitung weiterverschaltet. Aus diesem Grund wird auch der Thalamus als „Tor zum Bewusstsein“ bezeichnet (McCormick und Bal 1997; Huguenard und McCormick 2007). Ein wichtiger Wirkmechanismus von

Allgemeinanästhetika könnte eine Unterdrückung des thalamokortikalen Signalfusses sein (Fiset et al. 1999; Alkire et al. 2000). Ein verminderter Informationsfluss innerhalb des thalamokortikalen Netzwerkes könnte durch eine Reduktion der exzitatorischen glutamatergen synaptischen Transmission oder einer verstärkten inhibitorischen GABAergen synaptischen Übertragung vermittelt werden und damit als Wirkmechanismus für Xenon in Frage kommen.

#### *4.3.2.1 Wirkung von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission innerhalb des thalamokortikalen Netzwerkes*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Inhalationsanästhetikum Xenon die basale synaptische Transmission (siehe 3.4.1.) und somit die neuronale Erregungsübertragung im ventrobasalen Thalamus reversibel vermindert. Die Ableitungen wurden bei einem Haltepotential von -70 mV durchgeführt, sodass die synaptische Übertragung hauptsächlich durch AMPA-Rezeptoren und zu einem geringeren Anteil über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird. Durch Zugabe spezifischer Antagonisten wurde im Folgenden der Einfluss von Xenon auf die einzelnen glutamatergen Transmittersysteme der synaptischen Übertragung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Xenon die NMDA- und AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Übertragung im thalamokortikalen Netzwerk reduziert. Die erhobenen Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen im Hippocampus (siehe 3.1.3). Desweiteren wurde schon in früheren Arbeiten ein Antagonismus von NMDA- und AMPA-Rezeptoren in anderen ZNS-Arealen wie der basolateralen Amygdala, dem präfrontalen Kortex sowie dem Hinterhorn des lumbalen Rückenmarks beschrieben (Haseneder et al. 2008; Haseneder et al. 2009). Die Allgemeinanästhesie besteht im Wesentlichen aus den Komponenten Hypnose, Amnesie, Immobilität und Analgesie (Antognini und Carstens 2002; Urban und Bleckwenn 2002), welche (zumindest zum Teil) über jeweils verschiedene ZNS-Regionen vermittelt werden. Für die Komponente Hypnose erscheint eine Modifikationen kortikaler (Arhem et al. 2003), thalamischer (Alkire et al. 2007) und thalamokortikaler Informationsverarbeitung (Franks 2008) als zentraler Mechanismus, wohingegen der Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Anästhetika-induzierten Amnesie spielt (Ren et al. 2008). Auf spinaler Ebene werden die Komponenten Immobilität (Antognini und Schwartz 1993) und Analgesie (Kendig 2002) vermittelt. Die Xenon-bedingte Verminderung der glutamatergen exzitatorischen synaptischen Übertragung innerhalb des thalamokortikalen Netzwerkes scheint vorwiegend über postsynaptische Wirkmechanismen vermittelt zu werden, weil die Reduktion der Stromantworten von NMDA- bzw. AMPA-Rezeptoren in elektrischer und photolytischer Stimulation äquivalent waren. In einer weiteren Studie (Haseneder et al. 2008) wurde unter Xenonapplikation keine Änderung der Frequenz von Miniatur-EPSCs, jedoch aber eine Reduktion der Miniatur-EPSC Amplitude beschrieben. Diese Reduktion der Amplitude könnte auf eine Modulation der postsynaptischen

Rezeptoren oder auf einen verminderten Glutamatgehalt in den Transmittervesikeln zurückzuführen sein. Zusammengefasst mit den Ergebnissen der photolytischen Glutamatfreisetzung scheint für Xenon ein postsynaptischer Mechanismus wahrscheinlicher.

#### 4.3.2.2 Wirkung von Xenon auf die retikulo-thalamische inhibitorische synaptische Übertragung

GABAerge Neurone des Nucleus reticularis thalami projizieren inhibitorisch auf TC-Neurone. Eine Verstärkung der thalamischen Inhibition und die daraus resultierende Hyperpolarisation thalamo-kortikaler Schaltneurone wäre eine weitere Möglichkeit den Informationstransfer zu vermindern (Steriade 1997). Die Potenzierung der GABAergen synaptischen Transmission gilt als wichtiger Mechanismus, wie Anästhetika die neuronale Aktivität im ZNS hemmen und damit *in vivo* Bewusstseinsverlust herbeiführen (Alkire et al. 2000; Franks 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch keinen Einfluss von Xenon auf die inhibitorische GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte synaptische Transmission. Somit erfolgt kein direkter Einfluss auf die synaptische Übertragung vom RTN zum ventrobasalen Kerngebiet des Thalamus. Weder die Amplitude der IPSCs, noch der Ladungstransfer, der maßgeblich für die Stärke der Inhibition verantwortlich ist (Hentschke et al. 2005), noch die Deaktivierungszeitkonstanten werden von Xenon beeinträchtigt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien, die keine Wirkung von Xenon auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in kortikalen, subkortikalen und spinalen ZNS-Regionen beschrieben (Haseneder et al. 2008; Haseneder et al. 2009). Darüber hinaus beeinflusste Xenon auch GABA<sub>A</sub>-IPSCs in Autapsen-bildenden Hippocampusneuronen nicht (Franks et al. 1998; de Sousa et al. 2000). Dennoch konnte eine Potenzierung GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelter Stromantworten, durch Zugabe niedriger Agonistenkonzentration ( $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  M) in heterologen Expressionssystemen beobachtet werden (Hapfelmeier et al. 2000; Yamakura und Harris 2000). In diesen Studien wurden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren der Untereinheitenzusammensetzungen  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  und  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  untersucht. GABA<sub>A</sub> Rezeptoren der Zusammensetzung  $\alpha_1\beta_2\gamma$  sind im Gehirn am häufigsten zu finden (Sieghart und Sperk 2002; Farrant und Kaila 2007) und werden auch im Thalamus exprimiert (Pirker et al. 2000). Hingegen wurden in dieser Arbeit die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren synaptisch stimuliert, wobei angenommen wird das unter diesen Bedingungen bei der synaptischen Freisetzung eine GABA-Konzentration im millimolaren Bereich erreicht wird und somit GABA<sub>A</sub> Rezeptoren vollständig gesättigt sind. Ob Xenon eine Modulation extrasynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bewirkt, muss noch untersucht werden. Extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die hauptsächlich delta-Untereinheiten inkorporieren, vermitteln die sogenannte tonische Inhibition (Semyanov et al. 2004; Semyanov 2008), welche durch niedrige Agonistenkonzentration aktiviert werden. Eine Verstärkung der tonischen Inhibition stellt einen weiteren möglichen Wirkmechanismus von Anästhetika dar, der schon für

verschiedene Anästhetika wie Thiopental (Bieda et al. 2009), Propofol (Bieda und MacIver 2004), Midazolam (Bai et al. 2001) und Isofluran (Caraiscos et al. 2004) beschrieben wurde. Eine Expression von extrasynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wurde für TC-Neurone (Porcello et al. 2003) und Pyramidenneurone des somato-sensorischen Kortex (Yamada et al. 2007) beschrieben. Hauptsächlich werden im ventrobasalen Thalamus extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit der  $\alpha_4$ -Untereinheit exprimiert, welche zur tonischen Inhibition beitragen (Jia et al. 2005) und einen möglichen Angriffspunkt für Xenon darstellen könnten.

### 4.3.3 Beeinflusst Xenon die neuronale Erregbarkeit von TC-Neuronen

#### 4.3.3.1 $K^+$ -Leckleitfähigkeiten regulieren die zelluläre Erregbarkeit in TC-Neuronen

TC-Neurone können sich abhängig von ihrem Membranpotential in zwei verschiedenen Aktivitätsmodi befinden. Im Wachzustand erfolgt im tonischen Modus eine dauerhafte Transmission, v.a. sensorischer Informationen zu kortikalen Neuronen. Dieser Aktivitätsmodus ist durch ein depolarisiertes Membranpotential und der tonischen Generierung von einzelnen Aktionspotentialen gekennzeichnet (Steriade et al. 1993). Während des Schlafs und in tiefer Anästhesie (McCormick und Huguenard 1992; Franks 2008) findet sich eine niederfrequente rhythmische Salvenaktivität (Burst-Modus) mit einem hyperpolarisierten Ruhemembranpotential. In diesem oszillatorischen Burst-Modus wird der Informationstransfer von der Peripherie zum Kortex unterbrochen. Die Erregbarkeit und der Aktivitätsmodus werden wesentlich durch spannungsgesteuerte Ionenkanäle, Kanäle der K<sub>2</sub>P-Familie, HCN-Kanäle und Kalziumkanäle, beeinflusst. Eine Modulation dieser Kanäle konnte für verschiedene Anästhetika sowohl in TC- als auch RTN-Neuronen gezeigt werden (Ying und Goldstein 2005; Ying et al. 2006; Budde et al. 2008) und wird als wichtiger Mechanismus für Allgemeinanästhetika, vor allem im Sinne der Hypnose, diskutiert (Hemmings et al. 2005; Franks 2008).

#### 4.3.3.2 K<sub>2</sub>P-Kanäle

Die Inhibition, der in TC-Neuronen exprimierten TASK1- und TASK3-Kanäle (Meuth et al. 2003; Meuth et al. 2006) verursachen eine mit einem Aktivitätswechsel in den tonischen Modus verbundene Depolarisation (Coulon et al. 2010). Es wurde beschrieben, dass Halothan (Budde et al. 2008) und volatile Anästhetika den Barium-sensitiven Strom der Task-Kanäle in rekombinanten Expressionssystemen (Patel et al. 1999) aktiviert. Dies führt zu einem langandauernden Auswärtsstrom von K<sup>+</sup>-Ionen und bedingt eine Hyperpolarisation (Patel und Honore 2001; Franks und Honore 2004) mit einer einhergehenden verminderten Erregbarkeit der Neurone. Weitere Studien zeigten eine Aktivierung der mechano-sensitiven K<sub>2</sub>P-Kanäle TREK1- und TREK2 durch volatile Anästhetika (Franks und Lieb 1999), Chloroform und Diethylether (Patel et al. 1999). Desweiteren wurde die Wirkung von Anästhetika an TREK1-Knockout Mäusen untersucht. Diese Tiere waren durch volatile

Anästhetika nicht zu anästhesieren, intravenöse Anästhetika blieben jedoch wirksam (Heurteaux et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Aktivierung der TASK-Kanäle im ventrobasalen Thalamus durch Xenon nachgewiesen werden (siehe 3.3.1). Die erhobenen Daten stehen im Einklang mit einer Studie, in der Xenon keine Wirkung auf TASK-Kanäle in rekombinanten Expressionssystem zeigte. Für ein weiteres Mitglied der  $K_2P$ -Familie, der TREK1-Kanäle, wurde eine Verstärkung beschrieben (Gruss et al. 2004).

#### 4.3.3.3 HCN-Kanäle

Als ein weiterer Mechanismus von Anästhetika wurde der Einfluss von Xenon auf HCN-Kanäle untersucht, welche den hyperpolarisations-aktivierten Kationenstrom  $I_h$  vermitteln. Neben  $K_2P$ -Kanälen, sind sie an der Konstitution des Membranpotentials beteiligt und damit bestimmend für den Aktivitätszustand der TC-Neurone. Besonderes Augenmerk galt der Aktivierungskinetik, der Spannungsabhängigkeit und der Modulation durch cAMP. Die halbmaximale Aktivierung der HCN-Kanäle liegt in der Nähe des physiologischen Ruhemembranpotentials (-70 bis -100 mV) (Ludwig et al. 1999) und vermittelt einen depolarisierend wirkenden Einwärtsstrom, der überwiegend durch  $Na^+$ -Ionen getragen wird.

Im ventrobasalen Thalamus wurde die Expression der Isoformen HCN2 und HCN4 beschrieben (Notomi und Shigemoto 2004), wobei HCN2 in größerer Anzahl vertreten ist. In den durchgeführten Patch-Clamp-Ableitungen von TC-Neuronen besitzt der native HCN Kanal eine Zeitkonstante  $T_{\text{schnell}} 178,7 \pm 10,8$  ms. Die Aktivierung der HCN2-Kanäle wird mit 200 – 500 ms (Ishii et al. 1999; Ludwig et al. 1999) beschrieben, wohingegen HCN4-Kanäle deutlich langsamere Geschwindigkeiten von einigen hundert Millisekunden bis zu 30 s aufzeigen (Ludwig et al. 1999; Seifert et al. 1999). Mithilfe der Tail-Ströme kann auf die Fraktion der geöffneten HCN-Kanäle bei einem bestimmten Membranpotential zurückgeschlossen werden. Xenon verschob die halbmaximale Aktivierung in Richtung hyperpolarisierender Werte und verminderte zudem die Amplitude des  $I_h$ -Stroms. Die Aktivierungskinetik wurde durch Xenon nicht beeinträchtigt. Auch in rekombinanten mHCN2-Kanälen verschob Xenon die halbmaximale Aktivierung in Richtung Hyperpolarisation und verminderte die  $I_h$ -Amplitude ohne Einfluss auf die Aktivierungskinetik zu nehmen (siehe 3.3.3). Die erhobenen Daten unter Kontrollbedingungen ( $V_{1/2} = -99,9 \pm 1,5$  mV in nativen TC-Neuronen und  $-98,7 \text{ mV} \pm 1,5$  mV in mHCN2-HEK-Zellen) stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen rekombinanten HCN2-Kanälen der Vertebraten im Bereich von -100 mV (Santoro et al. 1998; Ishii et al. 1999; Ludwig et al. 1999; Moosmang et al. 1999; Moosmang et al. 2001). Pharmakologisch lassen sich HCN-Kanäle durch extrazelluläre Applikation von  $Cs^+$  (Pape 1996) in submillimolaren Konzentrationen und durch den Inhibitor ZD7288 hemmen (Gasparini und DiFrancesco 1997).



Xenon reduzierte in den „Current-Clamp“-Messung in TC-Neuronen die transiente Depolarisation (voltage sag), die durch HCN2-Kanäle vermittelt wird (Ludwig et al. 1999). Somit konnte die Inhibition der HCN-Kanäle erneut bestätigt werden.

#### *Modulation der HCN-Kanäle durch cAMP*

Bedeutend für HCN-Kanäle, sowohl für native als auch für rekombinante, ist eine direkte Regulation durch zyklische Nukleotide. Die intrazelluläre Zugabe von cAMP/cGMP verschiebt  $V_{1/2}$  zu positiveren Membranpotentialen und beschleunigt die Aktivierungskinetik (Biel et al. 2009). Dieser Effekt wird unabhängig von einer Phosphorylierung moduliert (DiFrancesco und Tortora 1991). Im Rahmen dieser Arbeit verschob die Zugabe von cAMP (30  $\mu$ M)  $V_{1/2}$  in nativen HCN-Kanälen um 12,1 mV und in rekombinanten HCN-Kanälen um 15,5 mV in depolarisierender Richtung. Die erhobenen Daten stehen im Einklang mit weiteren Studien, in welchen eine cAMP vermittelte Verschiebungen zwischen 7 mV (Pape und McCormick 1989) und 28 mV (Vargas und Lucero 1999) in nativen HCN-Kanälen und zwischen 2 – 15 mV (Ludwig et al. 1999) in rekombinanten HCN-Kanälen beschrieben wurde. Zusätzlich wird durch cAMP die Aktivierungskinetik beschleunigt (Pape 1996) und die Amplitude des  $I_h$ -Stroms vergrößert. Konsequenz der Regulation durch Erhöhung des intrazellulären cAMP ist eine Aktivierung der HCN-Kanäle schon bei positiveren Membranpotentialen. Vermittelt wird dieser Effekt durch eine direkte Interaktion von cAMP mit der CNBD-Bindedomäne der HCN-Kanäle, die homolog zu Bindedomänen in anderen zyklischen-nukleotid-bindenden Proteinen wie PKA und CNG Kanälen ist. Untersuchungen von HCN2 Kanälen mit einem verkürzten C-Terminus postulieren eine Inhibition von CNBD an der Kanalöffnung, welche durch cAMP aufgehoben werden kann (Wainger et al. 2001). Interessanterweise bewirkte Xenon in Anwesenheit von erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration sowohl in nativen HCN- als auch in rekombinanten mHCN2-Kanälen keine Verschiebung der Spannungsaktivierungskurve und keine Veränderung der  $I_h$  Amplitude (siehe 3.3.4; 3.3.5). Dieser Befund lässt auf eine cAMP-abhängige Wirkung von Xenon schließen. Die Ergebnisse der transienten Depolarisation (voltage sag) in den „Current-Clamp“-Messungen bestätigen einen cAMP-abhängigen Mechanismus (siehe 3.3.9).

Mit Hilfe eines Immuno-Assay konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Xenon die Menge des sekundären Botenstoffs cAMP in mHCN2 HEK Zellen senkt (siehe 3.3.6), was in Übereinstimmung damit steht, dass die Xenon-vermittelte Inhibition nativer und rekombinanter HCN-Kanäle in Anwesenheit des AC-Inhibitors SQ22536 (siehe 3.3.7; siehe 3.3.8) aufgehoben wird. Diese Ergebnisse weisen auf eine Modulation der AC durch Xenon hin, wodurch sich die resultierende Senkung des basalen cAMP-Levels erklärt. Durch das verminderte intrazelluläre cAMP werden HCN-Kanäle erst bei starker Hyperpolarisation aktiviert und TC-Neuronen zeigen eine verringerte transiente Depolarisation. Für Halothan

und weitere volatile Anästhetika wurde eine Modulation des Metabolismus der zyklischen Nukleotide in verschiedenen Präparaten *in vivo* und *in vitro* beschrieben (Vulliemoz et al. 1986; Vulliemoz und Verosky 1988). Durch diese Anästhetika wird der cGMP-Spiegel erhöht, wohingegen der cAMP-Spiegel gesenkt wird. Die Synthese von cAMP kann über verschiedene Signalwege moduliert werden. Zum einem verläuft die Aktivierung von Adenylatzyklen über die GTP-bindende  $\alpha$ -Untereinheit G-Protein gekoppelter Rezeptoren, welche mit der membranständigen AC interagieren (Taussig und Gilman 1995). Zum anderen kann cAMP durch die zytosolische AC synthetisiert werden, die an sub-zellulären Kompartimenten wie z.B. dem Mitochondrium verankert ist.

Die Informationsweiterleitung durch den Thalamus wird von einer Vielzahl von Neuromodulatoren wie catecholaminergen, cholinergen, adrenergen und serotonergen Eingängen beeinflusst (Govindaiah und Cox 2006). Durch einen Anstieg der Freisetzung von Acetylcholin (ACh), Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) aus den Terminalen des Hirnstamms wird der Übergang zwischen oszillatorischer und tonischer Aktivität vermittelt (McCormick und Bal 1997). Für die Aktivierung der AC spielen insbesondere adrenerge und serotonerge Rezeptoren eine entscheidende Rolle, die eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration induzieren (McCormick und Huguenard 1992; Elmslie 2003). Xenon könnte die  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion hemmen, woraus eine verminderte cAMP Produktion resultiert. Dies führt zu einem niedrigeren cAMP Spiegel und bedingt eine Verschiebung der Aktivierungskurve der HCN-Kanäle in Richtung Hyperpolarisation (Sherman 2005). Dieser Mechanismus scheint eher unwahrscheinlich, da Xenon mHCN2-Rezeptor vermittelte Ströme in HEK-Zellen cAMP-abhängig moduliert, obwohl Neuromodulatoren und der ausschlaggebende Stimulus in diesem System fehlten. Desweiteren würde die Inhibition der  $\beta$ -Adrenozeptoren mit einhergehender verminderter cAMP Produktion, zu einer geringeren Aktivität der Proteinkinase A und zu einer verminderten Phosphorylierung der HVA-Ca<sup>2+</sup>- Kanäle führen. Letztendlich müsste die Aktivität der L- und N-Typ-Kalziumkanäle gesenkt werden (Meuth et al. 2002). Eine Wirkung von Xenon auf Kalziumkanäle wurde in An- und Abwesenheit eines  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten widerlegt (Huneke et al. 2001; Fassel et al. 2003). In dieser Arbeit konnte keine verminderte L-Typ-Kalziumkanal Aktivität unter Xenon festgestellt werden. Dennoch kann im akuten Schnittpräparat eine Xenon-bedingte Modulation des  $\beta$ -adrenergen Systems nicht ausgeschlossen werden und bleibt zu untersuchen.

Durch eine transiente Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -AR) werden HCN-Kanäle aktiviert, wohingegen eine lang anhaltende Aktivierung der Rezeptoren zu einer Desensitivierung führt (Bouvier et al. 1988). Diese Desensitivierung wird möglicherweise *in vivo* durch einen anhaltenden noradrenergen Eingang während Wachheit verursacht (Aston-

Jones und Bloom 1981). Die Depolarisation des Membranpotentials wird durch Reduktion der  $K^+$ -Leckleitfähigkeiten unterstützt, welche ebenfalls durch Freisetzung von Neurotransmittern aus dem ARAS induziert wird (McCormick und Bal 1997). Somit erfüllt NA eine wichtige Funktion in der Kontrolle der cAMP-abhängigen Genexpression während der Wachphase im thalamokortikalen Netzwerk (Cirelli et al. 1996).

Der Transmitter Acetylcholin und nikotinische ACh-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle für die Exzitation kortikaler Neurone. Eine Hemmung dieser Rezeptoren wurde für intravenöse (Ketamin, Propofol) und volatile Anästhetika beschrieben (Yamakura et al. 1995; Flood et al. 1997; Zhang et al. 1997). In dieser Arbeit konnte durch Xenon keine Veränderung der  $K^+$ -Leckleitfähigkeiten nachgewiesen werden, weshalb ein Einfluss auf diese Transmittersysteme unwahrscheinlich zu sein scheint.

#### 4.3.3.4 Dauerhafter Auswärtsstrom ( $I_{so}$ )

TC-Neurone zeigen in Bereichen des physiologischen Ruhemembranpotentials und bei positiveren Membranpotentialen einen dauerhaften Auswärtsstrom ( $I_{so}$ ), der das Membranpotential und damit den Aktivitätsmodus dieser Neurone beeinflusst. Dieser Auswärtsstrom wird hauptsächlich von TASK- und  $K_{ir}$ -Kanälen vermittelt (Abb. 3.3.9) (Meuth et al. 2006). Durch sukzessive Zugabe verschiedener Antagonisten wurde ein pharmakologisches Profil des Auswärtsstroms erstellt. In TC-Neuronen sind eine TTX-sensitive Stromkomponente, die wahrscheinlich den persistierenden  $Na^+$ -Strom darstellt (Parri und Crunelli 1998), eine den  $I_h$ -Strom repräsentierende ZD7288-sensitive Stromkomponente (Maccaferri und McBain 1996) und eine TEA-/4-AP-sensitive Stromkomponente durch verzögerte Gleichrichterkanäle ( $I_{K(Ca)}$ ;  $I_{KS}$ ) (Huguenard et al. 1991; Budde et al. 1992) sowie A-Typ- $K^+$ -Kanäle ( $I_A$ ) (McCormick et al. 1991) an der Leckleitfähigkeit beteiligt. Für die Anästhetika Isofluran und Halothan wurde eine Zunahme der Leckleitfähigkeit beschrieben (Ries und Puil 1999; Budde et al. 2008). Veränderungen der Membranleitfähigkeiten könnten die synaptische Transmission beeinflussen. Eine Inhibition der  $K_2P$ -Kanäle führt zu einer erleichterten glutamatergen synaptischen Transmission (Kadiri et al. 2011). Dem  $I_h$  wird eine wichtige Rolle in der synaptischen Transmission und der hippocampalen LTP diskutiert (Biel et al. 2009), weshalb in dieser Arbeit der Effekt von Xenon auf die synaptische Transmission in Abhängigkeit des dauerhaften Auswärtsstroms  $I_{so}$  untersucht wurde. Unter pharmakologischer Inhibition der zum  $I_{so}$  beitragenden Leitfähigkeiten verminderte Xenon die photolytisch evozierte glutamaterge synaptische Transmission (siehe 3.4.1) im Gleichen Maß, wie unter Bedingungen, bei denen der  $I_{so}$  nicht blockiert war. Somit erfolgt die Reduktion der glutamatergen Transmission auf postsynaptischer Ebene unabhängig von Einflüssen Xenons auf den  $I_h$ . Es wurde beschrieben, dass HCN Kanäle auf präsynaptischer Ebene die

synaptische Transmission über eine Zunahme der zur Transmitterfreisetzung verfügbaren Vesikel modulieren (Beaumont et al. 2002). Die Aktivierung präsynaptischer HCN Kanäle erfolgt entweder durch Hyperpolarisation oder eine durch metabotrope Rezeptoren ( $\beta$ -AR, Serotoninrezeptoren,  $A_1$ - Adenosinrezeptoren,  $\mu$ -Opiodrezeptoren) (Beaumont und Zucker 2000) vermittelte cAMP-abhängige Depolarisation. Die Inhibition präsynaptischer HCN-Kanäle durch Xenon würde daher eine Reduktion der synaptischen Transmission vermuten lassen. Jedoch zeigte sich in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit zuvor veröffentlichten Studien (Haseneder et al. 2009; Haseneder et al. 2009), dass der Effekt von Xenon auf die glutamaterge synaptische Transmission auf postsynaptischer Ebene vermittelt wird. Es kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Xenon-vermittelte Hemmung präsynaptischer HCN-Kanäle die synaptische Transmission beeinflusst. Im akuten Schnittpräparat fehlen die oben genannten modulatorischen Einflüsse auf HCN Kanäle, da die afferenten Verbindungen zum Teil von ihren Ausgangsstrukturen getrennt werden. Somit kann die Auswirkungen einer Xenon-bedingten Inhibition präsynaptisch lokalisierter HCN-Kanäle oder deren Modulatoren auf die synaptische Transmission in diesem experimentellen Ansatz nicht detailliert betrachtet werden und bleibt weiter zu untersuchen.

#### 4.3.3.5 Wirkung von Xenon auf Aktivitätszustände der TC-Neuronen

Ein durch Anästhetika bedingter Wechsel vom tonischen in den oszillatorischen Burst-Modus wurde initial als charakteristisch für den Aktivitätszustand der TC-Neurone während einer Anästhesie beschrieben (Arhem et al. 2003). Im EEG können unter Einfluss von Anästhetika Deltawellen gemessen werden, welche auf der oszillatorischen Aktivität der thalamischen Neurone beruhen, mit einer Hyperpolarisation einhergehen und Folge der Anästhetika vermittelten Änderung des Aktivitätszustandes sind (Franks 2008). Ausschlaggebend für den Aktivitätsmodus der TC-Neuronen im thalamokortikalen Netzwerk ist das Membranpotential.

Für Halothan (Budde et al. 2008) und Isofluran (Ries und Puil 1999) wurde der Wechsel in den oszillatorischen Burst-Modus thalamischer Schaltneurone beschrieben. Dieser wird durch eine Erhöhung der Kalium-Leitfähigkeiten, die zu einer Hyperpolarisation führt, verursacht. In dieser Arbeit zeigte sich unter Xenon keine Veränderung des Ruhemembranpotentials und der Frequenz der Aktionspotentiale, die durch einen depolarisierenden Stimulus ausgelöst wurden (siehe 3.5.1).

Ein weiterer interessanter Angriffspunkt für Anästhetika stellt das niederschwellige  $Ca^{2+}$ -Aktionspotential (LTS) dar. Für Propofol konnte eine Verzögerung des LTS gezeigt werden, welches als Antwort auf eintreffende inhibitorische postsynaptische Potentiale generiert wird (Ying et al. 2006). Das LTS wird durch ein Zusammenspiel der Leitfähigkeiten  $I_T$  und  $I_h$  ermöglicht (McCormick und Pape 1990; Steriade 1997) und bildet die Grundlage für

thalamische Oszillationen. Für die Ausbildung des LTS muss das TC-Neuron unter ein Membranpotential von  $-65$  mV hyperpolarisiert und somit der niederschwellige  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom  $I_T$  vollständig inaktiviert werden (Cain und Snutch 2010). Die auf die Hyperpolarisation folgende Aktivierung von HCN Kanälen führt zur Depolarisation der Membran und somit zur Reaktivierung des  $I_T$ . Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle führt zu einer weiteren Depolarisation bis zum Schwellenpotential für Natriumkanäle, wodurch eine hochfrequente Folge von Aktionspotentialen ausgelöst wird (Perez-Reyes 2003). Somit kann die Ausbildung des LTS durch Modulation von HCN- Kanälen wie auch von spannungsabhängigen Kalziumkanälen beeinflusst werden. Die Xenon vermittelte Inhibition der HCN-Kanäle beeinträchtigt die Reaktivierung des T-Stroms und führt zu einer verzögerten Ausbildung des LTS (rebound burst). Der Zeitverlauf der Aktionspotentiale, die Amplitude und konsequenterweise die Frequenz des LTS werden auch durch die transienten  $\text{K}^+$ -Ströme (repolarisierende Kaliumausstrom ( $I_A$ ); langsame verzögerte gleichrichter Kaliumströme ( $I_{KS}$ ,  $I_{KM}$ ); Kalzium-abhängiger Kaliumstrom ( $I_{KCa}$ )) reguliert (Budde et al. 1992). Eine Wirkung auf den A-Strom erscheint unwahrscheinlich, weil Xenon keinen Einfluss auf Amplitude sowie Kinetik der Aktionspotentiale und der Fläche unter der Kurve des LTS hat.

Der transiente Strom  $I_T$  wird durch T-Typ-Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v3.1$ ) vermittelt, welche für die Aktivierung lediglich eine geringe Depolarisation benötigen (Destexhe und Sejnowski 2003). Die Amplitude und Kinetik des  $I_T$  durch T-Typ-Kalziumkanäle veränderte sich unter Xenon nicht (siehe 3.5.3). In dieser Arbeit konnte zusätzlich keine Wirkung Xenons auf den Nifedipin-sensitiven-L-Typ-Kalziumkanal ( $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$ ) im Hippocampus gezeigt werden, sowie in einer weiteren Studie eine Wirkung auf die Funktion von heterolog exprimierten N-Typ-Kalziumkanälen verneint wurde (White et al. 2005). In Kardiomyozyten des Menschen ist eine Beeinträchtigung des durch den L-Typ-Kalziumkanal vermittelten Stromes durch Halothan und Sevofluran, nicht jedoch durch Xenon beschrieben (Fassl et al. 2003). Halothan beeinflusst Kalziumströme durch direkte Interaktion mit dem L-Typ-Kalziumkanal (Schmidt et al. 1993) und Sevofluran verminderte die Kalziumströme in Ab- und Anwesenheit eines  $\beta$ -adrenergen Agonisten. Für volatile Anästhetika sowie  $\text{N}_2\text{O}$  und Propofol hingegen konnte eine Inhibition der T-Typ-Kalziumkanäle gezeigt werden (Todorovic und Lingle 1998; Ries und Puil 1999; Todorovic et al. 2001).

Die verzögernde Wirkung von Xenon auf den LTS wurde durch die Anwesenheit von erhöhtem intrazellulären cAMP oder den AC-Inhibitor aufgehoben (siehe 3.5.2). Dieser Befund steht im Einklang mit der cAMP-abhängigen Inhibition von HCN-Kanälen durch Xenon. Die durch HCN-Kanäle vermittelten Leitfähigkeiten sind für die thalamische Erregbarkeit und die oszillatorische Aktivität verantwortlich (McCormick und Pape 1990; Pape 1996). Die durch Xenon vermittelte Inhibition der HCN-Kanäle führt zu einer

verminderten Erregbarkeit und damit zu einem leichteren Eintritt in den Burst-Modus der TC-Neuronen.

#### **4.3.4 Xenon erhöht die Erregbarkeit und das Feuerverhalten in RTN-Neurone**

Der RTN ist die einzige inhibitorische Quelle im thalamokortikalen Netzwerk (Ying und Goldstein 2005) und vermittelt eine rückgerichtet hemmende Wechselwirkung auf TC-Neurone (Abb. 1.5.2). Durch die GABAerge Inhibition wird dem RTN eine wichtige modulatorische Rolle in der Effizienz der Übertragung von sensorischen Informationen (Le Masson et al. 2002), der thalamokortikalen Rhythmisität der Tiefschlafphase (Huguenard und Prince 1992), der Modifikation der thalamischen Antwort auf kortikothalamische Erregung (Pinto et al. 2003), der Synchronisierung thalamischer Oszillationen (Steriade 1997) und der Ausbildung der Schlafspindeln (Steriade 2001) zugesprochen. Für Anästhetika ist vor allem die GABAerg vermittelte Hemmung im thalamischen Schaltkreis ein wichtiger pharmakologischer Angriffspunkt. Durch Potenzierung der inhibitorischen synaptischen Transmission wird der Transfer von sensorischen Informationen durch den Thalamus vermindert. Zudem wird über ein Rückkopplungssystem zwischen RTN- und TC-Neuronen der inhibitorische Einfluss auf TC-Neurone verstärkt (Alkire et al. 2000; Ying und Goldstein 2005; Franks 2008). Xenon zeigte jedoch keinen Einfluss auf die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte synaptische Übertragung abgeleitet in TC-Neuronen. Durch Isolation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelten Ströme wurden jedoch die glutamatergen Afferenzen blockiert, sodass die synaptische Transmission unabhängig von der kortikothalamischen Erregung gemessen wurde. Die glutamatergen Verbindungen von kortikothalamischen Fasern (Jones 1984) und TC-Neuronen resultieren im RTN in exzitatorischen postsynaptischen Potentialen. In den im Vergleich zu TC-Neuronen relativ hyperpolarisierten RTN-Neuronen (Perez-Reyes 2003) führen eintreffende EPSPs zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> durch T-Typ Kalziumkanäle (Huguenard und Prince 1992), die ein LTS mit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Aktionspotentialen generieren. Diese Bursts verursachen eine Freisetzung des inhibitorischen Transmitters GABA an Synapsen in TC-Neuronen, die daraufhin hyperpolarisieren und mit Hilfe des I<sub>h</sub> erneut einen LTS auslösen und die intrathalamischen Oszillationen generieren. Die Inhibition kann durch eine Potenzierung postsynaptischer GABA-Rezeptoren verstärkt werden. Dieser Mechanismus wurde für viele Anästhetika beschrieben (Campagna et al. 2003). Für Xenon konnte diese Wirkung nicht beschrieben werden, dennoch verstärkt Xenon den inhibitorischen Einfluss von RTN-Neuronen auf TC-Neuronen und erhöht so die neuronale Erregbarkeit der RTN-Neurone. Der LTS wurde schneller ausgelöst und die Frequenz der induzierten tonischen Aktionspotentiale als Antwort auf einen depolarisierenden Stimulus wurde gesteigert. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Propofol beschrieben. Propofol führt in RTN-Neuronen zu einer gesteigerten Erregbarkeit, indem die Frequenz der Aktionspotentiale auf

einen depolarisierenden Stimulus erhöht wird. Diese Effekte werden durch eine Inhibition der Apamin-sensitiven- $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten- $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{SK}_{\text{CA}}$ ) vermittelt (Ying und Goldstein 2005). Die  $\text{SK}_{\text{CA}}$ -Kanäle vermitteln eine verlängerte Nachhyperpolarisation (AHP; siehe Abb.3.6.1.B), die auf Aktionspotentiale einhergehend mit einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration folgt (Stocker et al. 1999). Die Wirkung von Xenon auf  $\text{SK}_{\text{CA}}$ -Kanäle bleibt zu untersuchen. Eine Aktivierung dieser inhibitorischen retiko-thalamischen Projektionen führt über eine Hyperpolarisation thalamischer Neurone zu einer verminderten thalamokortikalen Informationsübertragung (Steriade 1997). Dies könnte höchstwahrscheinlich ein wesentlicher Mechanismus für die Vermittlung der Komponente Bewusstlosigkeit in der Anästhesie sprechen (Alkire 2000, Franks 2008).

Eine erhöhte Erregbarkeit der RTN-Neurone könnte *in vivo* zu einer gesteigerten Inhibition führen, somit die Xenon-vermittelte Inhibition des ventrobasalen Thalamus noch weiter verstärken und den Informationsfluss durch den Thalamus zum Kortex dämpfen.

#### 4.3.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Amnesie und Bewusstseinsverlust sind spezifische Merkmale der Allgemeinanästhesie und neuronal wahrscheinlich als eigenständige Phänomene zu betrachten. Subanästhetische Konzentrationen nahezu aller Anästhetika bewirken eine Amnesie (Schneider und Kochs 2007), die jedoch nicht zwingend mit einem Bewusstseinsverlust einhergeht. Auf Grund seiner zentralen Rolle in der Weiterleitung sensorischer Informationen zum Kortex wird dem Thalamus eine zentrale Bedeutung für Bewusstsein zugesprochen. Eine Modulation der thalamischen Aktivität könnte Anästhetika-induzierte Bewusstlosigkeit vermitteln (Alkire et al. 2000). Durch die lokale Verabreichung von volatilen Anästhetika und GABA unter experimentellen Bedingungen lässt sich der Thalamus deaktivieren, was zu einer Bewusstlosigkeit führt. Im Tierversuch führt die subthalamische Injektion von Nikotin zu einer Aufhebung der durch Anästhetika induzierten Bewusstlosigkeit (Alkire et al. 2007). (Alkire et al. 2000) beschreibt eine durch Anästhesie hervorgerufene Hyperpolarisation thalamischer Neurone, welche sich in einer verminderten Aktivität des Thalamus und der Formatio reticularis zeigt. Jedoch sind die neuronalen Vorgänge, die letztendlich Bewusstsein vermitteln vielschichtig. Die Verarbeitung eingehender Signale erfordert eine komplexe Integration, beginnend mit dem Transport sensorischer Information durch die Formatio reticularis und das ventrale Tegmentum. TC-Neurone projizieren zur kortikalen Lamina IV und V, während unspezifische Kerne zur Lamina I und II projizieren. Die Information wird von kortikalen Pyramidenneuronen integriert. Kortikothalamische Rückkopplungsmechanismen übertragen die Information zurück zum Thalamus. Bei Patienten mit intrazerebralen Schrittmacherelektroden wurde eine Verlangsamung der elektrischen Aktivität durch Induktion von Anästhetika beschrieben, die im zerebralen Kortex beginnt, bevor die

entsprechende Aktivität im Thalamus abnimmt (Velly et al. 2007). Eine weitere Studie beschreibt eine kortikale Antwort auf transkranielle Magnetstimulation mit nachfolgender Aktivierung unterschiedlicher kortikaler Areale im Wachzustand, wohingegen beim Schlafenden eine primäre Antwort, aber keine nachfolgende Reaktion beobachtet wurde (Alkire 2008). Diese fehlende Aktivierung kann als Verlust der Integrations- und Verarbeitungskapazität interpretiert werden (Deshpande et al. 2010). Die durch Anästhetika induzierte Bewusstlosigkeit spiegelt eine kortikale Desintegration von Information wieder und verhindert durch die Blockade thalamischer Informationsweiterleitung die Aufweckreaktion. Die durch Xenon verminderte Übertragung der exzitatorischen synaptischen Transmission, sowie die verringerte Funktion der HCN-Kanäle und die daraus resultierende verminderte Erregbarkeit thalamokortikaler Neurone einhergehend mit einer Reduktion des Informationsflusses beschreibt einen Mechanismus, über den Xenon seine hypnotischen Eigenschaften vermitteln könnte.



## 5 Zusammenfassung

Das Inhalationsanästhetikum Xenon besitzt Eigenschaften eines idealen Anästhetikums. Die neuronal-molekularen Mechanismen, über die Xenon seine anästhetischen Eigenschaften vermittelt, sind bisher ungeklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Xenon auf die hippocampale synaptische Plastizität sowie auf das thalamokortikale Netzwerk *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Xenon die synaptische Plastizität im hippocampalen Schnittpräparat über eine Verminderung des intrazellulären Kalziumeinstroms hemmt. Die hippocampale Langzeitpotenzierung gilt als *in vitro* Korrelat für Lern- und Gedächtnisvorgänge. Neben spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanälen sind hauptsächlich NMDA-Rezeptoren für den Kalziumeinstrom während der Induktion der Langzeitpotenzierung verantwortlich. Xenon zeigte keinen Einfluss auf L-Typ-Kalziumkanäle, antagonisierte aber synaptisch- und extrasynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren. Diese Wirkung liegt der Xenon-bedingten Hemmung der Langzeitpotenzierung zugrunde, und erscheint als möglicher neuronaler Mechanismus für die amnestischen Eigenschaften von Xenon.

Im thalamokortikalen Netzwerk wurde die glutamaterge synaptische Transmission thalamokortikaler Schaltneurone durch Xenon über einen postsynaptischen Mechanismus vermindert. Xenon zeigte jedoch keine Wirkung auf die inhibitorische GABAerge synaptische Transmission. HCN- und  $K_2P$ -Kanäle sind bedeutsame Komponenten des dauerhaften Auswärtsstroms und deren Aktivität ist entscheidend für die Einstellung des Ruhemembranpotentials. Xenon senkt wahrscheinlich durch Modulation der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Menge und vermindert so die Aktivierbarkeit von HCN-Kanälen. Spannungsabhängige T-Typ-Kanäle wurden von Xenon nicht beeinflusst, dennoch konnte im Zusammenspiel mit HCN-Kanälen eine Verzögerung der auf eine Hyperpolarisation folgende Salve von Aktionspotentialen und somit eine verminderte neuronale Erregbarkeit gezeigt werden.  $K_2P$ -Kanäle und das Ruhemembranpotential werden von Xenon nicht beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass Xenon die Erregbarkeit von RTN-Neuronen erhöht, sog. Rebound-Bursts schneller ausgelöst werden und konsequenterweise die Feuerfrequenz ansteigt. RTN-Neurone projizieren inhibitorisch auf TC-Neurone, wodurch der Informationstransfer vermindert wird. Zusammen mit der durch Xenon reduzierten Übertragung der exzitatorischen synaptischen Transmission, sowie der verringerten Funktion der HCN-Kanäle wird die Erregbarkeit thalamokortikaler Neurone vermindert. Die daraus resultierende Reduktion des Informationsflusses beschreibt einen Mechanismus, über den Xenon seine hypnotischen Eigenschaften vermitteln könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas, S. Y., Ying, S. W., Goldstein, P. A. (2006). "Compartmental distribution of hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channel 2 and hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channel 4 in thalamic reticular and thalamocortical relay neurons." Neuroscience **141**(4): 1811-1825.
- Adams, S. R., Tsien, R. Y. (1993). "Controlling cell chemistry with caged compounds." Annu Rev Physiol **55**: 755-784.
- Agmon, A., Connors, B. W. (1991). "Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro." Neuroscience **41**(2-3): 365-379.
- Akasu, T., Shoji, S., Hasuo, H. (1993). "Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus." Pflugers Arch **425**(1-2): 109-116.
- Alkire, M. T. (2008). "Loss of effective connectivity during general anesthesia." Int Anesthesiol Clin **46**(3): 55-73.
- Alkire, M. T., Haier, R. J., Fallon, J. H. (2000). "Toward a unified theory of narcosis: brain imaging evidence for a thalamocortical switch as the neurophysiologic basis of anesthetic-induced unconsciousness." Conscious Cogn **9**(3): 370-386.
- Alkire, M. T., McReynolds, J. R., Hahn, E. L., Trivedi, A. N. (2007). "Thalamic microinjection of nicotine reverses sevoflurane-induced loss of righting reflex in the rat." Anesthesiology **107**(2): 264-272.
- Amaral, D. G. (1993). "Emerging principles of intrinsic hippocampal organization." Curr Opin Neurobiol **3**(2): 225-229.
- Antognini, J. F., Carstens, E. (2002). "In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components." Br J Anaesth **89**(1): 156-166.
- Antognini, J. F., Schwartz, K. (1993). "Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain." Anesthesiology **79**(6): 1244-1249.
- Arhem, P., Klement, G., Nilsson, J. (2003). "Mechanisms of anesthesia: towards integrating network, cellular, and molecular level modeling." Neuropsychopharmacology **28 Suppl 1**: S40-47.
- Aston-Jones, G., Bloom, F. E. (1981). "Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle." J Neurosci **1**(8): 876-886.
- Asztely, F., Xiao, M. Y., Gustafsson, B. (1996). "Long-term potentiation and paired-pulse facilitation in the hippocampal CA1 region." Neuroreport **7**(10): 1609-1612.

- Augustine, G. J., Charlton, M. P., Smith, S. J. (1987). "Calcium action in synaptic transmitter release." Annu Rev Neurosci **10**: 633-693.
- Bai, D., Zhu, G., Pennefather, P., Jackson, M. F., MacDonald, J. F., Orser, B. A. (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**(4): 814-824.
- Banati, R. B., Cagnin, A., Brooks, D. J., Gunn, R. N., Myers, R., Jones, T., Birch, R., Anand, P. (2001). "Long-term trans-synaptic glial responses in the human thalamus after peripheral nerve injury." Neuroreport **12**(16): 3439-3442.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N., Langer, S. Z. (1998). "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." Pharmacol Rev **50**(2): 291-313.
- Bashir, Z. I., Tam, B., Collingridge, G. L. (1990). "Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for the induction of LTP." Neurosci Lett **108**(3): 261-266.
- Baumert, J. H., Hein, M., Gerets, C., Baltus, T., Hecker, K. E., Rossaint, R. (2007). "The effect of xenon anesthesia on the size of experimental myocardial infarction." Anesth Analg **105**(5): 1200-1206, table of contents.
- Bayliss, D. A., Viana, F., Bellingham, M. C., Berger, A. J. (1994). "Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro." J Neurophysiol **71**(1): 119-128.
- Bear, M. F., Malenka, R. C. (1994). "Synaptic plasticity: LTP and LTD." Curr Opin Neurobiol **4**(3): 389-399.
- Beaumont, V., Zhong, N., Froemke, R. C., Ball, R. W., Zucker, R. S. (2002). "Temporal synaptic tagging by I(h) activation and actin: involvement in long-term facilitation and cAMP-induced synaptic enhancement." Neuron **33**(4): 601-613.
- Beaumont, V., Zucker, R. S. (2000). "Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I<sub>h</sub> channels." Nat Neurosci **3**(2): 133-141.
- Bedi, A., McCarroll, C., Murray, J. M., Stevenson, M. A., Fee, J. P. (2002). "The effects of subanaesthetic concentrations of xenon in volunteers." Anaesthesia **57**(3): 233-241.
- Behnke, A., Yarborough OD (1939). "Respiratory resistance, oil-water-solubility and mental effects of argon compared with helium and nitrogen." Am J Physiol **126**: 409-415.
- Bekkers, J. M., Stevens, C. F. (1989). "NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus." Nature **341**(6239): 230-233.

- Bence, A. K., Rogers, D. T., Worthen, D. R., Fu, M., Littleton, J. M., Crooks, P. A. (2000). "Aminoanthraquinones as novel ligands at the polyamine binding site on the N-methyl-D-aspartate receptor complex." Bioorg Med Chem Lett **10**(23): 2621-2623.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Lipp, P. (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature **395**(6703): 645-648.
- Bieda, M. C., MacIver, M. B. (2004). "Major role for tonic GABAA conductances in anesthetic suppression of intrinsic neuronal excitability." J Neurophysiol **92**(3): 1658-1667.
- Bieda, M. C., Su, H., Maciver, M. B. (2009). "Anesthetics discriminate between tonic and phasic gamma-aminobutyric acid receptors on hippocampal CA1 neurons." Anesth Analg **108**(2): 484-490.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., Zong, X. (2009). "Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function." Physiol Rev **89**(3): 847-885.
- Birbaumer, N., Ghanayim, N., Hinterberger, T., Iversen, I., Kotchoubey, B., Kubler, A., Perelmouter, J., Taub, E., Flor, H. (1999). "A spelling device for the paralysed." Nature **398**(6725): 297-298.
- Blanton, M. G., Lo Turco, J. J., Kriegstein, A. R. (1989). "Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex." J Neurosci Methods **30**(3): 203-210.
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Bloom, F. E., Iversen, L. L. (1971). "Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography." Nature **229**(5287): 628-630.
- Boomsma, F., Ruprecht, J., Man in 't Veld, A. J., de Jong, F. H., Dzoljic, M., Lachmann, B. (1990). "Haemodynamic and neurohumoral effects of xenon anaesthesia. A comparison with nitrous oxide." Anaesthesia **45**(4): 273-278.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F., Lipp, P. (2001). "Calcium signalling--an overview." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 3-10.
- Bormann, J., Ferrero, P., Guidotti, A., Costa, E. (1985). "Neuropeptide modulation of GABA receptor C1- channels." Regul Pept Suppl **4**: 33-38.
- Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1988). "Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization." Nature **333**(6171): 370-373.
- Brocher, S., Artola, A., Singer, W. (1992). "Intracellular injection of Ca<sup>2+</sup> chelators blocks induction of long-term depression in rat visual cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 123-127.

- Broomand, A., Mannikko, R., Larsson, H. P., Elinder, F. (2003). "Molecular movement of the voltage sensor in a K channel." J Gen Physiol **122**(6): 741-748.
- Budde, T., Coulon, P., Pawlowski, M., Meuth, P., Kanyshkova, T., Japes, A., Meuth, S. G., Pape, H. C. (2008). "Reciprocal modulation of I (h) and I (TASK) in thalamocortical relay neurons by halothane." Pflugers Arch **456**(6): 1061-1073.
- Budde, T., Mager, R., Pape, H. C. (1992). "Different Types of Potassium Outward Current in Relay Neurons Acutely Isolated from the Rat Lateral Geniculate Nucleus." Eur J Neurosci **4**(8): 708-722.
- Burnashev, N. (1998). "Calcium permeability of ligand-gated channels." Cell Calcium **24**(5-6): 325-332.
- Cain, S. M., Snutch, T. P. (2010). "Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing." Channels (Austin) **4**(6): 475-482.
- Campagna, J. A., Miller, K. W., Forman, S. A. (2003). "Mechanisms of actions of inhaled anesthetics." N Engl J Med **348**(21): 2110-2124.
- Caraiscos, V. B., Newell, J. G., You-Ten, K. E., Elliott, E. M., Rosahl, T. W., Wafford, K. A., MacDonald, J. F., Orser, B. A. (2004). "Selective enhancement of tonic GABAergic inhibition in murine hippocampal neurons by low concentrations of the volatile anesthetic isoflurane." J Neurosci **24**(39): 8454-8458.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., Striessnig, J. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 411-425.
- Chen, X., Sirois, J. E., Lei, Q., Talley, E. M., Lynch, C., 3rd, Bayliss, D. A. (2005). "HCN subunit-specific and cAMP-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents." J Neurosci **25**(24): 5803-5814.
- Cirelli, C., Pompeiano, M., Tononi, G. (1996). "Neuronal gene expression in the waking state: a role for the locus coeruleus." Science **274**(5290): 1211-1215.
- Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E., Westbrook, G. L. (1992). "The time course of glutamate in the synaptic cleft." Science **258**(5087): 1498-1501.
- Coan, E. J., Saywood, W., Collingridge, G. L. (1987). "MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices." Neurosci Lett **80**(1): 111-114.
- Coburn, M., Maze, M., Franks, N. P. (2008). "The neuroprotective effects of xenon and helium in an in vitro model of traumatic brain injury." Crit Care Med **36**(2): 588-595.
- Coulon, P., Kanyshkova, T., Broicher, T., Munsch, T., Wettschureck, N., Seidenbecher, T., Meuth, S. G., Offermanns, S., Pape, H. C., Budde, T. (2010). "Activity Modes in Thalamocortical Relay Neurons are Modulated by G(q)/G(11) Family G-proteins - Serotonergic and Glutamatergic Signaling." Front Cell Neurosci **4**: 132.

- Cueni, L., Canepari, M., Lujan, R., Emmenegger, Y., Watanabe, M., Bond, C. T., Franken, P., Adelman, J. P., Luthi, A. (2008). "T-type Ca<sup>2+</sup> channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites." Nat Neurosci **11**(6): 683-692.
- Cullen, S. C., Eger, E. I., 2nd, Cullen, B. F., Gregory, P. (1969). "Observations on the anesthetic effect of the combination of xenon and halothane." Anesthesiology **31**(4): 305-309.
- Cullen, S. C., Gross, E. G. (1951). "The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton." Science **113**(2942): 580-582.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.
- Daniels, S., Roberts, R. J. (1998). "Post-synaptic inhibitory mechanisms of anaesthesia; glycine receptors." Toxicol Lett **100-101**: 71-76.
- de Sousa, S. L., Dickinson, R., Lieb, W. R., Franks, N. P. (2000). "Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon." Anesthesiology **92**(4): 1055-1066.
- Deshpande, G., Keressens, C., Sebel, P. S., Hu, X. (2010). "Altered local coherence in the default mode network due to sevoflurane anesthesia." Brain Res **1318**: 110-121.
- Destexhe, A., Sejnowski, T. J. (2003). "Interactions between membrane conductances underlying thalamocortical slow-wave oscillations." Physiol Rev **83**(4): 1401-1453.
- Diamond, J. S., Jahr, C. E. (2000). "Synaptically released glutamate does not overwhelm transporters on hippocampal astrocytes during high-frequency stimulation." J Neurophysiol **83**(5): 2835-2843.
- Dickinson, R., Peterson, B. K., Banks, P., Simillis, C., Martin, J. C., Valenzuela, C. A., Maze, M., Franks, N. P. (2007). "Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology." Anesthesiology **107**(5): 756-767.
- DiFrancesco, D., Tortora, P. (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." Nature **351**(6322): 145-147.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**(1): 7-61.
- Dingley, J., Tooley, J., Porter, H., Thoresen, M. (2006). "Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia." Stroke **37**(2): 501-506.
- Dinse, A., Fohr, K. J., Georgieff, M., Beyer, C., Bulling, A., Weigt, H. U. (2005). "Xenon reduces glutamate-, AMPA-, and kainate-induced membrane currents in cortical neurones." Br J Anaesth **94**(4): 479-485.

- Dodt, H. U., Eder, M., Schierloh, A., Zieglgansberger, W. (2002). "Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices." Sci STKE **2002**(120): pl2.
- Dodt, H. U., Zieglgansberger, W. (1990). "Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy." Brain Res **537**(1-2): 333-336.
- Dodt, H. U., Zieglgansberger, W. (1994). "Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function." Trends Neurosci **17**(11): 453-458.
- Dodt, H. U., Zieglgansberger, W. (1998). "Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy." Histochem J **30**(3): 141-152.
- Doller, H. J., Weight, F. F. (1982). "Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway." Brain Res **237**(1): 1-13.
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M., Greenberg, M. E. (2001). "Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway." Science **294**(5541): 333-339.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.
- Eagle, H. (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures." Science **130**(3373): 432-437.
- Eder, M., Zieglgansberger, W., Dodt, H. U. (2002). "Neocortical long-term potentiation and long-term depression: site of expression investigated by infrared-guided laser stimulation." J Neurosci **22**(17): 7558-7568.
- Eger, E. I., 2nd, Sonner, J. M. (2006). "Anaesthesia defined (gentlemen, this is no humbug)." Best Pract Res Clin Anaesthesiol **20**(1): 23-29.
- Elmslie, K. S. (2003). "Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels." J Bioenerg Biomembr **35**(6): 477-489.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., Catterall, W. A. (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." Neuron **25**(3): 533-535.
- Fahn, S., Cote, L. J. (1968). "Regional distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey." J Neurochem **15**(3): 209-213.
- Farrant, M., Kaila, K. (2007). "The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling." Prog Brain Res **160**: 59-87.
- Fassl, J., Halaszovich, C. R., Huneke, R., Jungling, E., Rossaint, R., Luckhoff, A. (2003). "Effects of inhalational anesthetics on L-type Ca<sup>2+</sup> currents in human atrial cardiomyocytes during beta-adrenergic stimulation." Anesthesiology **99**(1): 90-96.

- Fink, H., Blobner, M., Bogdanski, R., Hanel, F., Werner, C., Kochs, E. (2000). "Effects of xenon on cerebral blood flow and autoregulation: an experimental study in pigs." Br J Anaesth **84**(2): 221-225.
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J. N., Mohacsi, E., Heitz, M. P., Kemp, J. A. (1997). "Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro." J Pharmacol Exp Ther **283**(3): 1285-1292.
- Fiset, P., Paus, T., Daloz, T., Plourde, G., Meuret, P., Bonhomme, V., Hajj-Ali, N., Backman, S. B., Evans, A. C. (1999). "Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study." J Neurosci **19**(13): 5506-5513.
- Flint, A. C., Maisch, U. S., Weishaupt, J. H., Kriegstein, A. R., Monyer, H. (1997). "NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex." J Neurosci **17**(7): 2469-2476.
- Flood, P., Ramirez-Latorre, J., Role, L. (1997). "Alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system are inhibited by isoflurane and propofol, but alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptors are unaffected." Anesthesiology **86**(4): 859-865.
- Foster, K. A., McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., Sheng, M. (2010). "Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation." J Neurosci **30**(7): 2676-2685.
- Franks, J. J., Horn, J. L., Janicki, P. K., Singh, G. (1995). "Halothane, isoflurane, xenon, and nitrous oxide inhibit calcium ATPase pump activity in rat brain synaptic plasma membranes." Anesthesiology **82**(1): 108-117.
- Franks, N. P. (2008). "General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal." Nat Rev Neurosci **9**(5): 370-386.
- Franks, N. P., Dickinson, R., de Sousa, S. L., Hall, A. C., Lieb, W. R. (1998). "How does xenon produce anaesthesia?" Nature **396**(6709): 324.
- Franks, N. P., Honore, E. (2004). "The TREK K<sub>2</sub>P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection." Trends Pharmacol Sci **25**(11): 601-608.
- Franks, N. P., Lieb, W. R. (1994). "Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia." Nature **367**(6464): 607-614.
- Franks, N. P., Lieb, W. R. (1998). "Which molecular targets are most relevant to general anaesthesia?" Toxicol Lett **100-101**: 1-8.
- Franks, N. P., Lieb, W. R. (1999). "Background K<sup>+</sup> channels: an important target for volatile anaesthetics?" Nat Neurosci **2**(5): 395-396.



- Gadea, A., Lopez-Colome, A. M. (2001). "Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters." J Neurosci Res **63**(6): 461-468.
- Gambrill, A. C., Barria, A. (2011). "NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(14): 5855-5860.
- Gasparini, S., DiFrancesco, D. (1997). "Action of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons." Pflugers Arch **435**(1): 99-106.
- Georgiev, S. K., Furue, H., Baba, H., Kohno, T. (2010). "Xenon inhibits excitatory but not inhibitory transmission in rat spinal cord dorsal horn neurons." Mol Pain **6**: 25.
- Goto, T., Saito, H., Shinkai, M., Nakata, Y., Ichinose, F., Morita, S. (1997). "Xenon provides faster emergence from anesthesia than does nitrous oxide-sevoflurane or nitrous oxide-isoflurane." Anesthesiology **86**(6): 1273-1278.
- Govindaiah, G., Cox, C. L. (2006). "Modulation of thalamic neuron excitability by orexins." Neuropharmacology **51**(3): 414-425.
- Grasshoff, C., Rudolph, U., Antkowiak, B. (2005). "Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept." Curr Opin Anaesthesiol **18**(4): 386-391.
- Groc, L., Bard, L., Choquet, D. (2009). "Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives." Neuroscience **158**(1): 4-18.
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S. L., Stephenson, F. A., Lounis, B., Cognet, L., Choquet, D. (2006). "NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18769-18774.
- Grossman, A., Lieberman, A. R., Webster, K. E. (1973). "A Golgi study of the rat dorsal lateral geniculate nucleus." J Comp Neurol **150**(4): 441-466.
- Grover, L. M., Teyler, T. J. (1990). "Differential effects of NMDA receptor antagonist APV on tetanic stimulation induced and calcium induced potentiation." Neurosci Lett **113**(3): 309-314.
- Gruss, M., Bushell, T. J., Bright, D. P., Lieb, W. R., Mathie, A., Franks, N. P. (2004). "Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane." Mol Pharmacol **65**(2): 443-452.
- Guillery, R. W. (1966). "A study of Golgi preparations from the dorsal lateral geniculate nucleus of the adult cat." J Comp Neurol **128**(1): 21-50.
- Guillery, R. W., Sherman, S. M. (2002). "Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system." Neuron **33**(2): 163-175.

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Hapfelmeier, G., Haseneder, R., Schneck, H., Kochs, E. (2000). "[Patch clamp studies on recombinant GABA A receptors using an ultra-quick application system]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **35**(9): 601-603.
- Hapfelmeier, G., Zieglgansberger, W., Haseneder, R., Schneck, H., Kochs, E. (2000). "Nitrous oxide and xenon increase the efficacy of GABA at recombinant mammalian GABA(A) receptors." Anesth Analg **91**(6): 1542-1549.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., Bading, H. (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nat Neurosci **5**(5): 405-414.
- Harris, A. Z., Pettit, D. L. (2007). "Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices." J Physiol **584**(Pt 2): 509-519.
- Harris, A. Z., Pettit, D. L. (2008). "Recruiting extrasynaptic NMDA receptors augments synaptic signaling." J Neurophysiol **99**(2): 524-533.
- Hartmann, A., Wassman, H., Czernicki, Z., Dettmers, C., Schumacher, H. W., Tsuda, Y. (1987). "Effect of stable xenon in room air on regional cerebral blood flow and electroencephalogram in normal baboons." Stroke **18**(3): 643-648.
- Haseneder, R., Kratzer, S., Kochs, E., Eckle, V. S., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2008). "Xenon reduces N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala." Anesthesiology **109**(6): 998-1006.
- Haseneder, R., Kratzer, S., Kochs, E., Hofelmann, D., Auberson, Y., Eder, M., Rammes, G. (2009). "The xenon-mediated antagonism against the NMDA receptor is non-selective for receptors containing either NR2A or NR2B subunits in the mouse amygdala." Eur J Pharmacol **619**(1-3): 33-37.
- Haseneder, R., Kratzer, S., Kochs, E., Mattusch, C., Eder, M., Rammes, G. (2009). "Xenon attenuates excitatory synaptic transmission in the rodent prefrontal cortex and spinal cord dorsal horn." Anesthesiology **111**(6): 1297-1307.
- Haseneder, R., Kratzer, S., von Meyer, L., Eder, M., Kochs, E., Rammes, G. (2009). "Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation." Eur J Pharmacol **623**(1-3): 47-51.
- Hell, J. W., Yokoyama, C. T., Wong, S. T., Warner, C., Snutch, T. P., Catterall, W. A. (1993). "Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit." J Biol Chem **268**(26): 19451-19457.
- Hemmings, H. C., Jr., Akabas, M. H., Goldstein, P. A., Trudell, J. R., Orser, B. A., Harrison, N. L. (2005). "Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action." Trends Pharmacol Sci **26**(10): 503-510.

- Hentschke, H., Schwarz, C., Antkowiak, B. (2005). "Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABAA receptor-mediated inhibition." Eur J Neurosci **21**(1): 93-102.
- Henze, D. A., Borhegyi, Z., Csicsvari, J., Mamiya, A., Harris, K. D., Buzsaki, G. (2000). "Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo." J Neurophysiol **84**(1): 390-400.
- Hertz, L. (2006). "Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III." Neurochem Int **48**(6-7): 416-425.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski, M. (2004). "TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia." EMBO J **23**(13): 2684-2695.
- Hoffmann, H., Gremme, T., Hatt, H., Gottmann, K. (2000). "Synaptic activity-dependent developmental regulation of NMDA receptor subunit expression in cultured neocortical neurons." J Neurochem **75**(4): 1590-1599.
- Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Heinemann, S. (1994). "Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc." Ren Physiol Biochem **17**(3-4): 182-183.
- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991). "Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition." Science **252**(5007): 851-853.
- Holscher, C. (1999). "Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond." J Neurosci Res **58**(1): 62-75.
- Honore, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P., Lodge, D., Nielsen, F. E. (1988). "Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists." Science **241**(4866): 701-703.
- Horn, J. L., Janicki, P. K., Franks, J. J. (1995). "Nitrous oxide and xenon enhance phospholipid-N-methylation in rat brain synaptic plasma membranes." Life Sci **56**(25): PL455-460.
- Huguenard, J. R., Coulter, D. A., Prince, D. A. (1991). "A fast transient potassium current in thalamic relay neurons: kinetics of activation and inactivation." J Neurophysiol **66**(4): 1304-1315.
- Huguenard, J. R., McCormick, D. A. (2007). "Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations." Trends Neurosci **30**(7): 350-356.
- Huguenard, J. R., Prince, D. A. (1992). "A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus." J Neurosci **12**(10): 3804-3817.

- Huneke, R., Jungling, E., Skasa, M., Rossaint, R., Luckhoff, A. (2001). "Effects of the anesthetic gases xenon, halothane, and isoflurane on calcium and potassium currents in human atrial cardiomyocytes." Anesthesiology **95**(4): 999-1006.
- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A., Ohmori, H. (1999). "Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node." J Biol Chem **274**(18): 12835-12839.
- Ishizeki, J., Nishikawa, K., Kubo, K., Saito, S., Goto, F. (2008). "Amnestic concentrations of sevoflurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through gamma-aminobutyric acid-mediated mechanisms." Anesthesiology **108**(3): 447-456.
- Jahnsen, H., Llinas, R. (1984). "Voltage-dependent burst-to-tonic switching of thalamic cell activity: an in vitro study." Arch Ital Biol **122**(1): 73-82.
- Jia, F., Pignataro, L., Schofield, C. M., Yue, M., Harrison, N. L., Goldstein, P. A. (2005). "An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons." J Neurophysiol **94**(6): 4491-4501.
- Jodar, L., Kaneto, H. (1995). "Synaptic plasticity: stairway to memory." Jpn J Pharmacol **68**(4): 359-387.
- Johnson, J. P., Jr., Zagotta, W. N. (2005). "The carboxyl-terminal region of cyclic nucleotide-modulated channels is a gating ring, not a permeation path." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2742-2747.
- Joksovic, P. M., Covey, D. F., Todorovic, S. M. (2007). "Inhibition of T-type calcium current in the reticular thalamic nucleus by a novel neuroactive steroid." Ann N Y Acad Sci **1122**: 83-94.
- Jones, E. G. (1983). "Lack of collateral thalamocortical projections to fields of the first somatic sensory cortex in monkeys." Exp Brain Res **52**(3): 375-384.
- Jones, E. G. (2009). "Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex." Ann N Y Acad Sci **1157**: 10-23.
- Jones, E. L. (1984). "Reticulum cells: characterization and immune functions and the nature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells." J Pathol **144**(4): 227-232.
- Jones, K. A., Baughman, R. W. (1991). "Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture." Neuron **7**(4): 593-603.
- Juusola, M. (1994). "Measuring complex admittance and receptor current by single electrode voltage-clamp." J Neurosci Methods **53**(1): 1-6.
- Kadiri, N., Rodeau, J. L., Schlichter, R., Hugel, S. (2011). "Neurotensin inhibits background K<sup>+</sup> channels and facilitates glutamatergic transmission in rat spinal cord dorsal horn." Eur J Neurosci **34**(8): 1230-1240.

- Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Muller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K. H., Daut, J., Karschin, A. (2001). "Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system." Mol Cell Neurosci **18**(6): 632-648.
- Kendig, J. J. (2002). "In vitro networks: subcortical mechanisms of anaesthetic action." Br J Anaesth **89**(1): 91-101.
- Kew, J. N., Kemp, J. A. (1998). "An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones." J Physiol **512 ( Pt 1)**: 17-28.
- Klann, E., Chen, S. J., Sweatt, J. D. (1993). "Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8337-8341.
- Koblin, D. D., Fang, Z., Eger, E. I., 2nd, Laster, M. J., Gong, D., Ionescu, P., Halsey, M. J., Trudell, J. R. (1998). "Minimum alveolar concentrations of noble gases, nitrogen, and sulfur hexafluoride in rats: helium and neon as nonimmobilizers (nonanesthetics)." Anesth Analg **87**(2): 419-424.
- Krupp, J. J., Vissel, B., Heinemann, S. F., Westbrook, G. L. (1996). "Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific." Mol Pharmacol **50**(6): 1680-1688.
- Kullmann, D. M., Asztely, F. (1998). "Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications." Trends Neurosci **21**(1): 8-14.
- Kumar, N. M., Gilula, N. B. (1996). "The gap junction communication channel." Cell **84**(3): 381-388.
- Kuriyama, K., Ueha, T. (1992). "Functional alterations in cerebral GABAA receptor complex associated with formation of alcohol dependence: analysis using GABA-dependent <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> influx into neuronal membrane vesicles." Alcohol Alcohol **27**(4): 335-343.
- Lachmann, B., Armbruster, S., Schairer, W., Landstra, M., Trouwborst, A., Van Daal, G. J., Kusuma, A., Erdmann, W. (1990). "Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anaesthetic." Lancet **335**(8703): 1413-1415.
- Le Masson, G., Renaud-Le Masson, S., Debay, D., Bal, T. (2002). "Feedback inhibition controls spike transfer in hybrid thalamic circuits." Nature **417**(6891): 854-858.
- Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., Jahr, C. E. (1990). "Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents." Nature **346**(6284): 565-567.
- Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T. H., Raymond, L. A. (2002). "Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors." Nat Neurosci **5**(9): 833-834.

- Liu, X. B., Murray, K. D., Jones, E. G. (2004). "Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development." J Neurosci **24**(40): 8885-8895.
- Lledo, P. M., Hjelmstad, G. O., Mukherji, S., Soderling, T. R., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1995). "Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11175-11179.
- Lozovaya, N. A., Grebenyuk, S. E., Tsintsadze, T., Feng, B., Monaghan, D. T., Krishtal, O. A. (2004). "Extrasynaptic NR2B and NR2D subunits of NMDA receptors shape 'superslow' afterburst EPSC in rat hippocampus." J Physiol **558**(Pt 2): 451-463.
- Lubke, J. (1993). "Morphology of neurons in the thalamic reticular nucleus (TRN) of mammals as revealed by intracellular injections into fixed brain slices." J Comp Neurol **329**(4): 458-471.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M., Hofmann, F. (2003). "Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2." EMBO J **22**(2): 216-224.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., Biel, M. (1999). "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." EMBO J **18**(9): 2323-2329.
- Lukatch, H. S., MacIver, M. B. (1997). "Voltage-clamp analysis of halothane effects on GABA(A fast) and GABA(A slow) inhibitory currents." Brain Res **765**(1): 108-112.
- Luthi, A., McCormick, D. A. (1998). "H-current: properties of a neuronal and network pacemaker." Neuron **21**(1): 9-12.
- Luthi, A., McCormick, D. A. (1998). "Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca<sup>2+</sup>-mediated upregulation of Ih." Neuron **20**(3): 553-563.
- Luttrupp, H. H., Romner, B., Perhag, L., Eskilsson, J., Fredriksen, S., Werner, O. (1993). "Left ventricular performance and cerebral haemodynamics during xenon anaesthesia. A transoesophageal echocardiography and transcranial Doppler sonography study." Anaesthesia **48**(12): 1045-1049.
- Lynch, D. R., Guttman, R. P. (2001). "NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology." Curr Drug Targets **2**(3): 215-231.
- Lynch, D. R., Guttman, R. P. (2002). "Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 717-723.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., Schottler, F. (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." Nature **305**(5936): 719-721.

- Maccaferri, G., McBain, C. J. (1996). "The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons." J Physiol **497** ( Pt 1): 119-130.
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., Barker, J. L. (1986). "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones." Nature **321**(6069): 519-522.
- MacVicar, B. A. (1984). "Infrared video microscopy to visualize neurons in the in vitro brain slice preparation." J Neurosci Methods **12**(2): 133-139.
- Malenka, D. J., O'Connor, G. T. (1995). "A regional collaborative effort for CQI in cardiovascular disease. Northern New England Cardiovascular Study Group." Jt Comm J Qual Improv **21**(11): 627-633.
- Malenka, R. C., Kauer, J. A., Perkel, D. J., Nicoll, R. A. (1989). "The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation." Trends Neurosci **12**(11): 444-450.
- Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" Science **285**(5435): 1870-1874.
- Malherbe, P., Mutel, V., Broger, C., Perin-Dureau, F., Kemp, J. A., Neyton, J., Paoletti, P., Kew, J. N. (2003). "Identification of critical residues in the amino terminal domain of the human NR2B subunit involved in the RO 25-6981 binding pocket." J Pharmacol Exp Ther **307**(3): 897-905.
- Malinow, R., Schulman, H., Tsien, R. W. (1989). "Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP." Science **245**(4920): 862-866.
- Maren, S., Baudry, M. (1995). "Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory." Neurobiol Learn Mem **63**(1): 1-18.
- Martin, L. J., Oh, G. H., Orser, B. A. (2009). "Etomidate targets alpha5 gamma-aminobutyric acid subtype A receptors to regulate synaptic plasticity and memory blockade." Anesthesiology **111**(5): 1025-1035.
- Martin, L. J., Zurek, A. A., MacDonald, J. F., Roder, J. C., Jackson, M. F., Orser, B. A. (2010). "Alpha5GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory." J Neurosci **30**(15): 5269-5282.
- Marx, T., Froeba, G., Wagner, D., Baeder, S., Goertz, A., Georgieff, M. (1997). "Effects on haemodynamics and catecholamine release of xenon anaesthesia compared with total i.v. anaesthesia in the pig." Br J Anaesth **78**(3): 326-327.
- Mashour, G. A., Wang, L. Y., Turner, C. R., Vandervest, J. C., Shanks, A., Tremper, K. K. (2009). "A retrospective study of intraoperative awareness with methodological implications." Anesth Analg **108**(2): 521-526.

- Mayer, M. L., Westbrook, G. L. (1987). "Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones." J Physiol **394**: 501-527.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L. (1987). "The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system." Prog Neurobiol **28**(3): 197-276.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B. (1984). "Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-263.
- McCormick, D. A., Bal, T. (1997). "Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms." Annu Rev Neurosci **20**: 185-215.
- McCormick, D. A., Huguenard, J. R. (1992). "A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons." J Neurophysiol **68**(4): 1384-1400.
- McCormick, D. A., Pape, H. C. (1990). "Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones." J Physiol **431**: 291-318.
- McCormick, D. A., Pape, H. C., Williamson, A. (1991). "Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system." Prog Brain Res **88**: 293-305.
- Meuth, S., Pape, H. C., Budde, T. (2002). "Modulation of Ca<sup>2+</sup> currents in rat thalamocortical relay neurons by activity and phosphorylation." Eur J Neurosci **15**(10): 1603-1614.
- Meuth, S. G., Budde, T., Kanyshkova, T., Broicher, T., Munsch, T., Pape, H. C. (2003). "Contribution of TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons." J Neurosci **23**(16): 6460-6469.
- Meuth, S. G., Kanyshkova, T., Meuth, P., Landgraf, P., Munsch, T., Ludwig, A., Hofmann, F., Pape, H. C., Budde, T. (2006). "Membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels." J Neurophysiol **96**(3): 1517-1529.
- Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., Mascia, M. P., Valenzuela, C. F., Hanson, K. K., Greenblatt, E. P., Harris, R. A., Harrison, N. L. (1997). "Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors." Nature **389**(6649): 385-389.
- Mody, I., Pearce, R. A. (2004). "Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors." Trends Neurosci **27**(9): 569-575.
- Mohler, H., Fritschy, J. M., Luscher, B., Rudolph, U., Benson, J., Benke, D. (1996). "The GABAA receptors. From subunits to diverse functions." Ion Channels **4**: 89-113.



- Monaghan, D. T., Bridges, R. J., Cotman, C. W. (1989). "The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system." Annu Rev Pharmacol Toxicol **29**: 365-402.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1992). "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." Science **256**(5060): 1217-1221.
- Mooney, R., Madison, D. V., Shatz, C. J. (1993). "Enhancement of transmission at the developing retinogeniculate synapse." Neuron **10**(5): 815-825.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (1999). "Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain." Biol Chem **380**(7-8): 975-980.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (2001). "Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues." Eur J Biochem **268**(6): 1646-1652.
- Mori, H., Mishina, M. (1995). "Structure and function of the NMDA receptor channel." Neuropharmacology **34**(10): 1219-1237.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., Baudry, M. (1986). "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5." Nature **319**(6056): 774-776.
- Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P. H., Ruppersberg, J. P. (1994). "A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors." Science **266**(5187): 1059-1062.
- Mott, D. D., Lewis, D. V. (1991). "Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABAB receptors." Science **252**(5013): 1718-1720.
- Munoz, A., Woods, T. M., Jones, E. G. (1999). "Laminar and cellular distribution of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in monkey sensory-motor cortex." J Comp Neurol **407**(4): 472-490.
- Mutel, V., Buchy, D., Klingelschmidt, A., Messer, J., Bleuel, Z., Kemp, J. A., Richards, J. G. (1998). "In vitro binding properties in rat brain of [3H]Ro 25-6981, a potent and selective antagonist of NMDA receptors containing NR2B subunits." J Neurochem **70**(5): 2147-2155.
- Nagashima, K., Zorumski, C. F., Izumi, Y. (2005). "Propofol inhibits long-term potentiation but not long-term depression in rat hippocampal slices." Anesthesiology **103**(2): 318-326.

- Nakata, Y., Goto, T., Ishiguro, Y., Terui, K., Kawakami, H., Santo, M., Niimi, Y., Morita, S. (2001). "Minimum alveolar concentration (MAC) of xenon with sevoflurane in humans." Anesthesiology **94**(4): 611-614.
- Neyton, J., Paoletti, P. (2006). "Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach." J Neurosci **26**(5): 1331-1333.
- Notomi, T., Shigemoto, R. (2004). "Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain." J Comp Neurol **471**(3): 241-276.
- Numberger M, D. A., Ed. (1996). Patch Clamp Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin-Oxford.
- Olpe, H. R., Karlsson, G., Pozza, M. F., Brugger, F., Steinmann, M., Van Riezen, H., Fagg, G., Hall, R. G., Froestl, W., Bittiger, H. (1990). "CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors." Eur J Pharmacol **187**(1): 27-38.
- Otsubo, T., Maekawa, M., Nagai, T., Sakio, H., Hori, Y. (2008). "Facilitatory effects of subanesthetic sevoflurane on excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity in the mouse hippocampal CA1 area." Brain Res **1197**: 32-39.
- Ouardouz, M., Durand, J. (1991). "GYKI 52466 antagonizes glutamate responses but not NMDA and kainate responses in rat abducens motoneurons." Neurosci Lett **125**(1): 5-8.
- Pape, H. C. (1996). "Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons." Annu Rev Physiol **58**: 299-327.
- Pape, H. C., McCormick, D. A. (1989). "Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current." Nature **340**(6236): 715-718.
- Pape, H. C., Narayanan, R. T., Smid, J., Stork, O., Seidenbecher, T. (2005). "Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory." Hippocampus **15**(7): 874-880.
- Pape, H. C. M., S.G. (2005). "Der Thalamus: Tor zum Bewusstsein und Rythmusgenerator im Gehirn." Neuroforum **2/05**: 44-45.
- Parri, H. R., Crunelli, V. (1998). "Sodium current in rat and cat thalamocortical neurons: role of a non-inactivating component in tonic and burst firing." J Neurosci **18**(3): 854-867.
- Parsons, C. G., Stoffler, A., Danysz, W. (2007). "Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse." Neuropharmacology **53**(6): 699-723.
- Patel, A. J., Honore, E. (2001). "Anesthetic-sensitive 2P domain K+ channels." Anesthesiology **95**(4): 1013-1021.

- Patel, A. J., Honore, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M. (1999). "Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels." Nat Neurosci **2**(5): 422-426.
- Patterson, S. L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K. C., Scanlin, H., Drake, C., Kandel, E. R. (2001). "Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase." Neuron **32**(1): 123-140.
- Perez-Reyes, E. (2003). "Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels." Physiol Rev **83**(1): 117-161.
- Petzelt, C., Taschenberger, G., Schmehl, W., Kox, W. J. (1999). "Xenon-induced inhibition of Ca<sup>2+</sup>-regulated transitions in the cell cycle of human endothelial cells." Pflugers Arch **437**(5): 737-744.
- Pinto, D. J., Hartings, J. A., Brumberg, J. C., Simons, D. J. (2003). "Cortical damping: analysis of thalamocortical response transformations in rodent barrel cortex." Cereb Cortex **13**(1): 33-44.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G. (2000). "GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain." Neuroscience **101**(4): 815-850.
- Plested, A. J., Wildman, S. S., Lieb, W. R., Franks, N. P. (2004). "Determinants of the sensitivity of AMPA receptors to xenon." Anesthesiology **100**(2): 347-358.
- Porcello, D. M., Huntsman, M. M., Mihalek, R. M., Homanics, G. E., Huguenard, J. R. (2003). "Intact synaptic GABAergic inhibition and altered neurosteroid modulation of thalamic relay neurons in mice lacking delta subunit." J Neurophysiol **89**(3): 1378-1386.
- Postea, O., Biel, M. (2011). "Exploring HCN channels as novel drug targets." Nat Rev Drug Discov **10**(12): 903-914.
- Rammes, G., Parsons, C., Muller, W., Swandulla, D. (1994). "Modulation of fast excitatory synaptic transmission by cyclothiazide and GYKI 52466 in the rat hippocampus." Neurosci Lett **175**(1-2): 21-24.
- Rammes, G., Starker, L. K., Haseneder, R., Berkmann, J., Plack, A., Zieglgansberger, W., Ohl, F., Kochs, E. F., Blobner, M. (2009). "Isoflurane anaesthesia reversibly improves cognitive function and long-term potentiation (LTP) via an up-regulation in NMDA receptor 2B subunit expression." Neuropharmacology **56**(3): 626-636.
- Randall, A., Tsien, R. W. (1995). "Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons." J Neurosci **15**(4): 2995-3012.
- Ranft, A., Kurz, J., Deuringer, M., Haseneder, R., Dodt, H. U., Zieglgansberger, W., Kochs, E., Eder, M., Hapfelmeier, G. (2004). "Isoflurane modulates glutamatergic and GABAergic neurotransmission in the amygdala." Eur J Neurosci **20**(5): 1276-1280.

- Ren, Y., Zhang, F. J., Xue, Q. S., Zhao, X., Yu, B. W. (2008). "Bilateral inhibition of gamma-aminobutyric acid type A receptor function within the basolateral amygdala blocked propofol-induced amnesia and activity-regulated cytoskeletal protein expression inhibition in the hippocampus." Anesthesiology **109**(5): 775-781.
- Reyle-Hahn, R. (2000). "Xenon--a new anesthetic." anaesthesist: 869-874.
- Ries, C. R., Puil, E. (1999). "Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons." J Neurophysiol **81**(4): 1802-1809.
- Robinson, R. B., Siegelbaum, S. A. (2003). "Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function." Annu Rev Physiol **65**: 453-480.
- Roerig, B., Feller, M. B. (2000). "Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 86-114.
- Rossaint, R., Reyle-Hahn, M., Schulte Am Esch, J., Scholz, J., Scherpereel, P., Vallet, B., Giunta, F., Del Turco, M., Erdmann, W., Tenbrinck, R., Hammerle, A. F., Nagele, P. (2003). "Multicenter randomized comparison of the efficacy and safety of xenon and isoflurane in patients undergoing elective surgery." Anesthesiology **98**(1): 6-13.
- Rothman, S. M., Olney, J. W. (1995). "Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years." Trends Neurosci **18**(2): 57-58.
- Rudolph, U., Antkowiak, B. (2004). "Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics." Nat Rev Neurosci **5**(9): 709-720.
- Rusakov, D. A., Scimemi, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M. (2004). "Comment on "Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity"." Science **305**(5692): 1912; author reply.
- Sakmann, B., Neher, E. (1984). "Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes." Annu Rev Physiol **46**: 455-472.
- Sanders, R. D., Franks, N. P., Maze, M. (2003). "Xenon: no stranger to anaesthesia." Br J Anaesth **91**(5): 709-717.
- Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., Tibbs, G. R. (1998). "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain." Cell **93**(5): 717-729.
- Scatton, B. (1993). "The NMDA receptor complex." Fundam Clin Pharmacol **7**(8): 389-400.
- Scheibel, M. E., Scheibel, A. B. (1966). "The organization of the nucleus reticularis thalami: a Golgi study." Brain Res **1**(1): 43-62.
- Schmidt, M., Marx, T., Kotzerke, J., Luderwald, S., Armbruster, S., Topalidis, P., Schirmer, U., Reinelt, H. (2001). "Cerebral and regional organ perfusion in pigs during xenon anaesthesia." Anaesthesia **56**(12): 1154-1159.

- Schmidt, U., Schwinger, R. H., Bohm, S., Uberfuhr, P., Kreuzer, E., Reichart, B., Meyer, L., Erdmann, E., Bohm, M. (1993). "Evidence for an interaction of halothane with the L-type Ca<sup>2+</sup> channel in human myocardium." Anesthesiology **79**(2): 332-339.
- Schneggenburger, R., Neher, E. (2000). "Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse." Nature **406**(6798): 889-893.
- Schneider, G., Kochs, E. F. (2007). "The search for structures and mechanisms controlling anesthesia-induced unconsciousness." Anesthesiology **107**(2): 195-198.
- Schubert, D., Staiger, J. F., Cho, N., Kotter, R., Zilles, K., Luhmann, H. J. (2001). "Layer-specific intracolumnar and transcolumar functional connectivity of layer V pyramidal cells in rat barrel cortex." J Neurosci **21**(10): 3580-3592.
- Scimemi, A., Fine, A., Kullmann, D. M., Rusakov, D. A. (2004). "NR2B-containing receptors mediate cross talk among hippocampal synapses." J Neurosci **24**(20): 4767-4777.
- Scoville, W. B., Milner, B. (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.
- Seabrook, G. R., Easter, A., Dawson, G. R., Bowery, B. J. (1997). "Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABA<sub>A</sub> receptor benzodiazepine site ligands." Neuropharmacology **36**(6): 823-830.
- Seeburg, P. H. (1993). "The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels." Trends Neurosci **16**(9): 359-365.
- Seifert, R., Eismann, E., Ludwig, J., Baumann, A., Kaupp, U. B. (1999). "Molecular determinants of a Ca<sup>2+</sup>-binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates." EMBO J **18**(1): 119-130.
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., Kaupp, U. B. (1999). "Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9391-9396.
- Semyanov, A. (2008). "Can diffuse extrasynaptic signaling form a guiding template?" Neurochem Int **52**(1-2): 31-33.
- Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., Silver, R. A. (2004). "Tonically active GABA<sub>A</sub> receptors: modulating gain and maintaining the tone." Trends Neurosci **27**(5): 262-269.
- Sherman, S. M. (2005). "Thalamic relays and cortical functioning." Prog Brain Res **149**: 107-126.
- Sieghart, W., Sperk, G. (2002). "Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes." Curr Top Med Chem **2**(8): 795-816.

- Simon, W., Hapfelmeier, G., Kochs, E., Zieglgansberger, W., Rammes, G. (2001). "Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus." Anesthesiology **94**(6): 1058-1065.
- Singh, G., Janicki, P. K., Horn, J. L., Janson, V. E., Franks, J. J. (1995). "Inhibition of plasma membrane Ca(2+)-ATPase pump activity in cultured C6 glioma cells by halothane and xenon." Life Sci **56**(10): PL219-224.
- Sobolevskii, A. I., Khodorov, B. I. (2002). "Blocker studies of the functional architecture of the NMDA receptor channel." Neurosci Behav Physiol **32**(2): 157-171.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1990). "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." Science **249**(4976): 1580-1585.
- Stark, H., Reichert, U., Grassmann, S. (2000). "[Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 2. Therapy concepts and new receptor ligands]." Pharm Unserer Zeit **29**(4): 228-236.
- Steriade, M. (1992). "Basic mechanisms of sleep generation." Neurology **42**(7 Suppl 6): 9-17; discussion 18.
- Steriade, M. (1997). "Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance." Cereb Cortex **7**(6): 583-604.
- Steriade, M. (2001). "The GABAergic reticular nucleus: a preferential target of corticothalamic projections." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3625-3627.
- Steriade, M. (2005). "Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons." Trends Neurosci **28**(6): 317-324.
- Steriade, M., Amzica, F., Nunez, A. (1993). "Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells." J Neurophysiol **70**(4): 1385-1400.
- Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G., Curro Dossi, R. C. (1990). "Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems." J Neurosci **10**(8): 2541-2559.
- Steriade, M., Deschenes, M. (1984). "The thalamus as a neuronal oscillator." Brain Res **320**(1): 1-63.
- Steriade, M., Dossi, R. C., Nunez, A. (1991). "Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression." J Neurosci **11**(10): 3200-3217.

- Stocker, M., Krause, M., Pedarzani, P. (1999). "An apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4662-4667.
- Stuart, G. J., Dodt, H. U., Sakmann, B. (1993). "Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy." Pflugers Arch **423**(5-6): 511-518.
- Suzuki, T., Koyama, H., Sugimoto, M., Uchida, I., Mashimo, T. (2002). "The diverse actions of volatile and gaseous anesthetics on human-cloned 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes." Anesthesiology **96**(3): 699-704.
- Suzuki, T., Ueta, K., Sugimoto, M., Uchida, I., Mashimo, T. (2003). "Nitrous oxide and xenon inhibit the human (alpha 7)5 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus* oocyte." Anesth Analg **96**(2): 443-448, table of contents.
- Takamatsu, I., Sekiguchi, M., Wada, K., Sato, T., Ozaki, M. (2005). "Propofol-mediated impairment of CA1 long-term potentiation in mouse hippocampal slices." Neurosci Lett **389**(3): 129-132.
- Taussig, R., Gilman, A. G. (1995). "Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases." J Biol Chem **270**(1): 1-4.
- Thomas, C. G., Miller, A. J., Westbrook, G. L. (2006). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons." J Neurophysiol **95**(3): 1727-1734.
- Thomson, A. M., Walker, V. E., Flynn, D. M. (1989). "Glycine enhances NMDA-receptor mediated synaptic potentials in neocortical slices." Nature **338**(6214): 422-424.
- Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V. (2007). "Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway." Channels (Austin) **1**(4): 238-245.
- Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V., Mennerick, S., Perez-Reyes, E., Zorumski, C. F. (2001). "Ca(v)3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide." Mol Pharmacol **60**(3): 603-610.
- Todorovic, S. M., Lingle, C. J. (1998). "Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents." J Neurophysiol **79**(1): 240-252.
- Tovar, K. R., Westbrook, G. L. (1999). "The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro." J Neurosci **19**(10): 4180-4188.
- Treiman, D. M. (2001). "GABAergic mechanisms in epilepsy." Epilepsia **42 Suppl 3**: 8-12.
- Tsien, R. Y., Rink, T. J., Poenie, M. (1985). "Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths." Cell Calcium **6**(1-2): 145-157.

- Tung, A., Mendelson, W. B. (2004). "Anesthesia and sleep." Sleep Med Rev **8**(3): 213-225.
- Urban, B. W., Bleckwenn, M. (2002). "Concepts and correlations relevant to general anaesthesia." Br J Anaesth **89**(1): 3-16.
- Vargas, G., Lucero, M. T. (1999). "Dopamine modulates inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in cultured rat olfactory receptor neurons." J Neurophysiol **81**(1): 149-158.
- Velly, L. J., Rey, M. F., Bruder, N. J., Gouvitsos, F. A., Witjas, T., Regis, J. M., Peragut, J. C., Gouin, F. M. (2007). "Differential dynamic of action on cortical and subcortical structures of anesthetic agents during induction of anesthesia." Anesthesiology **107**(2): 202-212.
- Vulliemoz, Y., Verosky, M. (1988). "Halothane interaction with guanine nucleotide binding proteins in mouse heart." Anesthesiology **69**(6): 876-880.
- Vulliemoz, Y., Verosky, M., Triner, L. (1986). "Effect of halothane on myocardial cyclic AMP and cyclic GMP content of mice." J Pharmacol Exp Ther **236**(1): 181-186.
- Wahl-Schott, C., Biel, M. (2009). "HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function." Cell Mol Life Sci **66**(3): 470-494.
- Wainger, B. J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., Tibbs, G. R. (2001). "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." Nature **411**(6839): 805-810.
- Walters, R. J., Hadley, S. H., Morris, K. D., Amin, J. (2000). "Benzodiazepines act on GABA<sub>A</sub> receptors via two distinct and separable mechanisms." Nat Neurosci **3**(12): 1274-1281.
- Wang, X., Yu, G., Hou, X., Zhou, J., Yang, B., Zhang, L. (2010). "Rebound bursts in GABAergic neurons of the thalamic reticular nucleus in postnatal mice." Physiol Res **59**(2): 273-280.
- Wappler, F., Rossaint, R., Baumert, J., Scholz, J., Tonner, P. H., van Aken, H., Berendes, E., Klein, J., Gommers, D., Hammerle, A., Franke, A., Hofmann, T., Schulte Esch, J. (2007). "Multicenter randomized comparison of xenon and isoflurane on left ventricular function in patients undergoing elective surgery." Anesthesiology **106**(3): 463-471.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1992). "Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs." Neuroreport **3**(12): 1138-1140.
- Waxham, M. N., Ed. (1999). Neurotransmitter Receptors. Fundamental Neuroscience. San Diego, Academic Press.
- Weathersby, P. K., Homer, L. D. (1980). "Solubility of inert gases in biological fluids and tissues: a review." Undersea Biomed Res **7**(4): 277-296.



- Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J., II, Niedzielski, A. S. (1996). "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons." J Neurosci **16**(6): 1982-1989.
- White, E. L., Benshalom, G., Hersch, S. M. (1984). "Thalamocortical and other synapses involving nonspiny multipolar cells of mouse Sml cortex." J Comp Neurol **229**(3): 311-320.
- White, I. L., Franks, N. P., Dickinson, R. (2005). "Effects of isoflurane and xenon on Ba<sup>2+</sup>-currents mediated by N-type calcium channels." Br J Anaesth **94**(6): 784-790.
- Wieboldt, R., Gee, K. R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B. K., Hess, G. P. (1994). "Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8752-8756.
- Wu, H., Jin, Y., Buddhala, C., Osterhaus, G., Cohen, E., Jin, H., Wei, J., Davis, K., Obata, K., Wu, J. Y. (2007). "Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles-Evidence from GAD65-knockout mice studies." Brain Res **1154**: 80-83.
- Yamada, J., Furukawa, T., Ueno, S., Yamamoto, S., Fukuda, A. (2007). "Molecular basis for the GABAA receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex." Cereb Cortex **17**(8): 1782-1787.
- Yamakura, T., Harris, R. A. (2000). "Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol." Anesthesiology **93**(4): 1095-1101.
- Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K., Mishina, M. (1995). "Effects of propofol on various AMPA-, kainate- and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in *Xenopus oocytes*." Neurosci Lett **188**(3): 187-190.
- Yao, L. P., Bandres, J., Nemoto, E. M., Boston, J. R., Darby, J. M., Yonas, H. (1992). "Effect of 33% xenon inhalation on whole-brain blood flow and metabolism in awake and fentanyl-anesthetized monkeys." Stroke **23**(1): 69-74.
- Yashiro, K., Philpot, B. D. (2008). "Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity." Neuropharmacology **55**(7): 1081-1094.
- Yeckel, M. F., Berger, T. W. (1990). "Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5832-5836.
- Ying, S. W., Abbas, S. Y., Harrison, N. L., Goldstein, P. A. (2006). "Propofol block of I(h) contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons." Eur J Neurosci **23**(2): 465-480.
- Ying, S. W., Goldstein, P. A. (2005). "Propofol-block of SK channels in reticular thalamic neurons enhances GABAergic inhibition in relay neurons." J Neurophysiol **93**(4): 1935-1948.

- Zhang, L., Oz, M., Stewart, R. R., Peoples, R. W., Weight, F. F. (1997). "Volatile general anaesthetic actions on recombinant nACh alpha 7, 5-HT3 and chimeric nACh alpha 7-5-HT3 receptors expressed in *Xenopus* oocytes." Br J Pharmacol **120**(3): 353-355.
- Zhang, P., Ohara, A., Mashimo, T., Imanaka, H., Uchiyama, A., Yoshiya, I. (1995). "Pulmonary resistance in dogs: a comparison of xenon with nitrous oxide." Can J Anaesth **42**(6): 547-553.
- Zukin, R. S., Bennett, M. V. (1995). "Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit." Trends Neurosci **18**(7): 306-313.

## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AC	Adenylatzyklasen
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
4-AP	4-Aminopyridin
ARAS	aufsteigende retikuläres Aktivierungssystem
Ba <sup>2+</sup>	Bariumionen
BAPTA	<i>1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
CGP35348	p-(3-Aminopropyl)-P-diethoxymethylphosphinsäure
CNBD	Bindestelle für zyklische Nukleotide
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CM	Spezifische Membrankapazität
CNBD	Bindestelle für zyklische Nukleotide
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
FBS	Fötales Rinderserum
AP5	D(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
eEPSC	elektrisch evozierter Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EGTA	<i>ethylene glycol bis (<math>\beta</math>-amino ethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GluR	Glutamatrezeptor
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotid regulated ion channel</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2ethansulfonsäure
I <sub>h</sub>	Hyperpolarisations-aktivierter Strom, Schrittmacherstrom
I <sub>KIR</sub>	einwärts-gleichrichtender K <sup>+</sup> -Strom ( <i>inwardly rectifying</i> )

$I_{K_{SO}}$	anhaltender Auswärtsstrom, <i>standing outward</i>
$I_L$	L-Typ Kalziumstrom
$I_T$	T-Typ Kalziumstrom
I/V	Strom-Spannungsbeziehung
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (inhibitory postsynaptic current)
IR	Infrarot
$K^+$	Kaliumionen
$K_2P$	Zwei-Poren Domänen $K^+$ -Kanäle
$Na^+$	Natriumionen
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzof]quinoxaline-7-sulfonamid
NMDA	N-methyl-D-aspartat
$O_2$	Sauerstoff
pC	photolytisch evozierter Strom
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PSC	Postsynaptischer Strom
$R_M$	Spezifischer Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
RTN	Reticularis thalami nucleus
$R_s$	Serienwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
TASK	<i>TRIK-related acid sensitive <math>K^+</math>-channel</i>
TC	thalamocortical, thalamokortikal
TEA-CL	Tetraethyl-Ammoniumchlorid
TTX	Tetrodotoxin
$V_{1/2}$	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
VB	Nkl. Ventrobasalis thalami
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Verwendete Substanzen

### A.2.1 Elektrophysiologie

ACSF (artificial cerebrospinal fluid): pH = 7,35 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl <sub>2</sub>	2	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	1	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich

ACSF – Präparationsmedium: pH = 7,35 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl <sub>2</sub>	0,5	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	6	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich

ACSF – Messung von I<sub>TASK</sub> und I<sub>h</sub>: pH = 7,35 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
CaCl <sub>2</sub>	2	Sigma Aldrich
Dextrose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgSO <sub>4</sub>	2	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
HEPES	30	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich

ACSF – Messung von T- und L-Typ- Kalziumkanalströmen: pH = 7,35 (unter Sättigung mit Carbogen):

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
BaCl <sub>2</sub>	2	Sigma Aldrich
Glucose	25	Sigma Aldrich
KCl	2,5	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	1	Sigma Aldrich
NaCl	125	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich

ACSF – Messung von  $I_h$  in mHCN2 HEK Zellen: pH = 7,35 (unter Sättigung mit Carbogen)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
NaCl	110	Sigma Aldrich
KCl	5	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	0,3	Sigma Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	1,8	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich

Kalzium-Imaging (lösen des Farbstoffes Fluo-4-AM)

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
NaCl	125	Sigma Aldrich
KCl	3	Sigma Aldrich
HEPES	25	Sigma Aldrich
MgSO <sub>4</sub>	2	Sigma Aldrich
CaCl	2	Sigma Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	Sigma Aldrich
Glucose	10	Sigma Aldrich

### Intrazellulärlösung:

Messung der synaptischen Transmission:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
BAPTA	3	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
K-Gluconat	115	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	5	Sigma Aldrich
Mg-ATP	2	Sigma Aldrich
Lidocain-Na-N-ethylchlorid	5	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,3 (mit NaOH eingestellt)

Messung von  $I_{TASK^+}$ ,  $-I_h$  und  $I_{SO}$  Strömen:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
K-Gluconat	95	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
K <sub>3</sub> -citrat	20	Sigma Aldrich
NaCl <sub>2</sub>	10	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	1	Sigma Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	0,5	Sigma Aldrich
BAPTA	3	Sigma Aldrich
Mg <sub>2</sub> ATP	3	Sigma Aldrich
Na GTP	0,5	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,3 (mit NaOH eingestellt)

Charakterisierung von TC- und RTN Neuronen:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
K-Gluconat	130	Sigma Aldrich
NaCl	5	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	2	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
EGTA	0,5	Sigma Aldrich
K <sub>2</sub> -ATP	2	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> -GTP	0,3	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,25 (mit KOH eingestellt)

Messung I<sub>T</sub> / I<sub>L</sub>:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration (mM)</u>	<u>Hersteller</u>
Cesium methanesulfonate	10	Sigma Aldrich
K <sub>3</sub> -citrat	20	Sigma Aldrich
NaCl	10	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	1	Sigma Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	0,5	Sigma Aldrich
HEPES	10	Sigma Aldrich
BAPTA	3	Sigma Aldrich
Mg-ATP	3	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> -GTP	0,5	Sigma Aldrich

pH ≈ 7,25 (mit KOH eingestellt)

### A.2.2 Zellkultur

DMEM:

500 ml Dulbecco`s modified Eagle Medium, DMEM mit NaHCO<sub>3</sub> und stabilem Glutamin (Biochrom, Berlin , Deutschland)  
+ 50 ml fetales Kälberserum (Gibco, Eggenstein, Deutschland)  
+ 50 ml Penicillin / Streptavidin (Biochrom, Berlin , Deutschland)  
+ 2 ml G418 Geneticin, (Biochrom, Berlin , Deutschland)

Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich):

0,1 mg Poly-L-Lysin/ml H<sub>2</sub>O  
D-PBS (Gibco, Eggenstein, Deutschland)  
FKS(Gibco, Eggenstein, Deutschland)  
Trypsin 5% (Gibco, Eggenstein, Deutschland)

### A.2.4 ELISA

cAMP Complete ELISA kit (Enzo Life Sciences, Lorrach, Deutschland)

Weitere Chemikalien:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
4-AP	50 µM	Tocris/Biozol
ω –Agatoxin IVA	100 nM	Sigma Aldrich
Bariumchlorid	150 µM	Sigma Aldrich
Bicuculin methiodid	20 µM	Sigma Aldrich
Cadmiumchlorid	100 µM	Sigma Aldrich
cAMP	30 µM	Sigma Aldrich
CGP 35348	200 µM	Ciba Geigy
CNB-caged-	100 µM	Sigma Aldrich
ω-Conotoxin GVIA	1 µM	Sigma Aldrich
D-AP5	50 µM	Sigma Aldrich
Fluo-4-AM	500 µM	Invitrogen
Nifedipin	5 µM	Sigma Aldrich
Neurobiotin	5 mg/ml	Tocris/Biozol
Nickelchlorid	50 µM	Sigma Aldrich
NBQX	5 µM	Sigma Aldrich
Ro 25-6981	1 µM	Roche
SQ55236	100µM	Sigma Aldrich
Tetrodotoxin	1 µM	Ascent scientific
TEA-chlorid		Sigma Aldrich
Ro 25-6981	1 µM	Roche
Xenon	1,9 mM	Linde GmbH
ZD 7288	100 µM	Tocris/Biozol



## Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und bei ihrem Gelingen beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. E. Kochs für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Anästhesiologie durchführen zu können.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Schemann, für die unkomplizierte Form der externen Betreuung und die Begutachtung der Arbeit..

Herrn Prof. Dr. G. Rammes für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragende fachliche Betreuung meiner experimentellen Arbeit, sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Rainer Haseneder und Herrn Stephan Kratzer für die ausgezeichnete Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, für eine sehr geduldige und engagierte Betreuung, ihr persönliches Engagement, die fortwährende Diskussionsbereitschaft sowie für die geduldige Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Herrn Dr. M. Eder, dass ich die Räumlichkeiten der AG Eder im Max-Planck-Institut für Psychiatrie nutzen konnte, sowie für den anregenden wissenschaftlichen Gedankenaustausch.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Eder für das angenehme Umfeld, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Besonders erwähnt sei hier Daniela, Sascha, Charis, Julien, Kerstin, Florian, Jens, Evi, Hedi, Babara H., Babara D. und Christine.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich einfach immer haben machen lassen.

## Verzeichnis eigener Publikationen

Originalarbeiten:

### **Xenon Attenuates Excitatory Synaptic Transmission in the Rodent Prefrontal Cortex and Spinal Cord Dorsal Horn**

Rainer Haseneder, M.D., Stephan Kratzer, M.S., Eberhard Kochs, M.D., Corinna Mattusch, R.A., Matthias Eder, Ph.D., Gerhard Rammes, Ph.D.  
Anesthesiology. 2009 Dec; 111(6):1297-307

### **Xenon attenuates hippocampal long-term potentiation by diminishing synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor currents**

Corinna Mattusch, M.Sc.\*, Stephan Kratzer, M.D.\*, Eberhard Kochs, M.D., Matthias Eder, Ph.D., Rainer Haseneder, M.D., Gerhard Rammes, Ph.D.  
Akzeptiert zur Veröffentlichung 07.12.2011:  
Publikation Anesthesiology, V 116 No 3: März 2012  
\* geteilte Erstautorenschaft

Abstracts / Kongressbeiträge

### **Xenon Blocks Hippocampal Long-Term Potentiation and NMDA Receptors in Acute Brain Slices of Mice**

Rainer Haseneder, M.D., Corinna Mattusch, Eberhard Kochs, M.D., Matthias Eder, Ph.D., Gerhard Rammes, Ph.D.  
Anesthesiology 2009; Jahrestagung der "American Society of Anesthesiologist": A567

### **Xenon Reduces NMDA and AMPA Mediated Synaptic Transmission in the Mouse Thalamus**

Stephan Kratzer, M.D., Corinna Mattusch, Rainer Haseneder, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Gerhard Rammes, M.D.  
Anesthesiology 2009; Jahrestagung der "American Society of Anesthesiologist": A1623

### **Xenon hat keinen Einfluss auf die inhibitorische synaptische Transmission thalamokortikaler Neurone**

Corinna Mattusch, Stephan Kratzer, M.D.; Rainer Haseneder, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Matthias Eder, Gerhard Rammes, M.D.  
Deutscher Anästhesie Kongress 2011

### **Xenon reduces calcium influx during high frequency stimulation and attenuates hippocampal long-term potentiation (LTP)**

Corinna Mattusch, Stephan Kratzer, M.D.; Rainer Haseneder, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Gerhard Rammes, M.D.  
Eur J Anaesthesiol 2011;26(suppl 45): 7AP4-2

### **Xenon reduces currents through synaptic and extrasynaptic NMDA receptors with the same potency**

Stephan Kratzer, M.D., Corinna Mattusch, Rainer Haseneder, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Gerhard Rammes, M.D.  
Eur J Anaesthesiol 2011;26(suppl 45): 7AP4-3

### **Xenon does not influence inhibitory synaptic transmission**

Rainer Haseneder, M.D., Corinna Mattusch, Stephan Kratzer, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Matthias Eder, Ph.D., Gerhard Rammes, Ph.D.  
Eur J Anaesthesiol 2011;26(suppl 45): 7AP4-4

### **Xenon blockiert die synaptische Langzeitpotenzierung im Hippocampus: Hinweise auf eine Reduktion des Kalziumeinstroms durch Blockade von NMDA-Rezeptoren**

Rainer Haseneder, M.D., Corinna Mattusch, Stephan Kratzer, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Matthias Eder, Ph.D., Gerhard Rammes, Ph.D.  
Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI 2011.

**The Xenon Mediated Depression of Excitatory Synaptic Transmission to Thalamocortical Neurons is Independent of Background Ion Channels**

Corinna Mattusch, M.Sc., Stephan Kratzer, M.D., Rainer Haseneder, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Gerhard Rammes, Ph.D.

Anesthesiology 2011; Jahrestagung der "American Society of Anesthesiologist": A311

**Xenon Reduces Excitability in Thalamocortical Neurons due to an Antagonism Against Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide Gated (HCN) Channels**

Stephan Kratzer, M.D., Corinna Mattusch, Student, Rainer Haseneder, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Gerhard Rammes, Ph.D.

Anesthesiology 2011; Jahrestagung der "American Society of Anesthesiologist": A303

**Xenon Reduces Calcium Influx through NMDA Receptors During Induction of Long-term Potentiation but Does not Affect L-Type Calcium Channel Currents**

Rainer Haseneder, M.D., Corinna Mattusch, Ph.D., Stephan Kratzer, M.D., Eberhard Kochs, M.D., Gerhard Rammes, Ph.D.

Anesthesiology 2011; Jahrestagung der "American Society of Anesthesiologist": A316