

Wie verstärken Lachgas, Xenon und Isofluran die GABA_A-
Rezeptor-vermittelte zentrale Hemmung?
Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik

Rainer Haseneder

Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

Wie verstärken Lachgas, Xenon und Isofluran die GABA_A-
Rezeptor-vermittelte zentrale Hemmung?
Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik

Rainer Haseneder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 18.12.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen vorveröffentlicht:

Hapfelmeier G., Zieglgänsberger W., Haseneder R., Schneck H., Kochs E.: Nitrous oxide and xenon increase the efficacy of GABA at recombinant mammalian GABA_A receptors.

Anesth Analg 2000; 91:1542-9

Hapfelmeier G., Haseneder R., Kochs E., Beyerle M., Zieglgänsberger W.: Co-administered nitrous oxide enhances the effect of isoflurane on GABAergic transmission by an increase in open-channel block.

J Pharmacol Exp Ther 2001; 298:201-8

Hapfelmeier G., Haseneder R., Eder M., Adelsberger H., Kochs E., Rammes G., Zieglgänsberger W.: Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block.

Neurosci Lett 2001; 307:97-100

Haseneder R., Rammes G., Zieglgänsberger W., Kochs E., Hapfelmeier G.: GABA_A receptor activation and open-channel block by the anaesthetic isoflurane: a new principle of receptor modulation.

Eur J Pharmacol 2002; 451:43-50

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Neurophysiologische Grundlagen	3
2.1.1. Informationsübertragung im Nervensystem	3
2.1.2. Einteilung von Ionenkanälen	4
2.1.3. Verschaltung erregender und hemmender ligandengesteuerter Ionenkanäle am Beispiel des Hippocampus	5
2.1.4. Funktionsprinzip ligandengesteuerter Ionenkanäle	7
2.2. Das GABAerge Neurotransmittersystem	8
2.2.1. GABA als Neurotransmitter	9
2.2.2. GABA-Rezeptoren	11
2.2.2.1. Einteilung	11
2.2.2.2. GABA _A -Rezeptor	11
2.2.2.3. GABA _B -Rezeptor	13
2.2.2.4. GABA _C -Rezeptor	14
2.2.3. Agonisten und Antagonisten des GABA _A -Rezeptors	14
2.2.4. Anästhetika-Wirkung am GABA _A -Rezeptor	15
2.2.4.1. Benzodiazepine	15
2.2.4.2. Barbiturate	15
2.2.4.3. Propofol	16
2.2.4.4. Etomidate	16
2.2.4.5. Ketamin	16
2.2.4.6. Steroidanästhetika	16
2.2.4.7. Volatile Anästhetika	16
2.2.4.8. Zusammenfassender Überblick	17
2.3. Die untersuchten Inhalationsanästhetika	19
2.3.1. Der MAC-Wert	19
2.3.2. N ₂ O	19
2.3.2.1. Physikochemische Eigenschaften	19
2.3.2.2. Wirkung am GABAergen Neurotransmittersystem	20
2.3.2.3. Wirkung an erregenden Neurotransmittersystemen	20
2.3.3. Xenon	20
2.3.3.1. Physikochemische Eigenschaften	20
2.3.3.2. Wirkung am GABAergen Neurotransmittersystem	21
2.3.3.3. Wirkung an erregenden Rezeptorsystemen	21
2.3.4. Isofluran	21
2.3.4.1. Physikochemische Eigenschaften	21
2.3.4.2. Wirkung am GABAergen Neurotransmittersystem	21
2.3.4.3. Wirkung an erregenden Rezeptorsystemen	22
2.3.5. Zusammenfassender Überblick	23
2.4. Die Patch-Clamp-Technik	24
2.4.1. Messprinzip	24
2.4.2. Patch-Clamp-Konfigurationen	25
2.4.3. Transmitterapplikation	26
2.4.4. Heterologe Expression von Ionenkanälen	28
3. Fragestellung	29
4. Methodik	30
4.1. Zellkultur	30
4.2. Transfektion	30
4.3. Patch-Clamp-Technik	31
4.3.1. Vorbereitung der Zellen	31
4.3.2. Herstellung der Messelektroden	31
4.3.3. Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration	31

4.3.4. Die schnelle Agonistenapplikation	33
4.3.5. Verwendete Lösungen	35
4.3.5.1. Extrazellulärlösung	35
4.3.5.2. Intrazellulärlösung	35
4.3.5.3. GABA-Lösung	35
4.3.5.4. Herstellung der gasgesättigten Lösungen	35
4.3.5.5. Isofluran-Lösung	36
4.3.5.6. Herstellung der N ₂ O-gesättigten Isofluran-Lösungen	36
4.3.5.7. Herstellung der Picrotoxin- und Bicucullin-Lösungen	36
4.3.6. Aufnahmesystem und Auswertung der Daten	36
4.3.6.1. Stromaufzeichnung	36
4.3.6.2. Messgrößen	37
4.3.6.3. Statistische Auswertung	39
4.4. Computersimulationen der GABA_A-Rezeptor-Kinetik	39
5. Ergebnisse	40
5.1. Charakterisierung des exprimierten GABA_A-Rezeptors	40
5.1.1. GABA-Dosiswirkungskurve	40
5.1.2. Hemmung durch Bicucullin und Picrotoxin	41
5.2. Der Effekt gasförmiger Anästhetika auf GABA-induzierte Stromantworten	43
5.2.1. Die Löslichkeit von N ₂ O und Xenon in Extrazellulärlösung	43
5.2.2. Verstärkung GABA-induzierter Ströme durch die Immobilizer N ₂ O und Xenon	45
5.2.3. Kein Effekt durch den Non-Immobilizer Helium	47
5.3. Der Effekt von Isofluran auf die Funktion des GABA_A-Rezeptors	48
5.3.1. Isofluran hat zwei gegensätzliche Wirkungen	48
5.3.2. Der verstärkende Effekt von Isofluran	49
5.3.3. Isofluran bewirkt zusätzlich einen Offenkanalblock	50
5.3.4. Modell für GABA _A -vermittelte IPSC und der Effekt von Isofluran	53
5.3.5. Computersimulation der Isofluran-Wirkungen	55
5.4. Der Effekt von gemeinsam appliziertem N₂O und Isofluran auf GABA-induzierte Ströme	58
5.4.1. Applikation von GABA, N ₂ O und Isofluran	58
5.4.2. Computersimulationen	61
6. Diskussion	64
6.1. N₂O und Xe verstärken die Assoziation von GABA und GABA_A-Rezeptor	64
6.2. Isofluran verzögert die Dissoziation von GABA und blockiert gleichzeitig den offenen GABA-Kanal	66
6.3. N₂O verstärkt die Kanal-blockierende Wirkung von Isofluran am GABA_A-Rezeptor	69
7. Zusammenfassung	70
8. Literaturverzeichnis	73
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	91
10. Anhang	92
10.1. Materialien und Geräte	92
10.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungen	92
10.1.2. Zellkultur	94
10.1.3. Verbrauchsmittel	94
10.1.4. Geräte	94
10.2. Danksagung	95
10.3. Verzeichnis eigener Publikationen	96
10.4. Lebenslauf	98

Abkürzungsverzeichnis:

5-HT	Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin)
A	Agonist
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
B	Blockierter Zustand des Rezeptors
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC _x	Effektive Konzentration (effective concentration); x \triangleq Prozent des maximalen Effektes
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (excitatory postsynaptic current)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential (excitatory postsynaptic potential)
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid)
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonal kidney)
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom (inhibitory postsynaptic current)
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential (inhibitory postsynaptic potential)
ISO	Isofluran
K _{on}	Assoziationskonstante
K _{off}	Dissoziationskonstante
MAC	Minimale alveolare Konzentration (Definition siehe 2.3.1, S. 19)
MG	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MW	Mittelwert
n	Anzahl der gewerteten Experimente
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N ₂ O	Lachgas (Stickoxidul)
O	Offener Zustand des Rezeptors
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PSC	Postsynaptischer Strom (postsynaptic current)
R	Geschlossener Zustand des Rezeptors (resting state)
RA	Geschlossener Zustand des Rezeptors mit gebundenem Agonisten
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
VOCCs	Spannungsabhängige Calcium-Kanäle (voltage-operated calcium channels)
Xe	Xenon
ZNS	Zentrales Nervensystem

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

1. Einleitung

Unter Allgemeinanästhesie im engeren Sinne ist ein medikamentös hervorgerufener Zustand aus Bewusstseinsverlust (Hypnose), Analgesie bzw. Antinozizeption und vegetativer Abschirmung zu verstehen. Da die höheren Hirnfunktionen, wie z. B. das Bewusstsein, im Rahmen eines Gleichgewichts zwischen exzitatorischen (erregenden) und inhibitorischen (hemmenden) Prozessen reguliert werden, kann der Zustand der Anästhesie vereinfacht entweder als Erhöhung der neuronalen Inhibition, als Verminderung der neuronalen Exzitation oder als Kombination von beidem angesehen werden (Tanelian, 1993).

Obwohl Anästhesie bereits seit über 150 Jahren angewendet wird (erste Narkose 1846 von William Morton), sind die molekularen Mechanismen der Anästhesie bis heute immer noch nicht vollständig geklärt (Tanelian, 1993). Die strukturelle Vielfalt Anästhesie erzeugender Substanzen, von einfachen Molekülen wie Xenon, N₂O, Chloroform und Diethyl-Äther bis zu komplexeren Molekülen wie Barbitursäure, Propofol oder Ketamin, spricht gegen einen gemeinsamen Rezeptormechanismus, wie er für andere Substanzen (z. B. für Lokalanästhetika) bekannt ist (Ueda, 2001). Der Nachweis von Meyer und Overton darüber, dass die anästhetische Potenz einer Substanz mit steigender Lipophilie zunimmt (Meyer, 1899; Overton, 1901), führte zu der Hypothese, dass Anästhetika ihre Wirkung an unpolaren Arealen in Nervenzellmembranen entfalten. Diese unpolaren Areale können prinzipiell aus Lipiden oder Proteinen bestehen (Carlson, 1997). Nach der Beschreibung der Zellmembranstruktur (Singer, 1972) beherrschte zunächst lange Zeit die sog. unspezifische Lipidtheorie die Annahmen über die Mechanismen der Anästhesie. Gemäß der Lipidtheorie löst sich das lipophile Anästhetikum in der Nervenzellmembran und verändert so deren physikochemische Eigenschaften, wodurch im weiteren die Funktion transmembranärer Proteinstrukturen moduliert wird (Trudell, 1977). Die Erkenntnisse der letzten 25 Jahre sprechen jedoch dafür, dass nicht dieser Lipidanteil, sondern die transmembranären Proteine selbst den primären Angriffsort der Anästhetika darstellen (Proteintheorie; Franks, 1982). Insbesondere die für die zentrale Exzitation und Inhibition maßgeblichen Neurotransmittersysteme wurden als entscheidend für die Vermittlung der Anästhesiewirkung erkannt (Krogsgaard-Larsen, 1996).

In den letzten Jahrzehnten konnten verschiedene ligandengesteuerte Rezeptor-Ionenkanal-Komplexe (z. B. Glutamat-Rezeptoren, nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren, GABA-Rezeptoren) als Angriffsorte von Anästhetika ermittelt werden. Dabei kommt dem

GABAergen System als wichtigstem inhibitorischen Neurotransmittersystem eine besondere Bedeutung zu. Eine Verstärkung der GABAergen Inhibition gilt als ein wichtiger von mehreren möglichen Mechanismen für die Wirkung von Anästhetika auf neuronal-zellulärer Ebene (Franks, 1994).

Anästhetika können die GABAerge Inhibition prinzipiell auf verschiedene Weise verstärken: Präsynaptisch (Steigerung der synaptischen Ausschüttung von GABA), synaptisch (Verminderung des GABA-Reuptakes und/oder Verminderung des enzymatischen Abbaus) sowie postsynaptisch (direkte agonistische Wirkung am GABA-Rezeptor, Verstärkung der Bindung von GABA an den Rezeptor sowie direkte Modulation des Cl-Kanals; Tanelian, 1993).

Im Hinblick auf die postsynaptischen Mechanismen soll in der vorliegenden Arbeit detailliert untersucht werden, wie die gasförmigen Anästhetika N₂O und Xe sowie das volatile Anästhetikum Isofluran die inhibitorische GABAerge Transmission verstärken. Als Modell für die GABAerge synaptische Transmission dienen GABA-induzierte Stromantworten von HEK 293-Zellen, die einen rekombinanten $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor der Ratte exprimieren. Dabei beschränkt sich diese Arbeit nicht nur auf die experimentelle Erfassung der Anästhetika-Wirkung auf GABA_A-Rezeptor-vermittelte Stromantworten. Die hier verwendete zeitlich hochauflösende Technik erlaubt darüberhinaus eine mechanistische Beschreibung der Anästhetika-Wirkung am GABA_A-Rezeptor anhand eines kinetischen Modells.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Neurophysiologische Grundlagen

2.1.1. Informationsübertragung im Nervensystem

Wesentlich für die Aufrechterhaltung der komplexen, integrativen Leistungen des menschlichen ZNS ist das funktionierende Zusammenspiel exzitatorischer und inhibitorischer Prozesse innerhalb neuronaler Netzwerke mit sowohl divergenten als auch konvergenten Verschaltungen. Divergenz bedeutet, dass ein Neuron Information auf viele andere verteilt, Konvergenz bedeutet, dass ein Neuron Information von vielen anderen erhält. Hierbei hat die Informationsübertragung eine elektrochemische Basis. Die Informationsleitung innerhalb eines Neurons erfolgt durch Aktionspotentiale, welche auf Potentialveränderungen der Nervenzellmembran beruhen. Die Übertragung der Aktionspotentiale von Neuron zu Neuron geschieht entweder durch elektrische oder, weit häufiger, durch chemische Synapsen. Chemische Synapsen benutzen einen Botenstoff (Neurotransmitter), der indirekt und unidirektional die Signalübermittlung übernimmt: Erreicht ein Aktionspotential das präsynaptische Ende eines Neurons, wird der Neurotransmitter freigesetzt und diffundiert über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran. Vermittelt durch – für den sezernierten Neurotransmitter spezifische – Rezeptor-Ionenkanal-Komplexe ändert sich die Permeabilität der postsynaptischen Membran für bestimmte Ionen und damit das Membranpotential. (Zusammengefasst nach Klinke, 1996; Greger, 1996; Petrides, 1997c.)

Man unterscheidet exzitatorische (erregende) und inhibitorische (hemmende) Neurotransmittersysteme. Die Bindung eines exzitatorischen Transmitters (z. B. Glutamat) an seinen spezifischen Rezeptor bewirkt an der postsynaptischen Membran ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP), d. h. eine Depolarisierung der Zellmembran. Dies wirkt erregend, da bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes des Membranpotentials in depolarisierender Richtung ein Aktionspotential ausgelöst wird. Bindet ein inhibitorischer Transmitter (z. B. GABA) an seinen spezifischen Rezeptor, so entsteht ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP), d. h. eine Hyperpolarisation, die der Entstehung eines Aktionspotentials entgegenwirkt. (Zusammengefasst nach Klinke, 1996.)

2.1.2. Einteilung von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung und Änderungen des Membranpotentials von Neuronen.

Grundsätzlich unterscheidet man spannungsabhängige (z. B. Natriumkanäle) und ligandengesteuerte Ionenkanäle. Während spannungsabhängige Ionenkanäle überwiegend das Ruhemembranpotential aufrechterhalten und das Aktionspotential bilden, vermitteln ligandengesteuerte Ionenkanäle die synaptische Signalübertragung, indem sie den Anionen- bzw. Kationenfluss durch die Zellmembran regulieren. Ligandengesteuerte Ionenkanäle lassen sich einerseits nach Ionenselektivität in kationenspezifische (exzitatorische) Rezeptoren, wie z. B. Glutamat-, 5-HT₃- sowie Acetylcholin-Rezeptoren und anionenspezifische (inhibitorische) Rezeptoren, wie z. B. Glycin- und GABA_A-Rezeptoren einteilen. Andererseits unterscheidet man ionotrope und metabotrope ligandengesteuerte Ionenkanäle. Bei ionotropen Rezeptoren, z. B. bei GABA_A-Rezeptoren, besteht Rezeptor und Ionenkanal aus demselben Protein. Nach Bindung des Neurotransmitters erfolgt hier die Kanalöffnung direkt über eine Änderung des Isomerisierungszustandes des Kanalproteins, d. h. ohne zwischengeschaltete Signalkaskaden. Bei metabotropen Rezeptoren (z. B. GABA_B-Rezeptoren, Katecholamin-Rezeptoren, bestimmten 5-HT-Rezeptoren) erfolgt nach Transmitterbindung die Öffnung des Ionenkanals indirekt über eine intrazelluläre G-Protein-gekoppelte Signalkaskade. Der eigentliche Rezeptor und der Ionenkanal sind demnach zwei unterschiedliche Proteinstrukturen. (Zusammengefasst nach Klinke, 1996; Petrides, 1997c.)

Im Gegensatz zu spannungsabhängigen Ionenkanälen, z. B. den spannungsabhängigen Calcium-Kanälen (VOCC), welche gegenüber Anästhetika in klinisch relevanten Konzentrationen insgesamt weniger sensitiv sind, weisen bestimmte ligandengesteuerte Ionenkanäle hingegen eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Anästhetika auf (Franks, 1993).

2.1.3. Verschaltung erregender und hemmender ligandengesteuerter Ionenkanäle am Beispiel des Hippocampus

Wegen seiner übersichtlichen und deshalb gut untersuchten Neuroanatomie stellt der Hippocampus ein prädestiniertes Hirnareal zur Untersuchung von Organisation und Funktion neuronaler Verschaltungen dar (Maccaferri, 2000). Als mutmaßlich wichtiger Zielort anästhetisch wirksamer Substanzen ist die Hippocampusregion zudem ein geeignetes Modell zur Untersuchung der zellulären Wirkmechanismen von Anästhetika (Kendig, 1991).

Physiologisch stellt der Hippocampus einen Zwischenspeicher zum Langzeitgedächtnis dar: Er speichert und verarbeitet Informationen über einige Wochen und Monate und überführt sie dann zum dauerhaften Abspeichern in die entsprechenden Areale der Großhirnrinde (Kandel, 1992). Als zelluläres Korrelat für Funktionen wie Lernen und Gedächtnis, die wichtigsten Leistungen des Hippocampus, gilt die besonders in der CA1-Region gut untersuchte synaptische Plastizität (Bliss, 1993). Man versteht darunter eine Modulierbarkeit der synaptischen Übertragung (synaptische Effizienz), die über glutamaterge, aber auch GABAerge Mechanismen gesteuert wird (Bliss, 1993).

Abb. 2.1 zeigt schematisch die Verschaltung des glutamatergen (erregenden) Transmittersystems mit dem GABAergen (hemmenden) Transmittersystem am Beispiel der CA1-Region des Ratten-Hippocampus. Die hyperpolarisierende, inhibitorische Komponente des postsynaptischen Potentials wird dabei über zwischengeschaltete GABAerge Interneurone vermittelt.

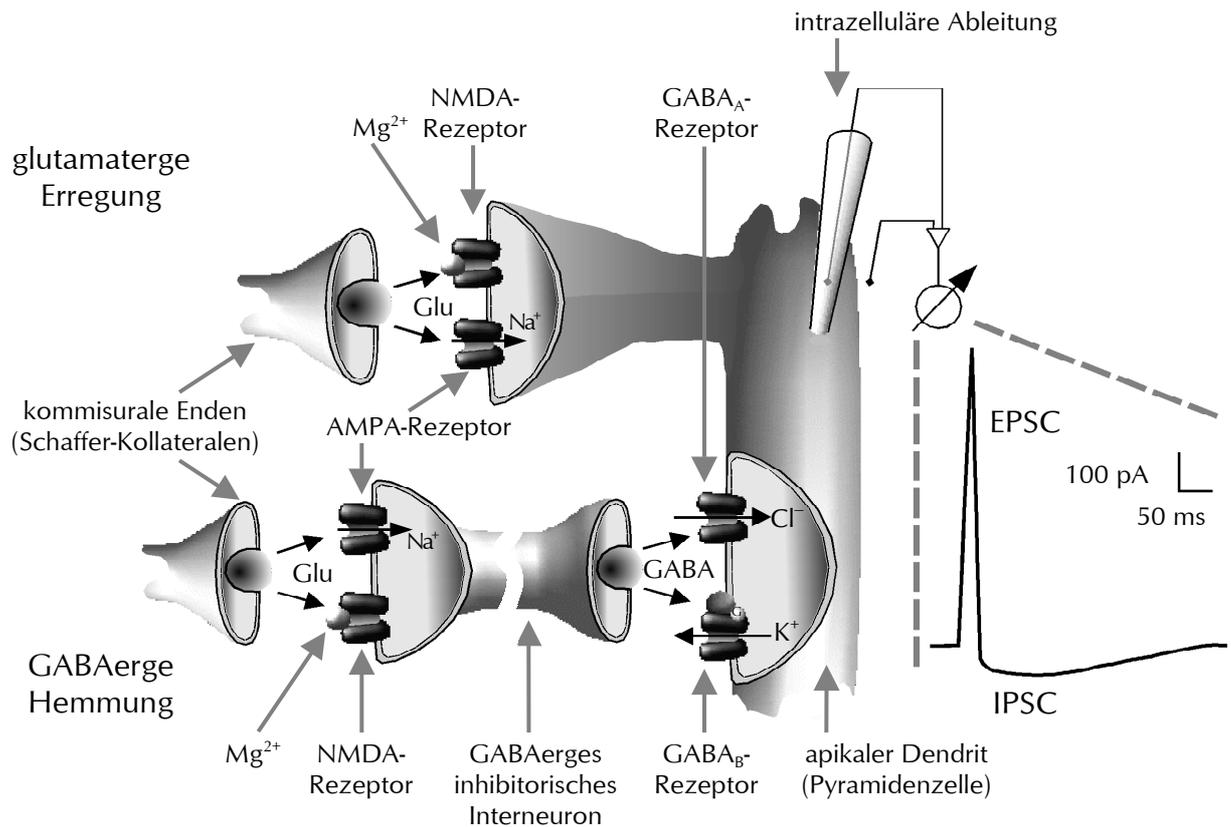


Abb. 2.1: In der CA1-Region des Hippocampus durchgeführte intrazelluläre Ableitung postsynaptischer Ströme zeigt nach Stimulierung der Schaffer-Kollateralen Stromantworten, die aus einer exzitatorischen (EPSC) und einer inhibitorischen (IPSC) Komponente bestehen. Die exzitatorische Komponente kommt dabei vor allem durch Wirkung des Transmitters L-Glutamat auf ionotrope, glutamaterge Rezeptoren vom nicht-NMDA-Typ (sog. AMPA-Rezeptoren¹), die einen Na⁺-Einstrom vermitteln, zustande. Der nicht-kompetitive und spannungsabhängige Mg²⁺-Block der NMDA-Rezeptoren löst sich bei Depolarisation der postsynaptischen Membran durch Aktivierung von AMPA-Rezeptoren. Wegen ihrer relativ langsamen Aktivierungskinetik tragen die NMDA-Rezeptoren jedoch wenig zur postsynaptischen Antwort bei. Der inhibitorische Anteil der Stromantwort wird von der Wirkung des Transmitters GABA bewirkt. Die schnelle Komponente in Form eines Cl⁻-Einstromes wird hierbei durch die ionotropen GABA_A-Rezeptoren vermittelt, gefolgt von einem durch G-Protein-gekoppelte GABA_B-Rezeptoren vermittelten K⁺-Ausstrom. (Abb. modifiziert nach Bliss, 1993.)

¹ Die Familie der ionotropen Glutamaterezeptoren umfasst zwei Untergruppen, die NMDA-Rezeptoren (selektiver Agonist: N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)) und die nicht-NMDA-Rezeptoren (Kullmann, 2000). Letztere untergliedern sich in AMPA-Rezeptoren (selektiver Agonist: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA)) und Kainatrezeptoren (Dingledine, 1999). Durch AMPA-Rezeptoren hervorgerufene Leitfähigkeitsänderungen der postsynaptischen Membran liegen im Bereich weniger Millisekunden, ihnen wird daher die schnelle Komponente des postsynaptischen Stromes zugeschrieben (Dingledine, 1999).

2.1.4. Funktionsprinzip ligandengesteuerter Ionenkanäle

Nach der „*Three-State-Kinetic-Theory*“ (del Castillo, 1957) gehen Rezeptor-Ionenkanal-Komplexe ausgehend vom geschlossen-ungebundenen Zustand (R) nach Bindung eines Agonisten (A) über den Zustand (RA) in einen offenen Zustand (O) über, wobei nur der offene Zustand für die jeweiligen kanalspezifischen Ionen passierbar ist. Der Übergang von Zustand R nach RA kann entsprechend als „*binding*“ bezeichnet werden. Die darauffolgende Isomerisierung zum Zustand O (Kanalöffnung) nennt man „*gating*“. Abb. 2.2 zeigt das einfachst mögliche Reaktionsschema.

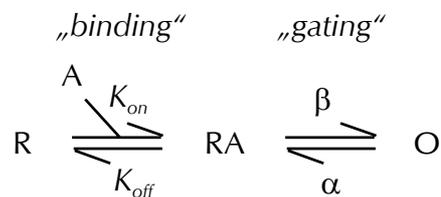


Abb. 2.2: Einfachstes kinetisches Modell zur Funktionsweise eines Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes. Der Zustand R geht unter Bindung des Agonisten A in einen geschlossen-gebundenen Zustand (RA) über, der dann in den Offen-zustand O übergehen kann. Diese bidirektionalen Reaktionen werden von den Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten (K_{on} bzw. K_{off}) und von den „gating“-Raten α bzw. β bestimmt.

Je nach Agonist und Ionenkanal können auch mehrere Bindungsschritte zur Öffnung des Ionenkanals notwendig sein (Colquhoun, 1981). Die Anzahl der Bindungsschritte lässt sich anhand des Hill-Koeffizienten für die Dosiswirkungsbeziehung zwischen Agonist und der induzierten Stromantwort abschätzen. Abhängig von der Art des Kanals, des Agonisten, dessen Konzentration und Interaktion mit anderen Substanzen muss ein solches Reaktionsschema um zusätzlich mögliche Zustände (z. B. blockiert, desensibilisiert) erweitert werden. Darüber hinaus sind auch unterschiedliche Offen-zustände (Dauer, Gesamtleitfähigkeit) denkbar (Colquhoun, 1981).

Durch Interaktion zwischen Ionenkanal (z. B. GABA_A-Rezeptor) und einer Substanz (z. B. eines Anästhetikums) können bestimmte Schritte in einem solchen Reaktionsschema beeinflusst werden (z. B. Erhöhung der Agonistenbindung) und/oder zusätzliche Zustände entstehen (z. B. kompetitiver oder nichtkompetitiver Block, Kanalaktivierung).

2.2. Das GABAerge Neurotransmittersystem

γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde 1950 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt (Roberts, 1950; Awapara, 1950). Schon bald wurde postuliert, GABA könne die Grundlage der zentralen Inhibition darstellen (Hayashi, 1956). Den Status eines inhibitorischen Neurotransmitters erhielt die Substanz jedoch erst Mitte der 60er Jahre (Kravitz, 1963; Otsuka, 1966; Krnjevic, 1967). Heute ist unumstritten, dass GABA im menschlichen Gehirn den vorherrschenden inhibitorischen Neurotransmitter darstellt und somit hauptverantwortlich für die schnelle inhibitorische synaptische Transmission ist (Möhler, 1996a).

Etwa ein Drittel aller Synapsen im Säugetierhirn ist GABAerg (Bloom, 1971). Die meisten GABAergen Neurone sind inhibitorische Interneurone, d. h. Neurone mit kurzem Axon und lokaler Verschaltung (Goodchild, 1993). Beispielsweise in der CA1-Region des Hippocampus haben diese Interneurone nur einen Anteil von < 10% an der Gesamtzahl der Neurone (Olbrich, 1985), wegen ihrer divergenten Verschaltung besitzen sie jedoch einen großen inhibitorischen Einfluss (Freund, 1996). Die Aktivierung von GABA-Rezeptoren ist somit von entscheidender Bedeutung für die zentrale Inhibition (Möhler, 1996b). Das GABAerge Neurotransmittersystem spielt eine Rolle bei der Entstehung von Schlaf und medikamentös induzierter Hypnose sowie allgemein bei der Limitierung neuronaler Exzitation. Bei bestimmten Epilepsieformen, bei Angststörungen, sowie Lern- und Gedächtnisdefiziten können Störungen des GABA-Systems vorliegen (Goodchild, 1993).

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über den Neurotransmitter GABA, die GABA-Rezeptoren (insbesondere den GABA_A-Rezeptor), sowie die pharmakologische Beeinflussbarkeit des GABAergen Neurotransmittersystems.

2.2.1. GABA als Neurotransmitter

γ -Aminobuttersäure (GABA, MG 103,1; Strukturformel: Abb. 2.3) entsteht in einer pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion durch Decarboxylierung aus Glutamat. Diese Reaktion wird im Nerven- und Gliagewebe durch das Enzym Glutamatdecarboxylase I, in anderen Geweben durch das Enzym Glutamatdecarboxylase II katalysiert (Petrides, 1997c).

GABA findet sich im gesamten ZNS, die Konzentration ist jedoch von Region zu Region unterschiedlich: Die höchsten Konzentrationen finden sich in den Basalganglien, im Hippocampus, im Kleinhirn und im Hypothalamus, sowie in den Rückenmarks-Hinterhörnern (Goodchild, 1993).

Die Freisetzung von GABA aus der präsynaptischen Terminale erfolgt durch Exozytose, die über einen Aktionspotential-getriggerten Ca^{2+} -Influx durch VOCC ausgelöst wird (Klinke, 1996). Im synaptischen Spalt diffundiert GABA zur postsynaptischen Membran und öffnet dort u. a. GABA_A -Rezeptor-Kanäle (Klinke, 1996). Die Wirkung von GABA im synaptischen Spalt wird zum einen durch enzymatischen Abbau, zum anderen durch Reabsorbtion beendet (Petrides, 1997c). Dieser Na^+ -Gradient-abhängige Transport erfolgt durch membranständige Proteinkomplexe (= Neurotransmitter-Transporter) auf Nerven- und Gliazellen (Masson, 1999).

Abb. 2.4 zeigt schematisch Freisetzung, Wirkung und Wiederaufnahme des Transmitters GABA an der GABAergen Synapse.

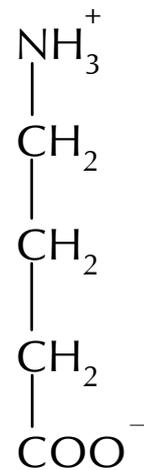


Abb. 2.3: Strukturformel des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA).

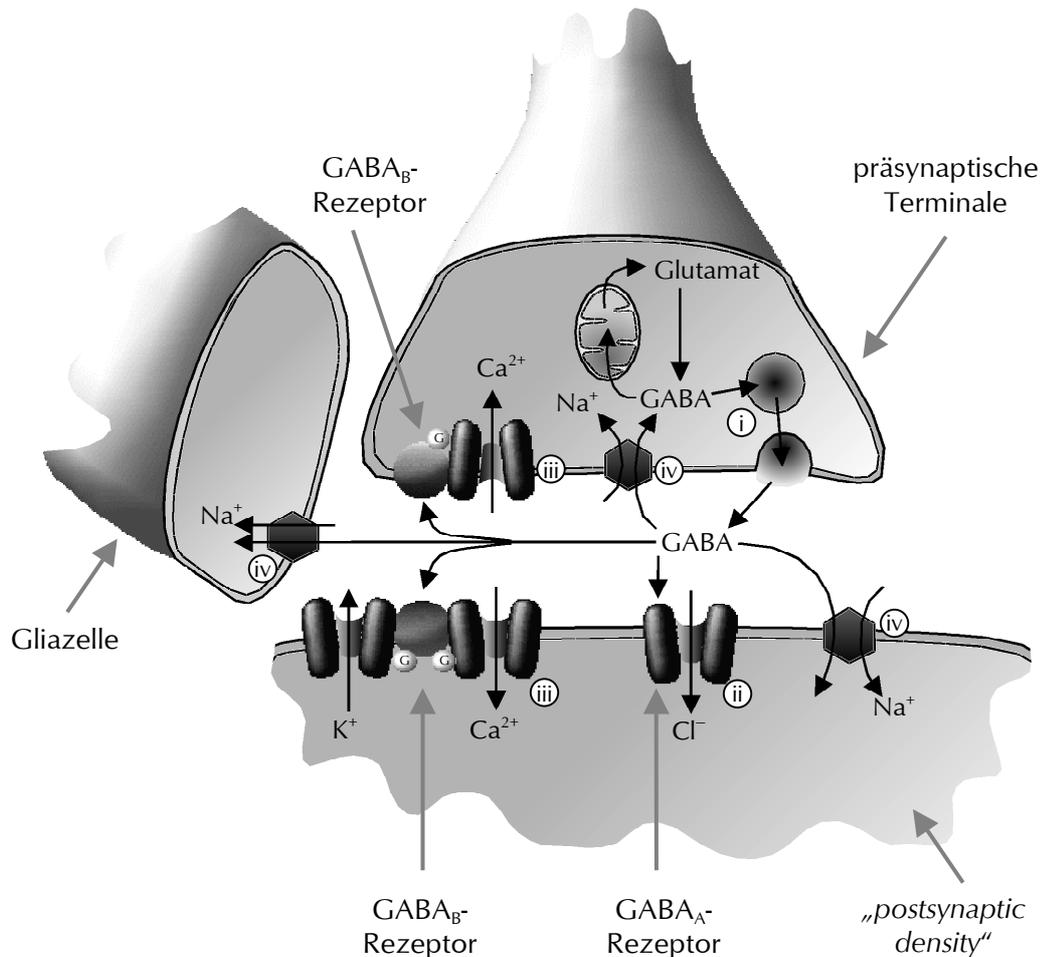


Abb. 2.4: Freisetzung, Wirkung und Wiederaufnahme von GABA an der GABAergen Synapse: Aus Glutamat synthetisiertes und aus dem synaptischen Spalt wiederaufgenommenes GABA wird in Vesikeln gespeichert (i). In den synaptischen Spalt freigesetztes GABA aktiviert postsynaptische GABA_A-Rezeptoren (ii) sowie prä- und postsynaptische GABA_B-Rezeptoren (iii). Letztere inhibieren Ca²⁺-Kanäle und aktivieren K⁺-Kanäle über G-Protein-gekoppelte Mechanismen. Die Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren hemmt die Freisetzung von GABA aus der präsynaptischen Nervenendigung. Vor allem in höheren Hirnregionen ist die bedeutendste postsynaptische Wirkung die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren mit daraus resultierendem erhöhtem Cl⁻-Einstrom in die postsynaptische Zelle. Beendet wird die Wirkung von GABA u. a. durch Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt über Na⁺-gekoppelten, aktiven Transport (iv). (Abb. modifiziert nach Tanelian, 1993.)

Die Bildung eines kurzen (ein bis wenige Millisekunden; Clements, 1996) GABA-Gradienten im synaptischen Spalt löst über allosterische Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren einen Cl⁻-Einstrom aus (Olsen, 1990). Diese GABA_A-Rezeptor-vermittelte schnelle Komponente des IPSC bewirkt eine kurzzeitige Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran in Form eines IPSP (Sakmann, 1983). Die Länge eines IPSC

bestimmt die Dauer der Hyperpolarisation, die der Auslösung eines Aktionspotentials am postsynaptischen Neuron entgegenwirkt (Jones, 1995). Eine Verlängerung von GABA-ergen IPSC ist demnach ein entscheidender Mechanismus für die zentral-hemmende Wirkung von Benzodiazepinen und Anästhetika (Tanelian, 1993). Die Dauer des durch den kurzen synaptischen GABA-Gradienten ausgelösten IPSC wird wiederum hauptsächlich durch die wesentlich langsamere Inaktivierungs-Kinetik der GABA_A-Rezeptor-Kanäle terminiert und viel weniger durch die Dauer des GABA-Gradienten (Jones, 1995).

2.2.2. GABA-Rezeptoren

2.2.2.1. Einteilung

Nach der Klassifikation der GABA-Rezeptoren von Hill und Bowery 1981 (Hill, 1981) werden Bicucullin-sensitive und Baclofen-insensitive GABA-Rezeptoren als GABA_A-Rezeptoren, Bicucullin-insensitive und Baclofen-sensitive als GABA_B-Rezeptoren bezeichnet. Das Molekulargewicht des GABA_A-Rezeptor-Komplexes beträgt etwa 300 kDa, das des GABA_B-Rezeptors etwa 80 kDa (Kuriyama, 1993).

2.2.2.2. GABA_A-Rezeptor

GABA_A-Rezeptoren gehören, wie 5HT₃-, Glycin- und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren, zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (Schofield, 1987).

Der GABA_A-Rezeptor setzt sich aus fünf transmembranären Untereinheiten zusammen, wobei bis heute 19 verschiedene (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , ρ_{1-3}) identifiziert wurden (Barnard, 1998). Von den vielen möglichen Untereinheitenkombinationen kommen in der Natur allerdings nur relativ wenige vor (Hirouchi, 1994). Die im menschlichen ZNS am häufigsten anzutreffende Stöchiometrie eines Rezeptors ist $2\alpha_1 2\beta_2 1\gamma_2$ (Chang, 1996). Abb. 2.5 zeigt schematisch den Aufbau des GABA_A-Rezeptors.

Die Bindungsstelle des Agonisten GABA besteht aus Teilen der α - und Teilen der β -Untereinheit (Amin, 1993). Benzodiazepine haben eine definierte Bindungsstelle an der α -Untereinheit (Pritchett, 1989; siehe Abb. 2.5), während die genauen Bindungsstellen für z. B. Barbiturate und neuroaktive Steroide noch nicht bekannt sind (Möhler, 1996a).

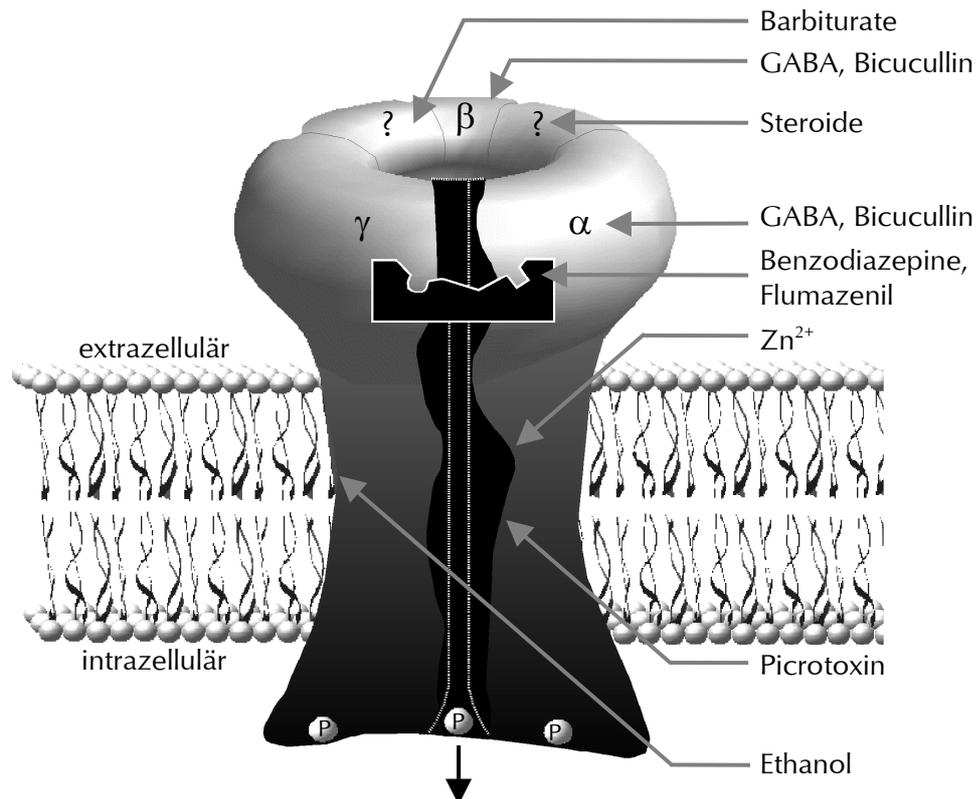


Abb. 2.5: Der $GABA_A$ -Rezeptor besteht aus fünf Glykoprotein-Untereinheiten. Zusammengelagert bilden sie eine zentrale Pore, die sich bei Aktivierung des Kanals lochblendenartig spezifisch für Cl^- -Ionen öffnet. Für GABA und andere Rezeptormodulatoren wurde, sofern bekannt, die jeweilige Bindungsstelle zugeordnet. (P: Phosphorylierungsstelle; Abb. modifiziert nach Upton, 1996.)

Abb. 2.6 zeigt schematisch den Aufbau einer aus ca. 450 bis 550 Aminosäuren bestehenden $GABA_A$ -Rezeptor-Untereinheit. Der extrazelluläre N-Terminus des Glykoproteins besitzt Glykosilierungsstellen und eine Cystinbrücke. Der C-Terminus liegt ebenfalls extrazellulär (Petrides, 1997a). Zwischen den Domänen 3 und 4 liegt intrazellulär eine Polypeptid-Schleife, an der sich bei den meisten Untereinheiten ein phosphorylierbarer Serylrest befindet (Petrides, 1997a). Von den α -helikalen Transmembran-Domänen (TM) 1-4 ist die Domäne 2 an der Bildung der Ionenkanalpore beteiligt (Macdonald, 1994), wo eine Häufung positiver Aminosäurereste die selektive Durchlässigkeit für die negativ geladenen Cl^- -Ionen erzeugt (Barnard, 1987). Dieser Bereich bildet zusammen mit den anderen TM2 eine Engstelle innerhalb der Ionenkanalpore, das sog. „gate“ (Seeburg, 1990).

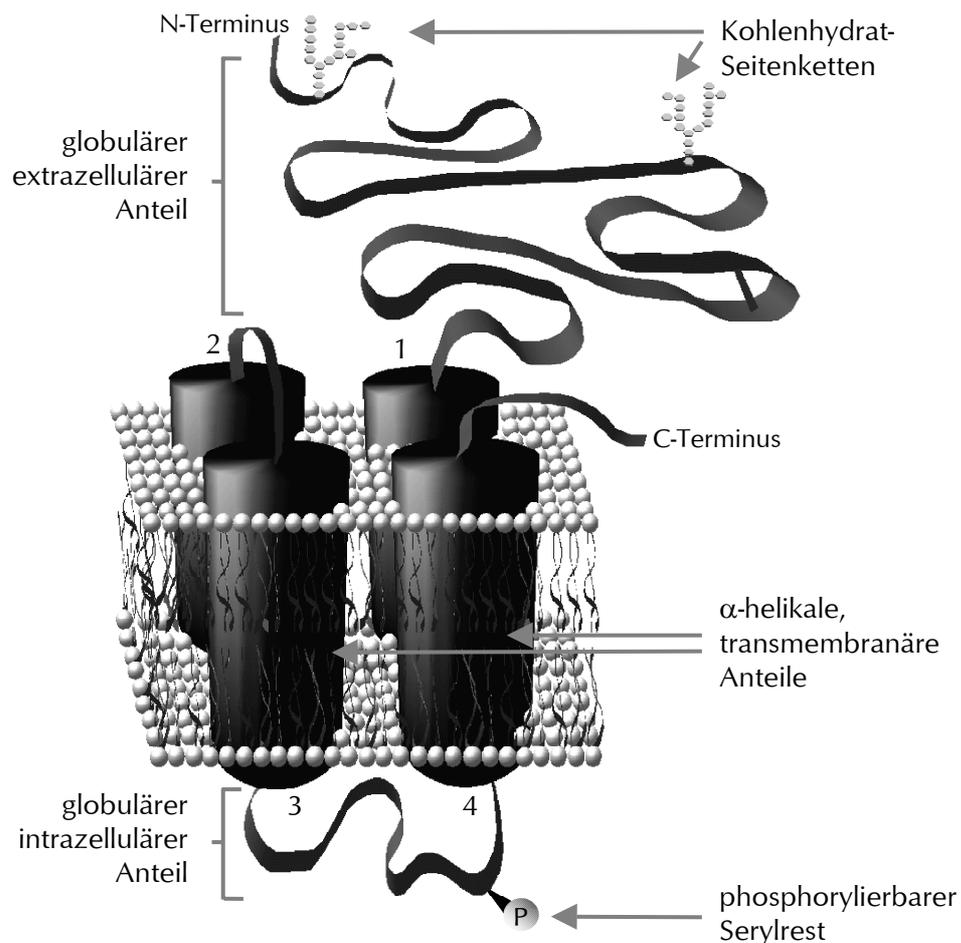


Abb. 2.6: Jede Untereinheit des GABA_A-Rezeptors besteht aus vier hydrophoben transmembranären α-Helices, sowie extra- und intrazellulär liegend je einem globulären Anteil. Durch G-Protein-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors können auch andere Transmitter, wie z. B. Dopamin, Adenosin und Histamin die Funktion des GABA-Rezeptors modulieren. (Feigenspan, 1994). (Abb. modifiziert nach Petrides, 1997a.)

2.2.2.3. GABA_B-Rezeptor

Im Gegensatz zum ionotropen GABA_A-Rezeptor ist der metabotrope GABA_B-Rezeptor G-Protein-gekoppelt (Bowery, 1989). Der GABA_B-Rezeptor ist ein Protein mit sieben transmembranären Untereinheiten (Kaupmann, 1997). Die Aktivierung des GABA_B-Rezeptors führt über Erhöhung der K⁺-Leitfähigkeit und Verringerung der Ca²⁺-Leitfähigkeit zu einer Hyperpolarisation der neuronalen Membran (Kuriyama, 2000). Damit bilden postsynaptische GABA_B-Rezeptoren die langsame Komponente der GABAergen IPSP (Möhler, 2001). Durch Verstärkung dieser GABA_B-Rezeptor-vermittelten Mechanismen wirkt Baclofen als Myotonolytikum (Bowery, 1996). Während eine Interaktion von

Anästhetika mit dem GABA_B-Rezeptor lange Zeit verneint wurde (Bowery, 1993), wird in neueren Arbeiten z. B. eine Aktivierung prä- und postsynaptischer GABA_B-Rezeptoren durch Sevofluran beschrieben (Hirota, 1997).

2.2.2.4. GABA_C-Rezeptor

Eine Gruppe „atypischer“ ionotroper GABA-Rezeptoren (Bicucullin-insensitiv, Baclofen-insensitiv) wird als GABA_C-Rezeptoren bezeichnet (Drew, 1984). Tatsächlich handelt es sich hierbei aber um einen ρ -Untereinheiten enthaltenden GABA_A-Rezeptor, die Klassifikation „GABA_C-Rezeptor“ wird daher nicht mehr befürwortet (Barnard, 1998).

Diese Rezeptoren wurden v. a. aus retinalem Gewebe kloniert (Johnston, 1996). Sie sind insensitiv gegenüber Barbituraten (Shimada, 1992), Benzodiazepinen (Shimada, 1992) und neuroaktiven Steroiden (Mihic, 1996). Für volatile Anästhetika (Mihic, 1996) und N₂O (Yamakura, 2000) hingegen wurde ein inhibierender Effekt auf den GABA_C-Rezeptor beschrieben.

2.2.3. Agonisten und Antagonisten des GABA_A-Rezeptors

Bei agonistisch wirksamen Substanzen muss zwischen direkter Kanal-Aktivierung (z. B. durch GABA, Muscimol, Barbiturate) und einer Verstärkung der GABA-Wirkung (z. B. durch Benzodiazepine) unterschieden werden. Tab. 2.1 zeigt eine Auswahl der wichtigsten Modulatoren des GABA_A-Rezeptors.

	GABA-Bindungsstelle	Benzodiazepin-Bindungsstelle	Barbiturat-Bindungsstelle	Kanallumen
agonistisch	GABA, Muscimol	Benzodiazepine (Diazepam, Flunitrazepam u. v. a.)	Pentobarbital, Phenobarbital, (-)MPPB ²	
antagonistisch	Bicucullin	Flumazenil (= Ro 15-1788)	(+)MPPB ²	Picrotoxin, Zn ²⁺

Tab. 2.1: Auswahl der wichtigsten Agonisten und Antagonisten am GABA_A-Rezeptor, zugeordnet zur jeweiligen Bindungsstelle (zusammengefasst nach Upton, 1996). Agonisten und Antagonisten am GABA_A-Rezeptor spielten, ganz abgesehen von z. T. erheblicher klinischer Relevanz, vor Einführung molekulargenetischer Methoden eine wichtige Rolle zur Unterscheidung und Klassifizierung verschiedener GABA-Rezeptor-Typen (Hill, 1981).

² (-)/(+)MPPB = (-)/(+)1-Methyl-5-phenyl-5-propylbarbitursäure

Neben den in Tab. 2.1 zusammengefassten Liganden wurden für zahlreiche weitere Substanzen, insbesondere Anästhetika, modulatorische Effekte am GABA_A-Rezeptor nachgewiesen (siehe Abb. 2.5, S. 12, sowie 2.2.4).

2.2.4. Anästhetika-Wirkung am GABA_A-Rezeptor

Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des GABA_A-Rezeptors durch Anästhetika stellt einen wesentlichen Teil der neuronalen Mechanismen der Anästhesie dar (Tanelian, 1993). Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über anästhetisch wirksame Substanzen und deren Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen N₂O, Xe und ISO werden bezüglich ihrer bisher bekannten Effekte an Rezeptor-Ionenkanal-Komplexen im Abschnitt 2.3, S. 19 behandelt.

2.2.4.1. Benzodiazepine

Der „Benzodiazepin-Rezeptor“ ist eigentlich die Benzodiazepin-Bindungsstelle innerhalb des GABA_A-Rezeptor-Komplexes (Upton, 1996). Benzodiazepine aktivieren den GABA-Kanal nicht direkt, sie verstärken die Aktivität des GABA_A-Rezeptors vielmehr durch eine Erhöhung der GABA-Affinität (Olsen, 1991). Nach der „*Three-State-Kinetic-Theory*“ (del Castillo, 1957) bedeutet dies ein erhöhtes „*binding*“ von GABA, was sich auf Einzelkanalebene entsprechend in einer erhöhten Kanal-Öffnungsfrequenz bei unveränderter mittlerer Öffnungsdauer (Study, 1981) zeigt. Dies steht auch im Einklang mit einer vergrößerten Amplitude und einem verlängerten Zeitverlauf von GABAergen IPSC unter dem Einfluss von Benzodiazepinen (Segal, 1984).

2.2.4.2. Barbiturate

Barbiturate zeigen verschiedene Effekte am GABA_A-Rezeptor. Wie Benzodiazepine erhöhen sie die GABA-Affinität (Parker, 1986), verstärken dadurch GABA-induzierte Cl⁻-Stromantworten (Holland, 1990) und verlängern GABA-vermittelte IPSC (Holland, 1990). Im Unterschied zu Benzodiazepinen zeigte sich auf Einzelkanalebene jedoch eine Verlängerung der mittleren Öffnungsdauer der Einzelkanalereignisse bei gleichbleibender Öffnungsfrequenz (Segal, 1984). Nach der „*Three-State-Kinetic-Theory*“ (del Castillo, 1957) bedeutet dies eine Verstärkung der GABA-Wirkung durch erleichtertes „*gating*“ des GABA-Kanals. Zusätzlich aktivieren Barbiturate den GABA_A-Rezeptor direkt und induzieren so einen GABA-unabhängigen Cl⁻-Strom (Robertson, 1989).

2.2.4.3. Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) bewirkt in klinisch relevanten Konzentrationen an Hirnschnitten von Ratten eine verstärkte GABAerge Hemmung (Hales, 1991). Propofol besitzt am GABA_A-Rezeptor eine Bindungsstelle, die sich von der Benzodiazepin-Bindungsstelle unterscheidet (Peduto, 1991). Wie Barbiturate bewirkt Propofol eine direkte Aktivierung des GABA_A-Rezeptors (Sanna, 1995), eine Erhöhung GABA-induzierter Stromantworten (Sanna, 1995) und eine Verlängerung GABAerger IPSC (Orser, 1994). Wie Benzodiazepine erhöht Propofol die Einzelkanal-Öffnungsfrequenz bei gleichbleibender mittlerer Öffnungsdauer (Orser, 1994).

2.2.4.4. Etomidate

Etomidate zeigt am GABA_A-Rezeptor einen direkt aktivierenden Effekt (Robertson, 1989), eine Verstärkung GABA-induzierter Ströme durch Erhöhung der GABA-Bindung, eine Verlängerung GABAerger IPSC sowie eine erhöhte Einzelkanal-Offenwahrscheinlichkeit (Yang, 1996).

2.2.4.5. Ketamin

Der hauptsächlich beschriebene Wirkmechanismus von Ketamin besteht in einer Hemmung der NMDA-Rezeptor-Aktivität (Franks, 1994). Darüberhinaus beschreiben einige Arbeiten auch eine Erhöhung der GABA_A-Rezeptor-Aktivität (Little, 1984) und eine Verlängerung GABAerger IPSC (Gage, 1985).

2.2.4.6. Steroidanästhetika

Auch das anästhetisch wirksame Steroid Alphaxalone (3-Alpha-hydroxy-5-alpha-pregnane-11,20-dion) bewirkt eine Verstärkung GABA-induzierter Stromantworten, (in höheren Konzentrationen) eine direkte Aktivierung von Cl⁻-Strömen (Barker, 1987) und eine Verlängerung von GABAergen IPSC (Harrison, 1987).

2.2.4.7. Volatile Anästhetika

Eine Verstärkung der GABA_A-Rezeptor-Aktivität ist auch für volatile Anästhetika seit längerem bekannt (Moody, 1988). Patch-Clamp-Untersuchungen an Ganglionneuronen der Rückenmarks-Hinterwurzel von Ratten zeigten, dass sich eine durch niedrige GABA-Konzentrationen ausgelöste Stromantwort durch klinisch relevante Konzentrationen (2-facher MAC-Wert, Definition siehe 2.3.1, S. 19) von Halothan, ISO und Enfluran um etwa

das Dreifache erhöhen ließ (Nakahiro, 1989). Auch bei in *Xenopus* Oozyten³ heterolog exprimierten GABA_A-Rezeptoren zeigte sich dieser Effekt. Allerdings wurden die Stromantworten auf höhere GABA-Konzentrationen nicht verstärkt, durch Enfluran sogar vermindert (Lin, 1992). Ebenso verringerten Enfluran und Halothan die Amplitude von GABA_A-Rezeptor-vermittelten IPSC an Neuronen von Hippocampuschnitten der Ratte, verlängerten jedoch deren Zeitverlauf, wodurch insgesamt der GABAerge transmembranäre Ladungsfluss anstieg (Banks, 1999).

2.2.4.8. Zusammenfassender Überblick

Die Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte hinsichtlich der Wirkung von Anästhetika auf das GABA_A-Rezeptor-System werden im Allgemeinen mit dem Begriff „Verstärkung“ subsummiert. Zahlreiche elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, worauf diese Verstärkung im Einzelnen beruht. Hierbei können unterschiedliche Messparameter betrachtet werden. Untersuchungen von Einzelkanalströmen, GABAergen Summenströmen und GABAerger synaptischer Übertragung an Hirnschnittpräparaten weisen zwar überwiegend in die Richtung einer „Verstärkung“ durch Anästhetika, die zahlreichen Reviews zu diesem Thema liefern jedoch keine klare Übersicht über die verschiedenen Anästhetika hinsichtlich ihrer Wirkungen auf die unterschiedlichen Messparameter. Ferner ist auch zu berücksichtigen, um welches Untersuchungsmaterial es sich handelt, da es durchaus Unterschiede z. B. zwischen endogenen und rekombinant-transfizierten Rezeptoren sowie zwischen verschiedenen Spezies gibt. Die folgende Tab. 2.2 soll in Teilen ein differenzierteres Bild über die bisher aus elektrophysiologischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse über einige Anästhetika widerspiegeln.

³ *Xenopus laevis* = südafrikanischer Krallenfrosch

	Direkte Aktivierung des GABA _A -Rezeptors	Affinität von GABA zum Rezeptor	Stromantwort	IPSC	Einzelkanal-Aktivität	
			Amplitude	Amplitude	Öffnungsfrequenz	mittlere Offenzeit
			Dauer	Dauer	Burstfrequenz	Burstlänge
Benzodiazepine	∅ (Study, 1981 ^{rm,nat} ; Polc, 1988 ^{rr,nat})	↑ (Skerritt, 1982 ^{ko,nat} ; Twyman, 1989 ^{rm,nat} ; u.a.)	↑ (Segal, 1984 ^{rm,nat} ; Rogers, 1994 ^{rm,nat} ; u.a.)	↑ (Segal, 1984 ^{rm,nat})	↑ (Study, 1981 ^{rm,nat} ; Rogers, 1994 ^{rm,nat} ; u.a.)	• (Study, 1981 ^{rm,nat} ; Rogers, 1994 ^{rm,nat})
			↑ (Krampfl, 1998 ^{he,t122})	↑ (Segal, 1984 ^{rm,nat})	↑ (Twyman, 1989 ^{rm,nat} ; u.a.)	• (Vicini, 1987 ^{ko,nat})
Barbiturate	+ (Parker, 1986 ^{xe,tdiv} ; Robertson, 1989 ^{gk,nat} ; u.a.)	↑ (Parker, 1986 ^{xe,tdiv})	↑ (Macdonald, 1989 ^{rm,nat} ; Holland, 1990 ^{hr,nat} ; u.a.)	• (Segal, 1984 ^{rm,nat} ; De Koninck, 1994 ^{hr,nat}) ↓ (Gage, 1985 ^{hr,nat,hak})	• (Segal, 1984 ^{rm,nat} ; Macdonald, 1989 ^{rm,nat})	↑ (Segal, 1984 ^{rm,nat} ; Macdonald, 1989 ^{rm,nat} ; u.a.)
			↑ (Zimmerman, 1994 ^{hr,nat})	↑ (Holland, 1990 ^{hr,nat} ; Segal, 1984 ^{rm,nat} ; u.a.)	• (Twyman, 1989 ^{rm,nat})	↑ (Twyman, 1989 ^{rm,nat})
Propofol	+ (Sanna, 1995 ^{xe,tdiv,hak} ; Krasowski, 1997 ^{mf,tdiv} ; u.a.)	↑ (Lambert, 1996)	↑ (Sanna, 1995 ^{xe,tdiv} ; Krasowski, 1997 ^{mf,tdiv} ; u.a.)	• (Orser, 1994 ^{hm,nat})	↑ (Hales, 1991 ^{ch,nat} ; Orser, 1994 ^{hm,nat})	• (Orser, 1994 ^{hm,nat})
			↑ (Bai, 1999 ^{rm,nat})	↑ (Orser, 1994 ^{hm,nat})		
Eto-midate	+ (Robertson, 1989 ^{gk,nat} ; Yang, 1996 ^{hr,nat,hak})	↑ (Tomlin, 1998 ^{mf,t122})	↑ (Yang, 1996 ^{hr,nat} ; Tomlin, 1998 ^{mf,t122})	↑ (Yang, 1996 ^{hr,nat} ; Proctor, 1986 ^{hr,nat})	↑ (Yang, 1996 ^{hr,nat})	↑ (Yang, 1996 ^{hr,nat})
			↑ (Yang, 1996 ^{hr,nat})	↑ (Yang, 1996 ^{hr,nat} ; Proctor, 1986 ^{hr,nat})	-	-
Ketamin	∅ (Lin, 1992 ^{xe,tdiv})		• (Anis, 1983 ^{rr,nat} ; Flood, 2000 ^{he,xe,t122s,nak}) ↑ (Little, 1984 ^{cs,nat} ; Lin, 1993 ^{xe,tdiv})		-	-
			• (Flood, 2000 ^{he,xe,t122s,nak})	↑ (Scholfield, 1980 ^{olm,nat} ; Gage, 1985 ^{hr,nat})	-	-
Steroidanästhetika	+ (Barker, 1987 ^{rr,nat} ; Lambert, 1990 ^{ch,nat} ; u.a.)	↑ (Im, 1990 ^{ko,nat})	↑ (Barker, 1987 ^{rr,nat} ; Lambert, 1990 ^{ch,nat} ; u.a.)	• (Harrison, 1987 ^{hr,nat})		↑ (Barker, 1987 ^{rr,nat} ; Twyman, 1992 ^{rm,nat})
			↑ (Barker, 1987 ^{rr,nat})	↑ (Scholfield, 1980 ^{olm,nat} ; Harrison, 1987 ^{hr,nat})		↑ (Mistry, 1990 ^{rm,nat} ; Lambert, 1990 ^{ch,nat})
volatile Anästhetika	+ (Yang, 1992 ^{hr,nat,ha,en} ; Kira, 1998 ^{hr,nat,sev} ; Haseneder, 2002 ^{he,t122,sev} ;))	↑ (Wakamori, 1991 ^{ts,nat,ha,en} ; Hapfelmeier, 2001 ^{he,t122,sev,nak} ; u.a.)	↑ (Lin, 1992 ^{xe,ha,en,nak} ; Jones, 1992 ^{hr,nat,ha,en} ; Hapfelmeier, 2001 ^{he,t122,sev,nak} ; u.a.) ↓ Lin, 1992 ^{xe,ha,en,hak} ; Hapfelmeier, 2001 ^{he,t122,sev,hak} ; u.a.)	↓ (Jones, 1993 ^{hr,nat,ha,en} ; Banks, 1999 ^{hr,nat,ha,en} ; u.a.) • (Pearce, 1996 ^{hr,nat,ha} ; u.a.)	↑ (Yeh, 1991 ^{rr,nat,ha,en})	↑ (Yeh, 1991 ^{rr,nat,ha,en})
			↑ (Jones, 1992 ^{hr,nat,ha,en}) ↓ (Nakahiro, 1989 ^{rr,nat,ha,en})	↑ (Jones, 1993 ^{hr,nat,ha,en} ; Pearce, 1996 ^{hr,nat,ha} ; Banks, 1999 ^{hr,nat,ha,en} ; u.a.)		↑ (Yeh, 1991 ^{rr,nat,ha,en})
<u>Untersuchungsmaterial:</u> ^{he} HEK293 Zellen ^{xe} Xenopus Oozyten ^{mf} Mäusefibroblasten ^{ko} Kortexneuronen der Ratte ^{hr} Hippocampusneuronen der Ratte ^{hm} Hippocampusneuronen der Maus ^{rm} Rückenmarksneurone der Maus ^{rr} Rückenmarksneurone der Ratte ^{olm} Neuronen des olfaktorischen Kortex des Meerschweinchens			^{ch} Chromaffinzellen des Rindernebenniere ^{cs} Neuronen des Ganglion cervicale superior der Ratte ^{ts} Neuronen des Nucleus tractus solitarius der Ratte ^{gk} Ganglionneuronen der Rückenmarkshinterwurzel der Katze <u>Volatile Anästhetika:</u> ^{ha} Halothan ^{en} Enfluran ^{sev} Sevofluran ^{hak} bei hohen Anästhetika-Konzentrationen ^{nak} bei niedrigen Anästhetika-Konzentrationen		<u>Rezeptortyp:</u> ^{nat} nativer Rezeptor ^{t122} transfizierter $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA _A -Rezeptor ^{t122l} transfizierter $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA _A -Rezeptor ^{t122s} transfizierter $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ GABA _A -Rezeptor ^{t122l} transfizierter $\alpha_1\beta_1\gamma_{2L}$ GABA _A -Rezeptor ^{tdiv} verschiedene transfizierte GABA _A -Rezeptoren	
↑ erhöht; ↓ erniedrigt; • gleichbleibend/keine Veränderung; + Effekt vorhanden; ∅ kein Effekt; - keine Daten bekannt;						

Tab. 2.2: Überblick über die Wirkungen einiger ausgewählter Anästhetika. Einerseits wird hier zwischen direkter GABA-Rezeptor-Aktivierung und Beeinflussung der GABA-Wirkung (Affinität zum Rezeptor, GABA-Stromantworten, GABAerge IPSC, Einzelkanalströme) unterschieden. Andererseits werden Methoden und Untersuchungsmaterial (Kulturzellen, Hirnschnittpräparate, endogen- bzw. heterolog exprimierte GABA-Rezeptoren, Spezies) berücksichtigt. In der Literatur ist eine tabellarische Darstellung dieser Ausführlichkeit bisher nicht zu finden.

2.3. Die untersuchten Inhalationsanästhetika

2.3.1. Der MAC-Wert

Der MAC-Wert (minimal alveolar concentration) ist die alveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikums, die bei 50% der Probanden eine motorische Reaktion auf einen definierten Schmerzreiz (Hautinzision bestimmter Länge an der Unterarminnenseite) unterdrückt (Eger, 1965). Die in diesem Sinne wirksamen Substanzen werden deshalb auch als *Immobilizer* bezeichnet. Immobilisation bedeutet jedoch noch nicht Anästhesie als jenen komplexen Zustand (siehe S. 1), der nicht immer mit einer einzelnen Substanz erreicht werden kann. MAC-Werte einzelner Inhalationsanästhetika können in Kombination mit anderen Anästhetika, Sedativa oder Analgetika erheblich vermindert sein. Darüberhinaus variiert der MAC-Wert inter- und intraindividuell erheblich (emotionaler Zustand, Prämedikation, Alter, Stoffwechselsituation, Gewöhnung an zentralwirksame Substanzen). Demgegenüber unterscheiden sich die MAC-Werte von Menschen von denen anderer Spezies (z. B. Nagetiere, Affen) oft viel weniger (Koblin, 1998).

2.3.2. N₂O

N₂O (Stickoxidul, Lachgas) ist das älteste synthetische Narkosegas. Es wurde 1772 von Joseph Priestley hergestellt und 1862 erstmalig erfolgreich von Gardner Colton bei einer Zahnextraktion angewendet (Dzoljic, 1996a).

2.3.2.1. Physikochemische Eigenschaften

N₂O (MG: 44; Strukturformel: Abb. 2.7) hat beim Menschen einen MAC-Wert von 104%; dieser ist also nur unter hyperbaren Bedingungen zu erreichen (Gonsowski, 1994). In der klinischen Praxis wird daher das gut analgetisch wirksame N₂O vor allem in Kombination mit anderen Anästhetika (wie z. B. ISO) eingesetzt (Larsen, 1999). N₂O ist ein stabiles Molekül, es wird nach Inhalation nicht metabolisiert (Dzoljic, 1996a).



Abb. 2.7: Lachgas (= N₂O, Stickoxidul).

2.3.2.2. Wirkung am GABAergen Neurotransmittersystem

Am Tiermodell wurde gezeigt, dass zumindest ein Teil der N₂O-bedingten Verminderung neuronaler Erregbarkeit (erfasst durch Messung visuell evozierter Potentiale) durch Interaktion von N₂O mit dem GABA_A-Rezeptor-Komplex bedingt ist (Dzoljic, 1996b). Auch für den analgetischen (Emmanouil, 1989) bzw. anxiolytischen (Emmanouil, 1994) Effekt von N₂O wurde im Tiermodell eine Beteiligung des GABA-Systems nachgewiesen.

Eine Erhöhung der GABA_A-Rezeptor-Aktivität durch N₂O wurde erst in wenigen Arbeiten beschrieben. In akut-dissoziierten hippocampalen CA1-Neuronen der Ratte verstärkte N₂O GABA_A-Rezeptor-vermittelte Cl⁻-Ströme (Dzoljic, 1998). Ein gebräuchliches Modell für synaptische Verschaltungen sind dissoziierte Hippocampus-Neurone, die in Kultur mit sich selbst sog. „Autapsen“ bilden. Hier erhöhte N₂O den GABAergen inhibitorischen Ladungstransfer insbesondere durch eine Verlängerung dieser autaptischen IPSC (Mennerick, 1998).

2.3.2.3. Wirkung an erregenden Neurotransmittersystemen

Auf Glutamat-Rezeptoren hat N₂O hingegen eine hemmende Wirkung: In Einzelkanal-Untersuchungen zeigte sich eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit (Macdonald, 1995), Messungen an Hippocampus-Neuronen der Ratte zeigten verminderte NMDA-Rezeptor-vermittelte Stromantworten (Jevtovic-Todorovic, 1998). Auch am nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor verminderte N₂O die Kanaloffenzeit (Wachtel, 1995). Die Stromantwort von in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimierten nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren wurde nur bei Vorhandensein der β₂-Untereinheit vermindert, was für eine definierte Bindungsstelle von N₂O sprechen könnte (Yamakura, 2000).

2.3.3. Xenon

Xe (MG: 131,3) wurde 1898 entdeckt und gilt als das einzige unter normobaren Bedingungen anästhetisch wirksame Edelgas (Dingley, 1999).

2.3.3.1. Physikochemische Eigenschaften

Mit einem MAC-Wert von 71% ist es potenter als N₂O (Dingley, 1999). Aus klinischer Sicht ist die Anwendung von Xe als Anästhetikum wegen seiner ausgeprägten kardiovaskulären Stabilität von großem Vorteil (Dingley, 1999).

2.3.3.2. Wirkung am GABAergen Neurotransmittersystem

Bisher beschäftigten sich nur wenige Arbeiten mit der Interaktion von Xe und Neurotransmittersystemen (siehe Tab. 2.3, S. 23). Eine Wirkung von Xe auf die GABAerge synaptische Transmission wurde dabei bisher verneint (Franks, 1998). Auch diese Arbeitsgruppe verwendete für diese Untersuchungen sog. „Mikroinseln“ mit „Autapsen“-bildenden Hippocampus-Neuronen (siehe 2.3.2.2, S. 20).

2.3.3.3. Wirkung an erregenden Rezeptorsystemen

Auch für Xe wurde ein hemmender Effekt auf den NMDA-Rezeptor beschrieben: In Hippocampus-Neuronen der Ratte verminderte Xe NMDA-Rezeptor-vermittelte Stromantworten (Franks, 1998). Dieser hemmende Effekt, der unter den Glutamat-Rezeptoren relativ spezifisch für den NMDA-Rezeptor ist, gilt bislang als maßgeblich für die anästhetische Wirkung von Xe (Franks, 1998).

2.3.4. Isofluran

Isofluran wurde erstmals 1965 synthetisiert, 1984 in Deutschland in der Klinik eingeführt und wird bis heute routinemäßig eingesetzt.

2.3.4.1. Physikochemische Eigenschaften

ISO (Strukturformel: Abb. 2.8) hat ein Molekulargewicht von 184,5 und einen Dampfdruck von ca. 238 mmHg. Es eignet sich daher als dampfförmiges Anästhetikum mit einem MAC-Wert von 0,75 Vol.% in 100% O₂, 0,26 Vol.% in 70% N₂O/30% O₂ (Larsen, 1999).

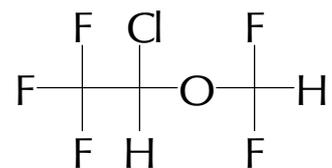


Abb. 2.8: Strukturformel von ISO.

2.3.4.2. Wirkung am GABAergen Neurotransmittersystem

Neben einer Verstärkung GABAerger Mechanismen (Zimmerman, 1994; siehe auch Tab. 2.3, S. 23) zeigt ISO, insbesondere in höheren Konzentrationen, auch eine blockierende Wirkung am GABA_A-Rezeptor (Edwards, 1997), was nicht unmittelbar mit einer verminderten neuronalen Erregbarkeit in Verbindung zu bringen ist. Es gibt jedoch Befunde, die zeigen, dass Kanal-blockierende Substanzen Acetylcholin-Rezeptor-vermittelte Endplatten-EPSC verlängern (Neher, 1978). Auch die Verlängerung GABAerger IPSC durch

ISO könnte durch eine sog. Offenkanalblockade des GABA-Kanals verursacht sein (Jones, 1993). Als möglicher Mechanismus gilt eine verzögerte Rezeptor-Inaktivierung in Anwesenheit eines Offenkanalblockers. In Einzelkanal-Ableitungen zeigt sich dies in verlängerten und vermehrten „Salven“ von Öffnungen und Schließungen einzelner Ionenkanäle, was man damit erklärt, dass ein blockierendes Molekül die Ionenkanalpore in einem bestimmten Gleichgewicht verschließt und wieder freigibt (Beam, 1976). Gleichzeitig erklärt eine solche Blockade die durch ISO verursachte Verminderung der GABA-IPSC-Amplitude (Banks, 1999).

Einen Offenkanalblock-Mechanismus erkennt man insbesondere daran, dass sich ein Transmitter-angeforderter Strom im Moment der schnellen Entfernung einer Kanal-blockierenden Substanz vorübergehend sprunghaft erhöht. Dieser sog. Wiederöffnungsstrom markiert den Übergang der Kanäle vom (im offenen Zustand) blockierten in den wieder-geöffneten Zustand. Im Zusammenhang mit ISO wurden solche Wiederöffnungsströme z. B. an GABAergen Flusskrebs-Endplatten (Adelsberger, 1998) und an nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Scheller, 1997) beschrieben.

2.3.4.3. Wirkung an erregenden Rezeptorsystemen

Am nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor reduziert ISO in klinisch relevanter Konzentration die von Acetylcholin ausgelöste Stromantwort; diesem Befund liegt wahrscheinlich ein Offenkanalblock-Mechanismus zugrunde (Scheller, 1997). Glutamaterge exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) im Hippocampus werden durch ISO verringert (Nishikawa, 2000).

2.3.5. Zusammenfassender Überblick

In Anlehnung an Tab. 2.2 stellt Tab. 2.3 eine Zusammenfassung der wichtigsten Befunde zur Wirkung von N₂O, Xe und ISO an verschiedenen ligandengesteuerten Ionenkanälen dar.

		N ₂ O	Xe	ISO
GABA_A-Rezeptor				
direkte Aktivierung des GABA _A -Rezeptors		∅ (Dzoljic, 1998 ^{hr,nat})	-	+ (Yang, 1992 ^{hr,nat} ; Haseneder, 2002 ^{he,t112l}) ∅ (Harrison, 1993 ^{tdiv,t12l} ; Hall, 1994 ^{pu,nat} ; u.a.)
Affinität von GABA zum Rezeptor			-	↑ (Edwards, 1997 ^{xe,tdro} ; Lees, 1998 ^{xe,tdiv})
GABA-Stromantwort	Amplitude	↑ (Dzoljic, 1998 ^{hr,nat}) (↑) (Jevtovic-Todorovic, 1998 ^{hr,nat} ;))	(↑) (Yamakura, 2000 ^{xe,tdiv}) ∅ (de Sousa, 2000 ^{mi,nat,au} ; Franks, 1998 ^{hr,nat,pa3,tdiv})	↑ (Lin, 1992 ^{xe,nak} ; Edwards, 1997 ^{xe,tdro,nak} ; Lees, 1998 ^{xe,tdiv} ; Jenkins, 1999 ^{mf,t112l} ; u.a.) ↓ (Lin, 1992 ^{xe,hak} ; Edwards, 1997 ^{xe,tdro,hak} ; u.a.)
	Deaktivierung		∅ (de Sousa, 2000 ^{mi,nat,au} ; Franks, 1998 ^{hr,nat,pa3,tdiv})	↑ (Jones, 1992 ^{hr,nat}) ↓ (Nakahiro, 1989 ^{mm,nat})
IPSC	Amplitude	● (Mennerick, 1998 ^{hr,nat,au})	∅ (de Sousa, 2000 ^{mi,nat,au})	● (de Sousa, 2000 ^{mi,nat,au}) ↓ (Jones, 1993 ^{hr,nat} ; Banks, 1999 ^{hr,nat})
	Dauer	● bis (↑) (Mennerick, 1998 ^{hr,nat,au})	∅ (de Sousa, 2000 ^{mi,nat,au})	↑ (Jones, 1993 ^{hr,nat} ; Banks, 1999 ^{hr,nat} ; de Sousa, 2000 ^{mi,nat,au})
Einzelkanal-Aktivität	mittlere Offenzeit	-	-	↓ (Adelsberger, 1998 ^{ab,nat})
nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor				
Affinität von ACh zum Rezeptor		-	-	↑ (Raines, 1999 ^{eo,naa})
ACh-Stromantwort	Amplitude	↓ (Yamakura, 2000 ^{xe,ta})	↓ (Yamakura, 2000 ^{xe,ta})	↓ (Dilger, 1993 ^{bc,ta} ; Scheller, 1997 ^{my,ta} ; u.a.)
	Deaktivierung	-	-	↓ (Dilger, 1993 ^{bc,ta})
Einzelkanal-Aktivität	Öffnungsfrequenz	-	-	-
	mittlere Offenzeit	↓ (Wachtel, 1995 ^{bc,naa})	-	↓ (Wachtel, 1995 ^{bc,naa} ; Dilger, 1992a ^{bc,ta})
	Burstanzahl	-	-	↑ (Dilger, 1992a ^{bc,ta})
	Burstlänge	-	-	↓ (Dilger, 1992a ^{bc,ta})
Glutamat-Rezeptoren				
Glutamat-Stromantwort	Amplitude	↓ (Jevtovic-Todorovic, 1998 ^{hr,nan} ; Mennerick, 1998 ^{hr,nan,m})	-	↓ (de Sousa, 2000 ^{mi,nag,au,wn})
	Deaktivierung	-	-	● (de Sousa, 2000 ^{mi,nag,au})
Glutamat-Rezeptor-vermittelte EPSC	Amplitude	↓ (Mennerick, 1998 ^{hr,nan,au} ; Yamakura, 2000 ^{xe,tn})	↓ (Yamakura, 2000 ^{xe,tdiv} ; de Sousa, 2000 ^{mi,nag,au} ; Franks, 1998 ^{hr,nag,wn})	↓ (de Sousa, 2000 ^{mi,nag,au,wn} ; Nishikawa, 2000 ^{hr,nag,wn})
	Dauer	● (Mennerick, 1998 ^{hr,nan,au})	-	● (de Sousa, 2000 ^{mi,nag,au} ; Nishikawa, 2000 ^{hr,nag})
Einzelkanal-Aktivität	Öffnungsfrequenz	↓ (Macdonald, 1995 ^{mh,nag})	-	-
	mittlere Offenzeit	↓ (Macdonald, 1995 ^{mh,nag})	-	-
Untersuchungsmaterial:		^{mh} Muskelgewebe der Heuschrecke ^{pa3} PA3 Zellen ^{ab} tiefer abdominaler Streckmuskel des Flußkrebse ^{my} Mausmyotuben ^{tdiv} Purkinjencell aus Rattenkleinhirn ^{eo} Elektropax-Organ von Torpedo nobiliana	Rezeptortyp: ^{nat} nativer GABA-Rezeptor ^{nag} nativer Glutamat-Rezeptor ^{nan} nativer NMDA-Rezeptor ^{naa} nativer nikotinischer ACh-Rezeptor ^{tdiv} transfizierter GABA _A -Rezeptor ^{t112l} transfizierter α ₁ β ₂ γ _{2L} GABA _A -Rezeptor ^{t212} transfizierter α ₁ β ₂ γ ₂ GABA _A -Rezeptor ^{ta} transfizierter nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor	^{tdro} transfizierter NMDA-Rezeptor ^{tdro} transfizierter Drosophila melanogaster GABA-Rezeptoren ^{ab} Messung von autaptischen, d.h. „Eigensynaptischen“ Strömen ^{hak} bei hohen Anästhetika-Konzentrationen ^{nak} bei niedrigen Anästhetika-Konzentrationen ^{wn} Wirkung des Anästhetikums wird v. a. der NMDA-Rezeptor-Komponente zugeschrieben
↑ erhöht / verlängert; ↓ erniedrigt / verkürzt; ● gleichbleibend / keine Veränderung; + Effekt vorhanden; ∅ kein Effekt; - keine Daten bekannt;				

Tab. 2.3: Der Effekt von N₂O, Xe und ISO auf verschiedene ligandengesteuerte Ionenkanäle.

2.4. Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht die Messung transmembranärer Ionenströme durch Ionenkanäle (Numberger, 1996). Das Verfahren wurde Mitte der 70er Jahre von Erwin Neher und Bert Sakmann (Medizin-Nobelpreis 1991) entwickelt. Grundprinzip der Technik ist die elektrische Abdichtung der Öffnung einer fein ausgezogenen Glaspipette durch ein Zellmembranstück (engl. *patch* = Flicker) oder durch eine ganze Zelle. Dadurch können Ladungsverschiebungen über die zelluläre Membran hinweg von einem speziellen Patch-Clamp-Verstärker registriert werden (Hamill, 1981).

2.4.1. Messprinzip

Vereinfacht kann die Zellmembran als Isolator zwischen Extra- und Intrazellulärraum verstanden werden. Je nach Ionenzusammensetzung des Intra- bzw. Extrazellulärums besteht für die jeweiligen Ionen eine bestimmte treibende Kraft über die Membran hinweg. Diese treibende Kraft bewirkt nach Aktivierung membranständiger Ionenkanäle einen Fluss der den jeweiligen Kanal passierbaren Ionen. Eine solche transmembranäre Ladungsverschiebung wird durch den Patch-Clamp-Verstärker registriert und durch einen Kompensationsstrom, der dem transmembranären Strom entspricht, ausgeglichen. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem die Membranspannung gemessen und mit einer vorgegebenen Sollspannung (auch: Klemmspannung; engl. *clamp* = Klemme) verglichen wird. Der Kompensationsstrom wird letztlich gemessen und aufgezeichnet. (Zusammengefasst nach Numberger, 1996.)

Das Besondere der Patch-Clamp-Technik gegenüber früheren Voltage-Clamp-Verfahren ist die extrem hohe Auflösung der gemessenen Signale gegenüber dem Grundrauschen (Hamill, 1981). Wesentlich für die Reduktion des Rauschens ist vor allem der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran (engl. *seal* = Abdichtung, Versiegelung). Durch Anlegen eines Unterdruckes in der Pipette wird das Membranstück in die Öffnung gesaugt. Der dadurch entstandene direkte Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche ist sehr stabil. Im Idealfall beträgt der elektrische Widerstand zwischen Pipetteninnerem und umgebender Badlösung mehrere Gigaohm ($G\Omega$), man spricht daher vom „*Gigaseal*“ (Numberger, 1996).

2.4.2. Patch-Clamp-Konfigurationen

Je nach Fragestellung bzw. Vorgehensweise unterscheidet man bei der Patch-Clamp-Technik verschiedene Konfigurationen. In Abb. 2.9 werden die beiden wichtigsten, die Whole-Cell- bzw. die Outside-out-Konfiguration, schematisch dargestellt. Während bei der Whole-Cell-Konfiguration die Zelle im Ganzen erhalten bleibt, wird bei der Outside-out-Konfiguration ein Membranstück aus der Zelle gelöst. Im günstigen Falle verschließt dieses als Halbvesikel die Pipettenöffnung so, dass die Membranaußenseite zur Badlösung zeigt. Bei dieser Outside-out-Konfiguration können die Stromantworten einzelner Ionenkanäle, im Idealfall eines einzigen Ionenkanales gemessen werden (sog. Einzelkanal-Ableitung). Der einzelne Ionenkanal folgt einem Alles-oder-Nichts-Prinzip, d. h. er ist entweder geschlossen oder geöffnet. Die gemessenen Einzelkanalströme erscheinen daher als rechteckförmige Sprünge von einer Nulllinie (geschlossener Zustand) zu einem bestimmten Niveau (offener Zustand; siehe Abb. 2.9, B, schematische Stromantwort). Bei der Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung) hingegen werden Summenströme aller auf einer Zelle befindlichen aktivierten Ionenkanäle registriert (siehe Abb. 2.9, A, schematische Stromantwort). Bei beiden Konfigurationen ist die intrazelluläre Seite der Zellmembran mit dem Pipetteninneren verbunden. Das bedeutet, dass ein Stromfluss von außen nach innen in das Pipetteninnere hineinfließt (und umgekehrt). Definitionsgemäß wird ein sog. Einwärtsstrom bei der Darstellung auf dem Messgerät nach unten aufgetragen. (Zusammengefasst nach Numberger, 1996.)

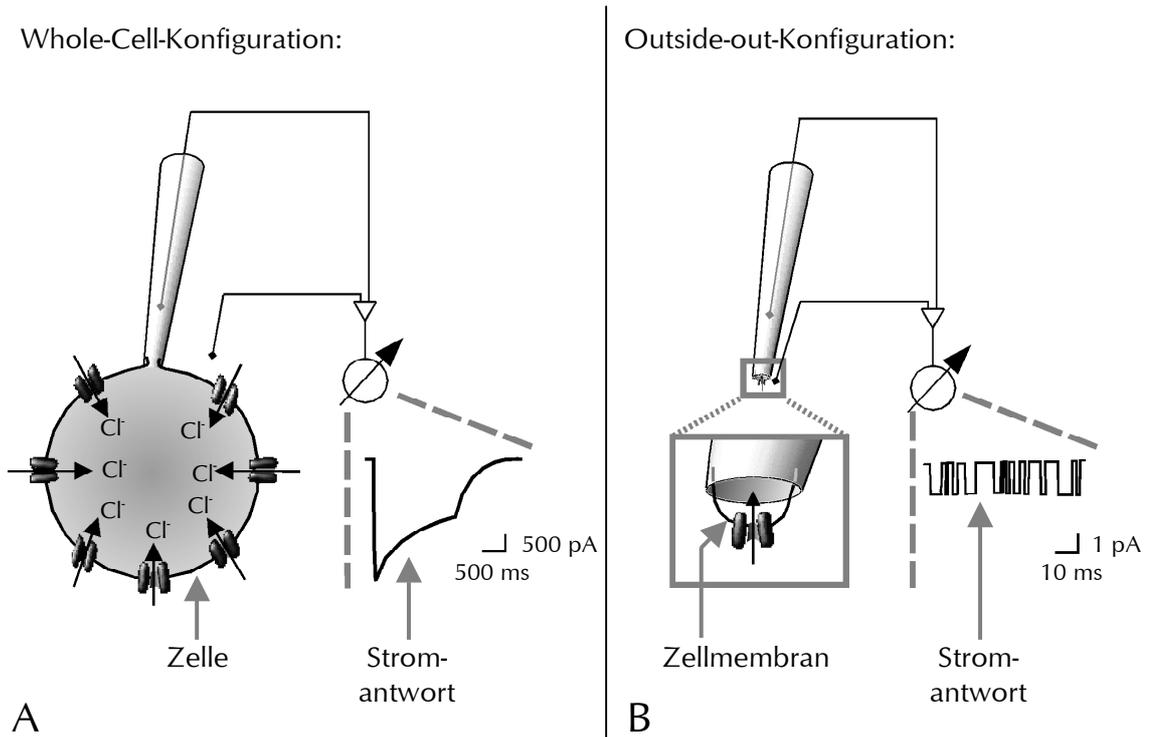


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der beiden wichtigsten Patch-Clamp-Konfigurationen und der dazugehörigen Stromantworten. **A:** Bei der Whole-Cell-Konfiguration besteht eine Verbindung zwischen Intrazellulärraum und dem Pipetteninneren. Es wird eine Summation aus Einzelkanalströmen registriert (hier am Beispiel eines typischen GABA_A -Rezeptor-vermittelten Chloridstroms). **B:** Bei der Outside-out-Konfiguration weist die intrazelluläre Seite eines Membran-„Flickens“ (= engl. patch) zum Pipetteninneren und die extrazelluläre Seite zur Badlösung. Im Idealfall kann man dadurch die Stromantworten einzelner Kanäle registrieren. Beachte die unterschiedliche Skala bei den schematischen Stromantworten. (Abb. modifiziert nach Numberger, 1996.)

Neben den beiden dargestellten Patch-Clamp-Konfigurationen gibt es noch weitere, selten verwendete Konfigurationen (Cell-attached, Inside-out, etc.), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Für die vorliegende Fragestellung wurde die Whole-Cell-Konfiguration als geeignete Technik gewählt. Zur Herstellung dieser Konfiguration siehe Abb. 4.1, S. 32.

2.4.3. Transmitterapplikation

Die an der Pipettenspitze befindliche Zellmembran bzw. Zelle stellt letztlich ein Modell für die postsynaptische Membran bzw. für das postsynaptische Neuron dar. Die umgebende Badlösung ist hierbei mit dem Milieu des synaptischen Spaltes zu vergleichen. Die besondere Schwierigkeit besteht nun darin, auch für die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt ein geeignetes Modell zu schaffen. Im synaptischen Spalt der GABAergen Synapse z. B. wird sehr schnell ($< 1 \text{ ms}$) ein GABA-Gradient erzeugt

(Maconochie, 1994; Jones, 1995), der dann aufgrund Diffusion und Wiederaufnahme in die Präsynapse innerhalb von Millisekunden wieder abfällt (Clements, 1996). Um im Rahmen von Patch-Clamp-Untersuchungen ligandengesteuerter Ionenkanäle solch schnelle Transmitterfreisetzung mit Bildung kurzer Transmittergradienten nachzuahmen, wurden verschiedene Perfusions- bzw. Applikationsverfahren entwickelt.

Die ursprünglichen langsameren Verfahren, die die Transmitterlösung schwerkraftgetrieben über Schlauchsysteme applizieren, sind zur Erfassung der schnellen Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik ligandengesteuerter Ionenkanäle wenig geeignet (Numberger, 1996).

Schnellere Applikationssysteme, wie z. B. das „U-Tube“-Verfahren (siehe Abb. 2.10) erlauben hingegen einen vollständigen Lösungswechsel in der Umgebung der Zelle binnen etwa 100 ms (Numberger, 1996). Die sehr schnelle Aktivierung ionotroper Kanäle innerhalb weniger Millisekunden kann man dadurch jedoch nicht beurteilen, es kommt letztlich zu einer Limitierung der zeitlichen Auflösung durch die Transmitteranflutung. Da im weiteren die Entfernung des Transmitters passiv durch Abdiffusion erfolgt, ist die Inaktivierung der transmitterinduzierten Ionenströme weniger Ausdruck

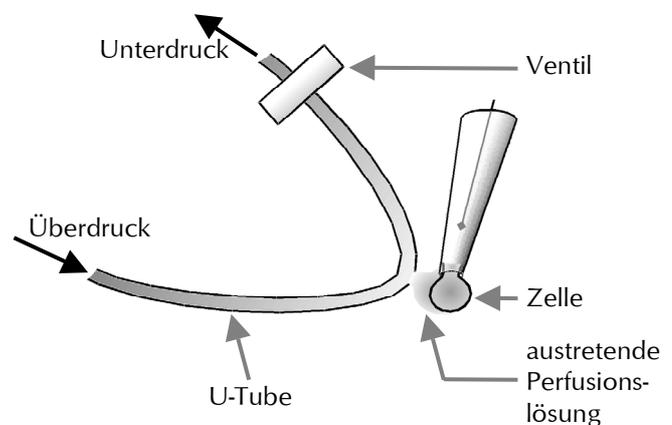


Abb. 2.10: Bei der „U-Tube“ strömt die Perfusionslösung druckgetrieben in einen Schenkel eines U-förmigen Glasröhrchens. An den anderen Schenkel wird ein Unterdruck angelegt, der durch einen Ventilmechanismus abgeschaltet werden kann. Zwischen beiden Schenkeln befindet sich ein Loch in der Glasröhre, an das die Zelle herangebracht wird. Bei Abschaltung des Unterdrucks fließt die Perfusionslösung durch das Loch und umspült die Zelle. (Abb. modifiziert nach Numberger, 1996.)

der spezifischen Inaktivierungskinetik der Ionenkanäle, sondern vielmehr der Abflutungsgeschwindigkeit des Transmitters unterworfen. Gerade die Inaktivierungskinetik von Ionenkanälen ist aber ganz entscheidend für den Zeitverlauf synaptischer Antworten. Daher benötigt man zu deren Beurteilung ein System, das sowohl eine sehr schnelle Applikation als auch Desapplikation des Transmitters erlaubt. Dafür wurde das in dieser Arbeit verwendete piezogetriebene Applikationssystem entwickelt (Franke, 1987), das unter 4.3.4, S. 33 näher beschrieben ist.

Ein neueres Verfahren zur gezielten Transmitterapplikation an beliebigen, eng

begrenzten neuronalen Strukturen innerhalb eines Schnittpräparates ist die photolytische Freisetzung von gekapselten (engl. *caged*) Transmittern. Dabei aktiviert man den mit einer Schutzgruppe biologisch inaktivierten Agonist durch einen UV-Blitz (McCray, 1989). Die Desapplikation des Transmitters erfolgt aber durch passive Abdiffusion.

2.4.4. Heterologe Expression von Ionenkanälen

Um Ionenkanäle mit definierter Untereinheitenzusammensetzung zu untersuchen, benutzt man Zellkulturen als heterologe Expressionssysteme. Heterolog bedeutet, dass die Expression eines Proteins durch eine transfizierte Zelle erfolgt, die im nativen Zustand dieses Protein nicht exprimiert (Numberger, 1996). Neben *Xenopus laevis* Oozyten, Mausfibroblasten und HeLa-Zellen eignet sich die sehr gebräuchliche Kulturzelllinie HEK 293 besonders gut als heterologes Expressionssystem (Numberger, 1996).

Zunächst wird das zu untersuchende Protein kloniert, d. h. die zugehörige mRNA wird detektiert und in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann in Plasmide, die als Transfektionsvektoren dienen, eingebaut. Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle (Löffler, 1997). Man unterscheidet transiente und stabile Transfektion. Bei der transienten Transfektion werden die Proteine bis zum zellulären Abbau der Plasmide nur vorübergehend, d. h. einige Tage exprimiert. Stabile Transfektion kann z. B. durch einen Selektionsdruck erreicht werden (Numberger, 1996).

Bei der Transfektion muss die DNA die Zellmembran überwinden, um in den Zellkern zu diffundieren. Dazu wurden unterschiedliche Methoden entwickelt: Bei der Calcium-Phosphat-Technik wird die DNA komplexiert und damit die elektrochemische Barriere zwischen negativem Zellinneren und der negativ geladenen DNA aufgehoben (Petrides, 1997b). Die Fremd-DNA kann auch mit Hilfe von Liposomen oder durch Mikroinjektion in die Zelle geschleust werden (Petrides, 1997b). Mit der sog. „Genkanone“ werden die Zellen mit DNA-beladenen Goldpartikeln „beschossen“ (Yang, 1990). Bei der Elektroporation wird die Zellmembran in einem elektrischen Feld vorübergehend für die Plasmide durchlässig (Numberger, 1996). Fremd-DNA kann auch mittels Viren als sog. „Genfähren“ in das Genom von Zellen integriert werden (Löffler, 1997, Petrides, 1997b). Für die vorliegende Arbeit wurde aus Rattenhirn cDNA der α_1 -, β_2 - bzw. γ_{2L} -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors gewonnen und in Plasmide eingebaut. Damit wurden HEK 293-Zellen, die in nativer Form keine GABA-Rezeptoren exprimieren (Lavoie, 1997), mittels Elektroporation transient transfiziert.

3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der Anästhetika N_2O , Xe und ISO auf den $GABA_A$ -Rezeptor untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse sollen insbesondere die postsynaptischen Mechanismen dieser Anästhetika aufklären helfen. Hierbei ermöglicht das verwendete System zur schnellen Transmitterapplikation erstmals auch eine kinetische Beschreibung der Wirkung der untersuchten Anästhetika.

Als Modell für einen postsynaptischen Angriffsort dient das beschriebene Messsystem mit transfizierten HEK 293-Zellen. Diese exprimieren einen rekombinanten $GABA_A$ -Rezeptor der Ratte mit der Untereinheitenkombination $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$, wie sie auch im menschlichen ZNS am häufigsten vorkommt.

Mit der Patch-Clamp-Technik werden GABA-induzierte Stromantworten in der sog. Ganzzelleableitung aufgenommen. Dabei soll festgestellt werden, inwiefern die genannten Anästhetika diese Rezeptorantworten beeinflussen. Daraus sollen Rückschlüsse auf die Art der Interaktion zwischen dem jeweiligen Anästhetikum und dem $GABA_A$ -Rezeptor gezogen werden, um auch mögliche Unterschiede in den Wirkmechanismen zu ermitteln. Als Ergänzung zu den elektrophysiologischen Messungen soll die Kanalkinetik des $GABA_A$ -Rezeptors mit Hilfe einer Computersimulation modelliert und damit auch die Wirkung der untersuchten Anästhetika qualitativ und quantitativ beschrieben werden.

Zunächst werden die gasförmigen Anästhetika N_2O und Xe sowie das dampfförmige Anästhetikum ISO getrennt voneinander untersucht. Darüberhinaus werden N_2O und ISO kombiniert angewendet. Dieses aufgrund der schwierigen Handhabung der beiden Substanzen erstmalig durchgeführte Experiment soll zeigen, ob der klinisch additive Effekt dieser Anästhetika auch durch Interaktion am $GABA_A$ -Rezeptor erklärt werden kann.

4. Methodik

4.1. Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie HEK 293 (Chargen-Nr. ATCC CRL 1573) wurden in Minimal-Essential-Medium (MEM, Zusammensetzung: siehe Anhang; supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) kultiviert. Die Zellkultur erfolgte in Petrischalen (100 x 20 mm) bei 5% CO₂, 95% Luft und 100% relativer Luftfeuchtigkeit bei 37° C. Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen nach Entfernen des alten Mediums die adhärennten Zellen eines Schälchens in 3 ml PBS-Puffer (Zusammensetzung: siehe Anhang) gewaschen und in 2 ml 1:5 Trypsinlösung und 3 ml MEM resuspendiert. Nach Zentrifugation (1000 U/min, 4 min) wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen nach Resuspension in 20 ml MEM auf zwei Schälchen verteilt.

4.2. Transfektion

Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation 12-18 Stunden vor den Patch-Clamp-Experimenten. Hierbei wurde die transiente Rezeptorexpression (für ca. 20-40 h) durch HEK 293-Zellen genutzt. Als Transfektionsvektor diente das Plasmid PPK 235 mit aus Rattenhirn gewonnener cDNA für die α_1 , β_2 bzw. γ_{2L} -Unterheiten des GABA_A-Rezeptors. Eine weitere cDNA für GFP (grün fluoreszierendes Protein) wurde als Expressionsmarker kotransfiziert. Zellen, die GFP exprimieren, dessen Grünfluoreszenz man unter Anregung mit 460 nm sieht, exprimieren mit einer Wahrscheinlichkeit von > 90% auch einen funktionellen GABA_A-Rezeptor.

Zur Transfektion wurden HEK-Zellen einer Petrischale (100 x 20 mm) nach Waschen mit PBS-Puffer durch Trypsin abgelöst, in Medium resuspendiert, abzentrifugiert (1000 U/min, 4 min) und schließlich in 1950 μ l Elektroporationspuffer und 50 μ l Magnesiumsulfatlösung (genaue Zusammensetzung beider Lösungen: siehe Anhang) resuspendiert. 400 μ l dieser Zellsuspension wurden mit je 5 μ g der Plasmide für die Rezeptoruntereinheiten und 10 μ g GFP-Plasmid versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei 280-320 V und 1 mF (abhängig vom Transfektionserfolg der vorangegangenen Elektroporation). Je 30-50 μ l der elektroporierten Zellsuspension wurden in Petrischalen (35 x 10 mm) gegeben und bis zur Durchführung der Experimente bei 5% CO₂, 95% Luft, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 37° C inkubiert.

4.3. Patch-Clamp-Technik

Alle Patch-Clamp-Experimente wurden bei Raumtemperatur (20-23° C) durchgeführt. Gemessen wurden GABA-induzierte Chlorid-Einwärtsströme in der Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung).

4.3.1. Vorbereitung der Zellen

Zur Durchführung der Experimente mit den transfizierten HEK 293-Zellen wurde das MEM durch Extrazellulärlösung (Zusammensetzung: siehe Anhang) ersetzt.

4.3.2. Herstellung der Messelektroden

Verwendet wurden Glaspipetten-Rohlinge aus Borosilikat (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,17 mm). Die Messelektroden wurden mit einem Elektrodenziehgerät im Zweizugverfahren hergestellt. Nach dem Vorziehen (die Pipette wird durch eine Glühwendel mittig angeschmolzen und dabei um ca. 1 cm ausgezogen) erfolgt in einem zweiten Schritt ein weiteres Auseinanderziehen, bis die Pipette an der dünnsten Stelle reißt. In einem dritten Schritt wurden die ausgezogenen Enden mit der Glühwendel hitzepoliert. Die zwei entstandenen Pipetten wurden mit Intrazellulärlösung gefüllt und hatten einen seriellen Widerstand von 4-9 M Ω .

4.3.3. Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration

Bei der Patch-Clamp-Technik gibt es unterschiedliche Messkonfigurationen (siehe 2.4.2, S. 25). Bei der verwendeten Whole-Cell-Konfiguration werden Stromantworten aller Ionenkanäle der gesamten Zellmembran erfasst. Die Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration ist in Abb. 4.1, A dargestellt. Zunächst wird die Pipettenspitze unter Mikroskopsicht an die Zellmembran einer am Schälchenboden adhären Zelle herangeführt. Beim Aufsetzen der Spitze auf die Zellmembran verringert sich der serielle Pipettenwiderstand (Abb. 4.1, B). Über die Pipetten-Halterung kann man auf das Pipetteninnere eine Sog ausüben, wodurch die Zellmembran in die Pipettenöffnung eingezogen wird (Δ Cell-attached-Konfiguration). Der Stromfluss durch die Pipettenspitze, der durch die Kommandospannung erzeugt wird, sinkt dadurch fast auf null. Dies signalisiert einen hohen Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran (Δ Seal). Durch einen zweiten – kürzeren und stärkeren – Sog wird die Zellmembran durchbrochen und damit

die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt. Dies kann man anhand der sog. kapazitiven Artefakte (Lade- und Entladeströme der nun als Kondensator wirkenden Zellmembran) sehen. Dabei soll der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipettenspitze und Zellmembran erhalten bleiben. Liegt dieser Widerstand im $G\Omega$ -Bereich spricht man vom sog. Gigaseal.

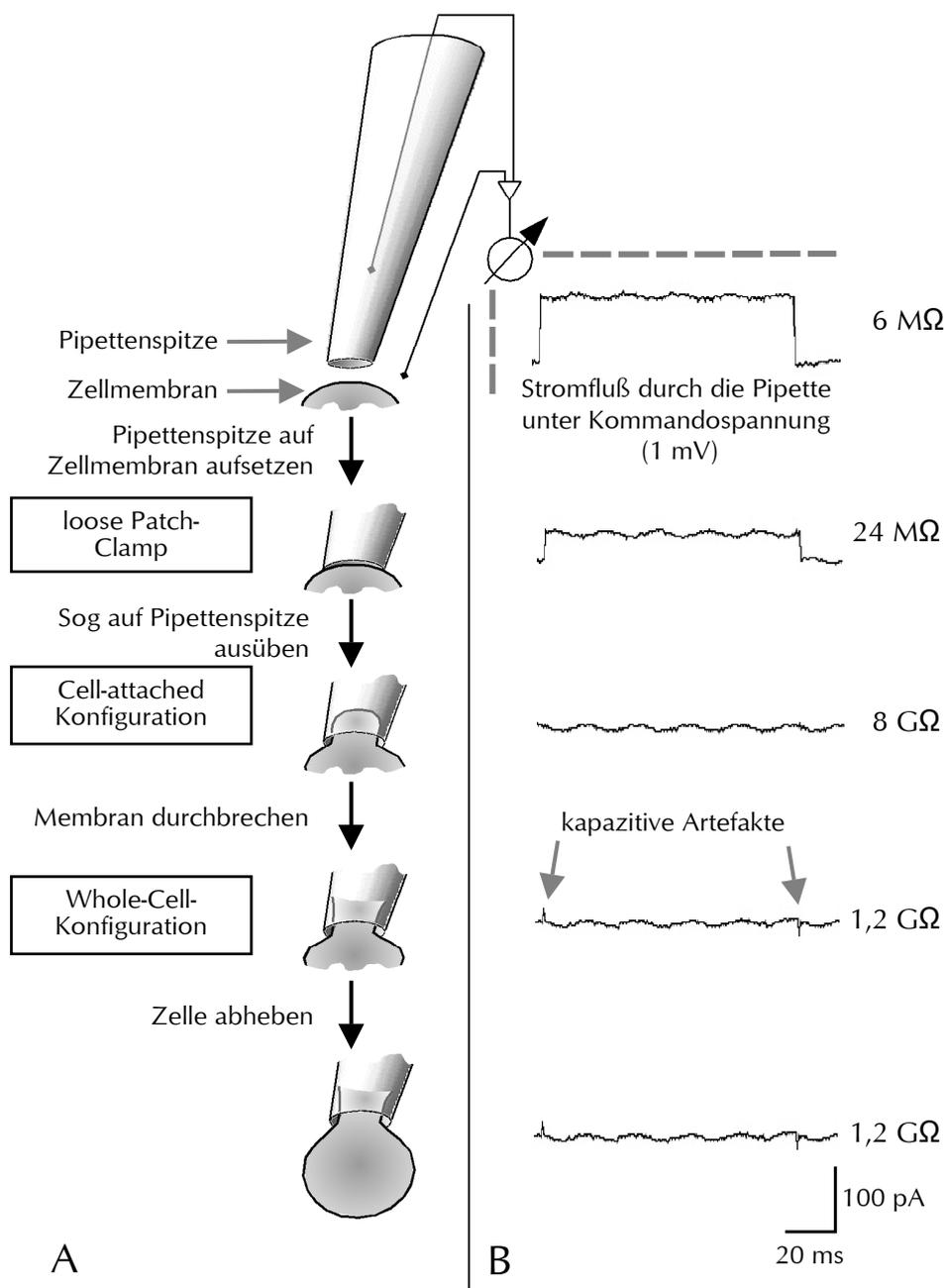


Abb. 4.1: Die Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration. **A:** Schematische Darstellung (modifiziert nach Hamill, 1981). **B:** Die der jeweiligen Konfiguration entsprechenden Verstärkersignale (Bildschirmabbildungen der pClamp-Software) mit exemplarischer Angabe des vom Verstärker gemessenen Pipettenwiderstandes.

Nach Herstellung der Konfiguration wird die Zelle unter zunächst horizontaler, anschließend vertikaler Bewegung der Pipette vom Schälchenboden gelöst und in das Applikationssystem eingebracht.

4.3.4. Die schnelle Agonistenapplikation

Der GABA_A -Rezeptor besitzt als ligandengesteuerter Ionenkanal die Eigenschaft, nach Aktivierung durch GABA innerhalb von Millisekunden vom geschlossenen in den offenen Zustand überzugehen. Zur experimentellen Erfassung solch schneller Prozesse benötigt man ein Applikationssystem, das den Lösungswechsel in kürzerer Zeit vornimmt als die Zeitkonstante der schnellsten Zustandsänderung, die beschrieben werden soll (Numberger, 1996). Dem verwendeten schnellen Applikationssystem, mit dem (bei Outside-out-Patches) Applikations- und Desapplikationszeiten von unter $100 \mu\text{s}$ erreicht werden (Franke, 1987), kommt daher besondere Bedeutung zu.

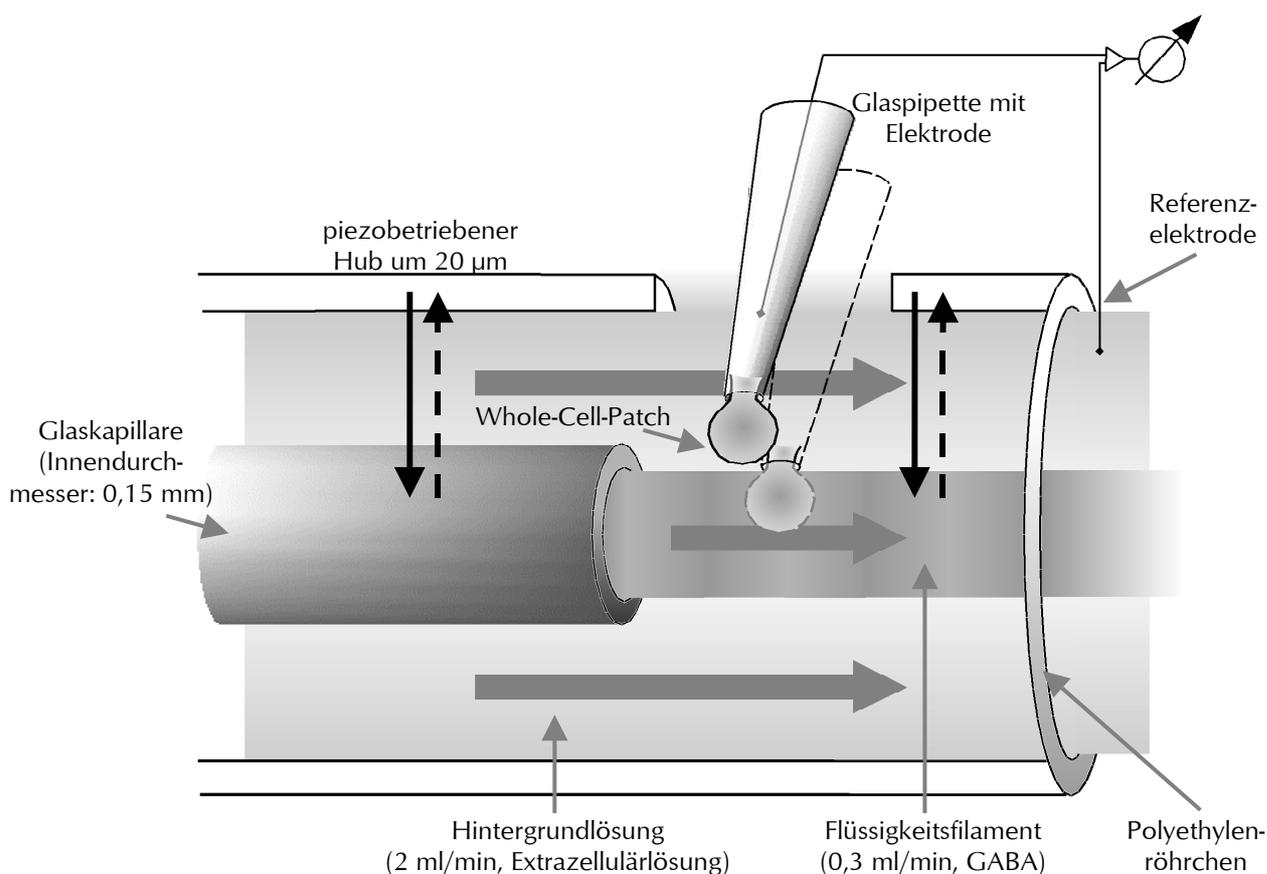


Abb. 4.2: Schemazeichnung des schnellen, piezobetriebenen Applikationssystems. Ein von der Aufnahmesoftware angesteuerter Piezokristall bewegt das Flüssigkeitsfilament mit der Testlösung um $20 \mu\text{m}$ auf die Zelle zu und wieder von ihr weg. Damit werden Austauschzeiten der Flüssigkeit in der Umgebung der Zelle von $< 1 \text{ ms}$ erreicht.

Beim schnellen Applikationssystem ist ein Polyethylenröhrchen an einem Piezokristall befestigt. Durch dieses Röhrchen fließt schwerkraftgetrieben die umgebende Hintergrundlösung (= Extrazellulärlösung). Innerhalb dieses Röhrchens fließt die Testlösung aus einer dünnen Glaskapillare druckgetrieben in gleicher Richtung. Dabei bildet sich unter laminaren Strömungsverhältnissen das sog. Flüssigkeitsfilament mit scharfer Grenze zur Hintergrundlösung (siehe Abb. 4.2).

An diese Grenze (sichtbar gemacht durch Färbung der Testlösung mit Lissamingrün) wird unter Binokularsicht die Zelle platziert. Bei Aktivierung des Piezokristalls bewegt sich das Flüssigkeitsfilament um 20 μm auf die Zelle zu und umhüllt diese (Applikation). Bei Inaktivierung des Piezokristalls senkt sich das Polyethylenröhrchen wieder nach unten und damit von der Zelle weg (Desapplikation). Die Dauer der Piezo-Aktivierung bestimmt demnach die Dauer der GABA-Applikation (siehe Abb. 4.3).

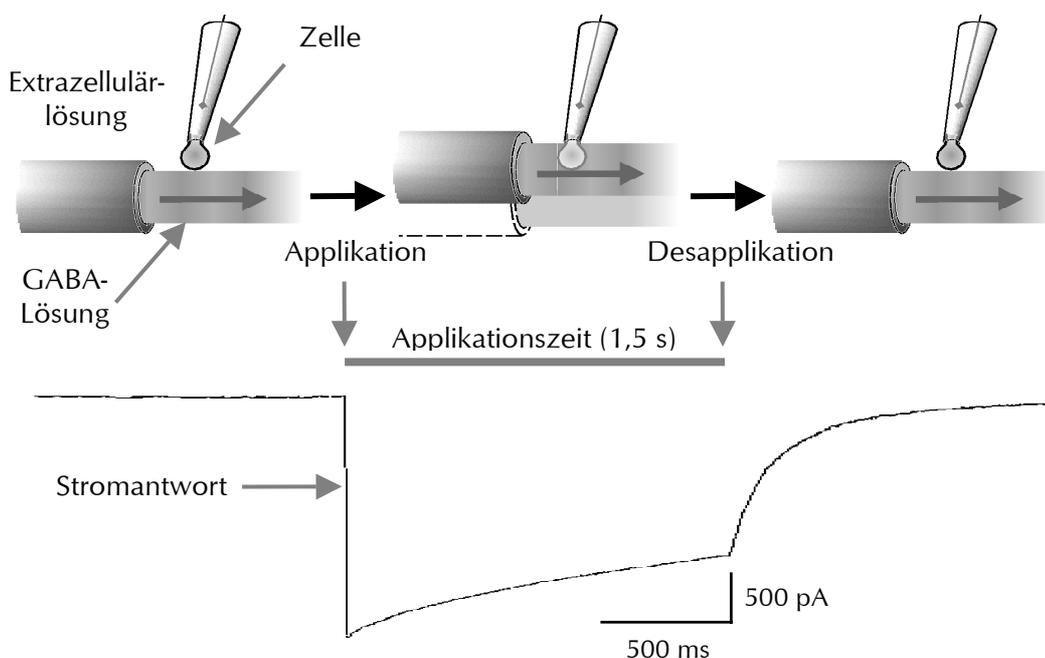


Abb. 4.3: Schematische Darstellung von Applikation und Desapplikation von GABA mit resultierender Stromantwort.

Zwischen den Einzelpulsen wurden Pausen von 10 s Dauer eingehalten, um eine vollständige Resensitisierung der GABA_A -Rezeptoren zu ermöglichen (Jahn, 1997). Mindestens drei stabile einzelne Stromantworten wurden jeweils gemittelt.

Die Glaskapillare ist mit einem Reservoir verbunden, welches aus zwei voneinander getrennten, gasdicht abgeschlossenen Tanks besteht. Ein Tank enthält die Kontrolllösung,

d. h. den Transmitter GABA alleine, der andere zusätzlich das zu untersuchende Anästhetikum. Durch manuelle Umschaltung speist wahlweise einer der beiden Tanks das Flüssigkeitsfilament.

Bei einem Teil der Experimente enthielt auch die Hintergrundlösung das jeweils zu untersuchende Anästhetikum. Hierdurch wurde eine Präinkubation der Zelle mit dem Anästhetikum erreicht.

4.3.5. Verwendete Lösungen

4.3.5.1. Extrazellulärlösung

Die sog. Extrazellulärlösung ist in Ionen-Zusammensetzung, pH und Osmolarität dem physiologischen Extrazellulärmillieu angeglichen (genaue Zusammensetzung: siehe Anhang). Sie bildet das Umgebungsmillieu der Zellen in den Experimenten.

4.3.5.2. Intrazellulärlösung

Die Patchpipette wird mit einer entsprechenden Intrazellulärlösung gefüllt, die durch die Whole-Cell-Konfiguration (siehe 4.3.3, S. 31) mit dem Intrazellulärraum der HEK-Zelle in Verbindung steht (genaue Zusammensetzung der Intrazellulärlösung: siehe Anhang).

4.3.5.3. GABA-Lösung

Aus GABA (MG = 103,1) wurde eine Stammlösung (10^{-1} M) hergestellt. Dazu wurden 103,1 mg GABA in 10 ml Extrazellulärlösung aufgelöst. Die angegebenen Konzentrationen wurden daraus in einer Verdünnungsreihe hergestellt.

4.3.5.4. Herstellung der gasgesättigten Lösungen

Für die beschriebenen Messungen mußte das jeweilige Gas in Lösung gebracht werden. Dafür wurde N_2O , Xe oder He in ein Glasgefäß (10 ml) mit GABA-Lösung eingeleitet. Die Begasung erfolgte mit kontinuierlichem Fluss von 20 ml/min für mindestens 3,5 min über einen Teflonschlauch. Sobald sich die Zelle in der Messposition befand, wurde die gesättigte Lösung mittels Glasspritze zügig in einen der Reservoirtanks (s. o.) eingebracht. Die verwendeten Gase bewirkten keine pH-Veränderungen der Lösung.

Die Lösung von N_2O und Xe in der Extrazellulärlösung konnte mittels volumetrischer Gaslöslichkeitsmessung in Flüssigkeiten (nach Krauss, 1977, modifiziert von Dr. Karl-Heinz Meister, Linde AG) im Zeitverlauf bestimmt werden (siehe 5.2.1, S. 43).

4.3.5.5. Isofluran-Lösung

Zur Herstellung einer gesättigten ISO-Lösung wurde flüssiges ISO in handelsüblicher Form (Forene[®]) der Extrazellulärlösung im Überschuss zugesetzt und für ca. 3 Stunden gerührt. Das Becherglas wurde mit Parafilm[®] verschlossen und bei 20° C aufbewahrt. Die ISO-Konzentrationen der so gesättigten Lösung wurde mittels Gaschromatographie bestimmt und betrug 15 mM.

Die angegebenen ISO-Konzentrationen wurden mittels Verdünnungsreihen aus der gesättigten Lösung hergestellt. Zur Überprüfung der jeweiligen Konzentrationen wurden einige Proben aus dem Messsystem aufgefangen und mit Gaschromatographie gemessen. Der Unterschied zwischen berechneter und gemessener Konzentration betrug weniger als 15%. Um bei den Patch-Clamp-Experimenten diesen Unterschied möglichst klein zu halten, wurden die ISO-Verdünnungen stets unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment hergestellt und umgehend in das Applikationssystem eingebracht. Für ISO wird ein MAC-Äquivalent von ca. 0,5 mM (Firestone, 1986) angegeben.

4.3.5.6. Herstellung der N₂O-gesättigten Isofluran-Lösungen

Zur Herstellung der N₂O-gesättigten ISO-Lösungen wurden N₂O-gesättigten GABA-Lösungen jeweilige Aliquots der ISO-Stammlösung (15 mM) zugegeben, kurz unter Luftabschluss durchmischt und umgehend in das Applikationssystem eingebracht.

4.3.5.7. Herstellung der Picrotoxin- und Bicucullin-Lösungen

Aliquots einer Picrotoxin- (MG: 602,6) bzw. Bicucullin- (MG: 509,3) Stammlösung (1 M in DMSO) wurden jeweils kurz vor der Messung zur Extrazellulärlösung in der Verdünnung 1:1000 pipettiert.

4.3.6. Aufnahmesystem und Auswertung der Daten

4.3.6.1. Stromaufzeichnung

Die Aufzeichnung der GABA-induzierten Ströme erfolgte durch einen Computerkontrollierten Axopatch 200B Patch-Clamp-Verstärker mittels pClamp 6.0 Software. Die Digitalisierungsrate betrug 10 kHz (Digidata 1200 A/D Converter). Die Tiefpass-Eckfrequenz betrug 2 kHz. Die Ströme wurden auf einer Festplatte gespeichert und anschließend mit AxoGraph 3 Software ausgewertet. Die Messgrößen (s. u.) wurden mit Hilfe von Detektionsalgorithmen computergestützt ermittelt.

4.3.6.2. Messgrößen

Die gemessenen Stromantworten werden als Strom-Zeit-Diagramme aufgezeichnet, die verschiedene Informationen beinhalten. Bei deren Analyse können verschiedene Parameter bestimmt werden (siehe Abb. 4.4).

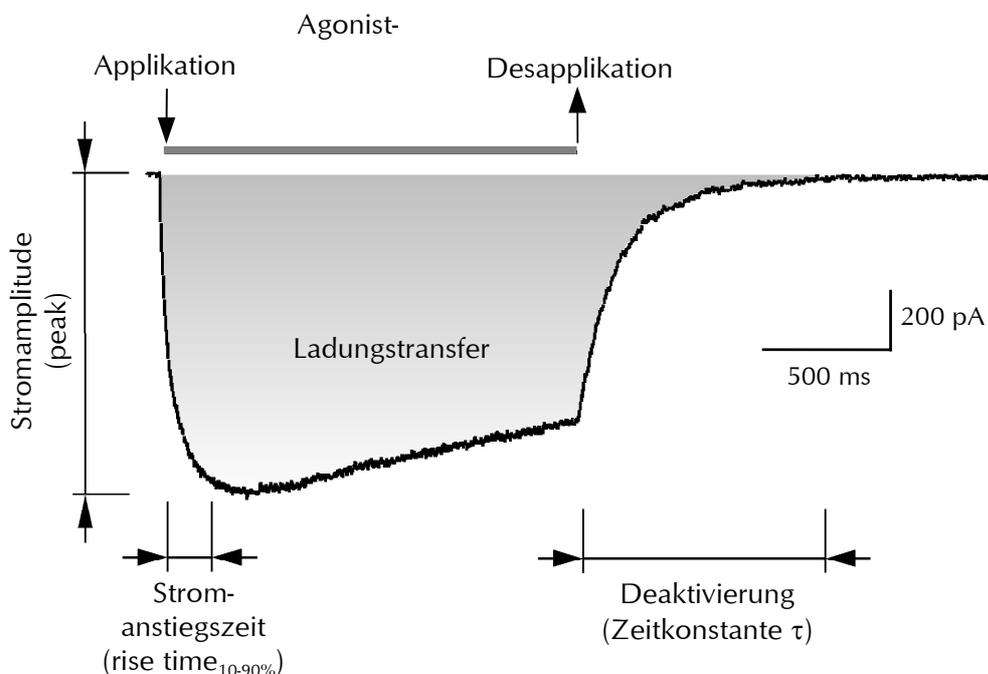


Abb. 4.4: Die Messgrößen Stromamplitude, Stromanstiegszeit, Deaktivierungskonstante und Ladungstransfer (grauer Bereich) am Beispiel einer GABA-Antwort.

Maximale Stromamplitude (peak):

Erfassung als Absolutwert in der Einheit der Stromgröße (meist pA) oder als Relativwert innerhalb einer Messreihe, normalisiert auf die Stromamplitude der Kontrollmessung.

Stromanstiegszeit_{10-90%} (rise time_{10-90%}):

Das Zeitintervall zwischen Erreichen des 10%-Wertes und des 90%-Wertes der maximalen Stromamplitude ist ein übliches Maß zur Beschreibung der Aktivierungskinetik eines Ionenkanals, die u. a. von der Agonisten-Affinität bestimmt wird. Aus der Stromanstiegszeit läßt sich deshalb die Assoziationskonstante für die Agonistenbindung K_{on} abschätzen. Die genaue Messung der Stromanstiegszeit setzt allerdings eine schnelle Transmitterapplikation, wie sie mit dem verwendeten piezobetriebenen System (siehe 4.3.4, S. 33) erreicht wird, voraus.

Deaktivierungszeitkonstante τ :

Der Stromabfall nach Agonistendesapplikation wird als Deaktivierung bezeichnet und wird üblicherweise mit einer Zeitkonstante τ (in ms) beschrieben. Mit Hilfe dieser Zeitkonstante läßt sich die GABA-Dissoziationskonstante K_{off} abschätzen. Die Berechnung der Zeitkonstante τ erfolgt computergestützt. Hierbei wird mit Iterationsverfahren eine idealisierte, auf einer Exponentialfunktion basierende Kurve so lange an die gemessene Stromkurve angenähert, bis die quadrierten Differenzen, d. h. die durchschnittlichen Abweichungen zwischen gemessener und berechneter Kurve möglichst klein sind (Fahrmeir, 1997). Ausgehend von einem exponentiellen Abfall des Stroms in der Zeit gemäß der Gleichung

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

ist τ die Zeit, bei der gilt

$$I(\tau) = I_0 \cdot \frac{1}{e}$$

Dabei ist I_0 die maximale Stromamplitude und e die Basis des natürlichen Logarithmus ($\approx 2,718$; Eulersche Zahl).

Neben der monoexponentiellen Beschreibung des Deaktivierungsverlaufes kann auch ein biexponentieller Verlauf mit zwei Zeitkonstanten vorliegen.

Die Verwendung dieser Deaktivierungszeitkonstante im Sinne eines Rezeptor-Kanal-abhängigen Parameters setzt allerdings ein schnelles System für den Lösungswechsel voraus. Bei einer zu langsamen Desapplikation des Agonisten wäre der Parameter falsch hoch.

Ladungstransfer:

Ladungstransfer beschreibt den Ionenstrom, der über die Zeit geflossen ist. Er entspricht der Fläche unter dem Strom-Zeit-Diagramm. Entsprechend ist die Einheit pAs.

Bei der synaptischen Übertragung ist die Transmitter-induzierte transmembranäre Ladungsverschiebung von großer Bedeutung, da sie das Polarisationsniveau des postsynaptischen Neurons kurzzeitig moduliert. Am GABA_A-Rezeptor induziert GABA eine Ladungsverschiebung in Form eines Chloridionen-Einstroms. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons.

4.3.6.3. Statistische Auswertung

Die Daten sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikanzberechnungen erfolgten mittels Student t-Test für verbundene Stichproben. Signifikanz wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ angenommen. Der Student t-Test setzt eine Normalverteilung der Zielwerte voraus. Ein Vorliegen von normalverteilten Werten wurde mit SigmaStat-Software geprüft.

4.4. Computersimulationen der GABA_A-Rezeptor-Kinetik

Für die Computersimulationen wurde eine spezielle Software „Bioq – Modeling Biochemical Reactions“, Version 2.0 (Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University, Jerusalem, Israel) verwendet, die auf Berechnung von Differentialgleichungssystemen beruht. Der Anwender kann hierbei ein kinetisches Reaktionsschema für den Ionenkanal (siehe 2.1.4, S. 7) aufstellen und Ratenkonstanten für die einzelnen Hin- bzw. Rückreaktionen einsetzen. Die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Zustände (offen, geschlossen) im Zeitverlauf werden von der Software berechnet und dargestellt. Der Verlauf der Offenzustände ist demnach als simulierter Ionenstrom zu verstehen. Zeigt sich unter Verwendung eines stimmigen Reaktionsschemas in Verbindung mit passenden Raten eine gute Übereinstimmung des simulierten mit dem gemessenen Ionenstrom (hinsichtlich Dosis-Wirkungs-Beziehung für Stromamplitude, Stromantiegszeit, etc.), kann das entworfene Reaktionsschema als kinetisches Modell für den untersuchten Ionenkanal angesehen werden.

5. Ergebnisse

5.1. Charakterisierung des exprimierten GABA_A-Rezeptors

5.1.1. GABA-Dosiswirkungskurve

Die transfizierten HEK 293-Zellen exprimierten einen funktionellen $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor. Die GABA-induzierten Ströme wurden in der Ganzzell-Konfiguration aufgenommen. Die Stromantworten nahmen mit steigenden GABA-Konzentrationen zu (Abb. 5.1, A). Wie in früheren Arbeiten mit demselben Rezeptortyp und unter Verwendung desselben Expressionssystems (Jahn, 1997) war hierbei die GABA-Konzentration von 10^{-3} M sättigend, d. h. diese Konzentration entspricht der EC₁₀₀ hinsichtlich der Kanalaktivierung. Im Mittel entsprachen 10^{-7} M GABA einer EC₁, 10^{-6} M einer EC_{6±1}, 5×10^{-6} M einer EC_{37±3}, 10^{-5} M einer EC_{43±4} und 10^{-4} M GABA einer EC_{77±6} (Abb. 5.1, B).

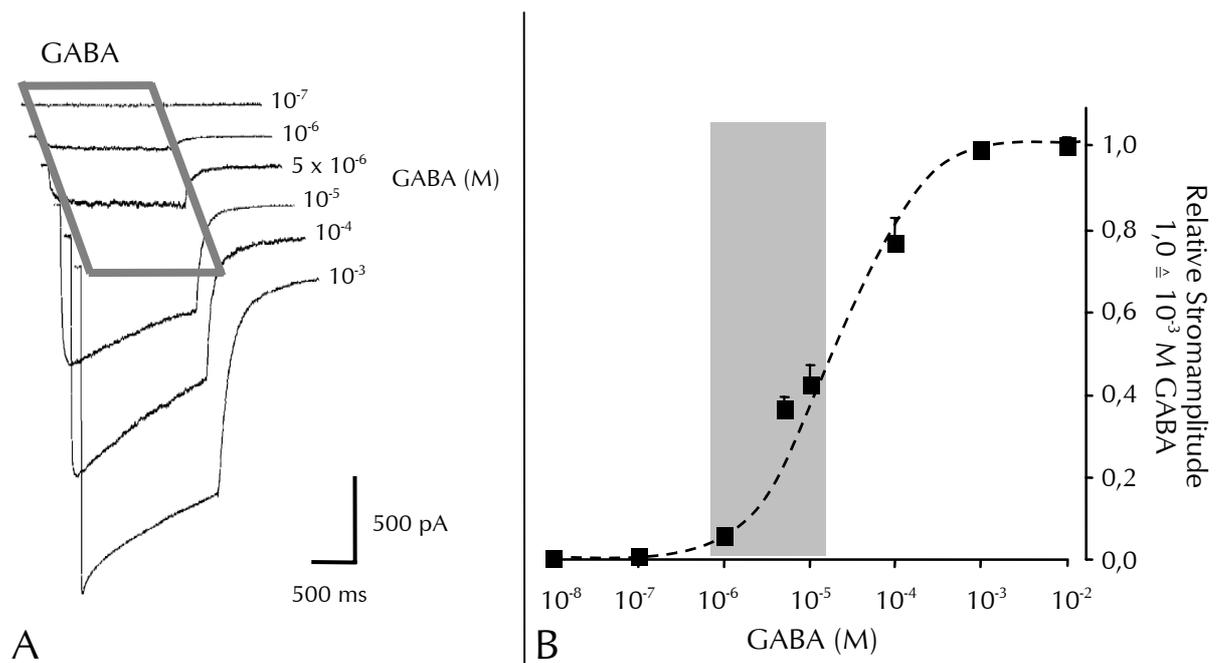


Abb. 5.1: GABA-Antworten von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptoren (Whole-Cell-Modus). **A:** Stromantworten einer Zelle auf Applikation steigender GABA-Konzentrationen. Jede der dargestellten Stromspuren wurde aus mindestens drei stabilen Einzelepisoden gemittelt. **B:** Dosiswirkungskurve. Der grau markierte Bereich stellt den GABA-Konzentrationsbereich dar, in dem einige der nachfolgend beschriebenen Experimente durchgeführt wurden. Jeweils Angabe von MW \pm SEM, n = 11-40.

Der Hill-Koeffizient dieser GABA-Dosiswirkungskurve erlaubt eine Abschätzung darüber, wieviele GABA-Moleküle an einen Rezeptor binden müssen, damit sich der Ionenkanal öffnet. Hierfür wird der berechnete Hill-Koeffizient ($2,4 \pm 0,2$, $n = 5$; vgl. $2,2 \pm 0,4$ nach Jahn, 1997) ganzzahlig aufgerundet. Daraus ergibt sich, dass mindestens drei GABA-Moleküle zur Kanalöffnung binden müssen. Diese Abschätzung wurde den Reaktionsschemata für die Computersimulationen (s. u.) zugrunde gelegt.

Übereinstimmend mit dem Equilibriumpotential für Cl-Ionen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen fand die Umkehr der Stromantworten bei einem Haltepotential von 0 mV statt (ohne Abbildung). Die Wirkung gasförmiger und volatiler Anästhetika wurde überwiegend bei GABA-Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-5} M (graue Markierung in Abb. 5.1, B) untersucht, da sich hier (im steilen Bereich der Dosiswirkungskurve) in den Vorversuchen die deutlichsten Effekte zeigten.

5.1.2. Hemmung durch Bicucullin und Picrotoxin

Bicucullin ist ein kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor (Krogsgaard-Larsen, 1996). Picrotoxin ist ein nicht-kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor, wobei die Bindung im Kanallumen (Gurley, 1995) des geöffneten Kanals erfolgt (Inoue, 1988).

Die genannten Antagonisten (jeweils 1 mM) wurden in der unten dargestellten Weise appliziert. Abb. 5.2, A & B zeigt jeweils ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten. Jede Messung wurde mit einer Kontrollmessung mit 10^{-3} M GABA begonnen (Abb. 5.2, A & B, i). Im Gegensatz zu Bicucullin löste Picrotoxin bei Desapplikation einen sog. Wiederöffnungsstrom aus (Abb. 5.2, A & B, ii, grau markierter Bereich). Solche Wiederöffnungsströme entstehen typischerweise als Umkehrung eines Offenkanalblock-Mechanismus (Dilger, 1992b).

Unter längerdauernder (3 min) Applikation von Bicucullin (Abb. 5.2, A, iii) induzierte GABA einen Strom mit niedriger Amplitude und langsamer Anstiegszeit (455 ± 62 ms). Derselbe Applikationsmodus mit Picrotoxin ergab eine fast vollständige Hemmung der GABA-Antwort (Abb. 5.2, B, iii). Bei Unterbrechung der Bicucullin- bzw. Picrotoxin-Applikation (Abb. 5.2, A bzw. B, iv) durch den GABA-Puls zeigten sich Ströme mit schneller Anstiegszeit (24 ± 2 ms) und langsamer Deaktivierung bzw. mit langsamer Anstiegszeit (200 ± 84 ms) und schneller Deaktivierung. Hier sieht man auch deutlich, dass ein kompetitiver Antagonist (Bicucullin) die Deaktivierung (grau unterlegt, vgl. Kontrolle, i), also die Kanalschließungen, nicht beeinflusst. Der Kanalblocker Picrotoxin

hingegen beschleunigte die Deaktivierung (grau, vgl. Kontrolle, i), da er die noch offenen Kanäle blockiert, bevor sie von selbst schließen würden.

Die Antagonisten alleine induzierten keine Stromantwort am $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ -GABA_A-Rezeptor (ohne Abbildung). Das Lösemittel DMSO (für die Bicucullin- bzw. Picrotoxin-Stamm-lösung, 100 mM) beeinflusste die GABA-induzierten Ströme nicht (ohne Abbildung).

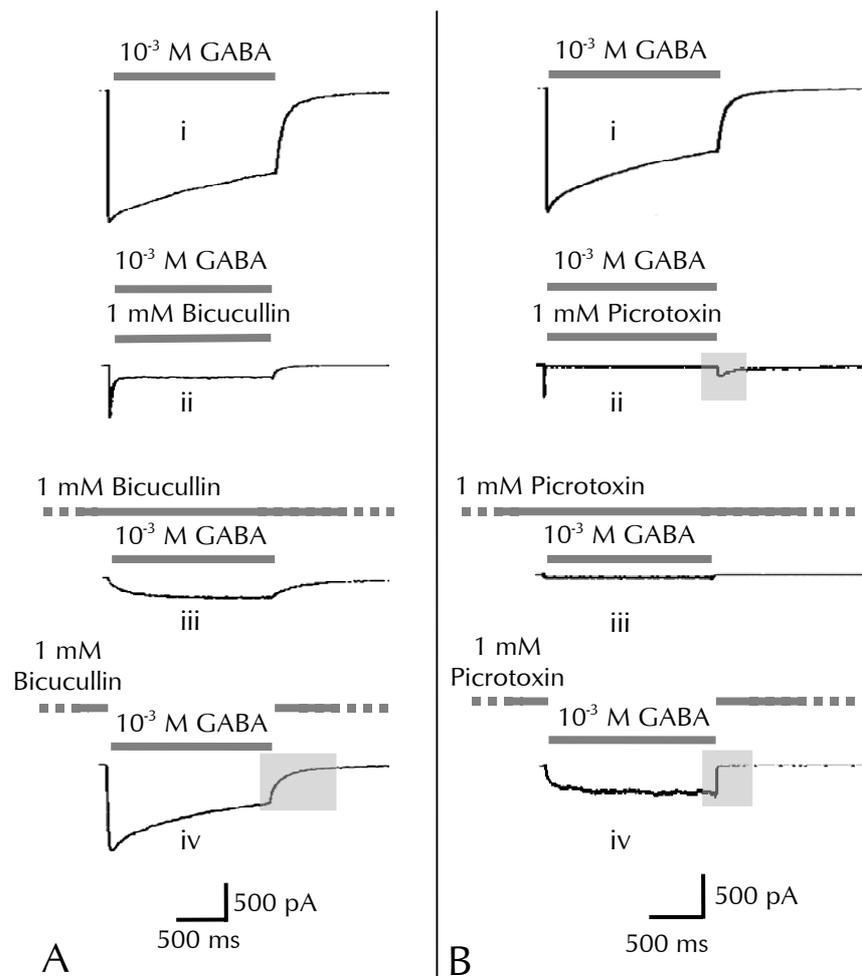


Abb. 5.2: Vergleich der Wirkung von Bicucullin (**A**, kompetitiver Antagonist) bzw. Picrotoxin (**B**, nicht-kompetitiver Antagonist) auf GABA-induzierte Chloridströme am rekombinant trans-fizierten $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ -GABA_A-Rezeptor.

5.2. Der Effekt gasförmiger Anästhetika auf GABA-induzierte Stromantworten

5.2.1. Die Löslichkeit von N₂O und Xenon in Extrazellulärlösung

Um die Wirkung der gasförmigen Anästhetika N₂O und Xe messen zu können, müssen diese Gase zuerst in Extrazellulärlösung gelöst werden. Die Löslichkeit sowie der Zeitverlauf des Lösevorgangs wurde mittels volumetrischer Gaslöslichkeitsmessung in Flüssigkeiten bestimmt (nach Krauss, 1977, modifiziert von Dr. Karl-Heinz Meister, Linde AG; Abb. 5.3, A & B). Bei diesem Verfahren wird ein Gefäß, das über einen Ventilmechanismus mit der Flüssigkeit (hier: Extrazellulärlösung) in Verbindung steht, mit dem zu untersuchenden Gas gefüllt. Mit Einsetzen des Lösevorgangs (Ventilöffnung) verringert sich das Gasvolumen und damit der Druck im Gefäß proportional zur sich lösenden Gasmenge. Ein weiteres Ventil, das durch einen hochsensiblen Drucksensor im Gefäß gesteuert wird, führt dann solange Gas zu, bis der Ausgangsdruck wieder erreicht ist. Dabei wird das Volumen des zugeführten Gases gegen die Zeit aufgetragen. Es entspricht dem Volumen des in Lösung gegangenen Gases (Krauss, 1977).

Unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei den elektrophysiologischen Experimenten herrschen (siehe 4.3.5.4, S. 35), wurde eine Sättigung der Extrazellulärlösung (> 95%) mit N₂O nach $2,5 \pm 0,3$ min, mit Xe nach $3,1 \pm 0,3$ min erreicht (Abb. 5.3, C). Die maximale Löslichkeit von N₂O in Extrazellulärlösung betrug $0,654 \pm 0,01$, die von Xe $0,088 \pm 0,005$ (ml/ml). Daraus berechnet sich eine N₂O- bzw. Xe-Konzentration in der gasgesättigten Lösung von $29,2 \pm 0,4$ mM bzw. $3,9 \pm 0,2$ mM. Bei RaumlufTEXposition trat innerhalb 2 min keine wesentliche Entsättigung auf (ohne Abbildung).

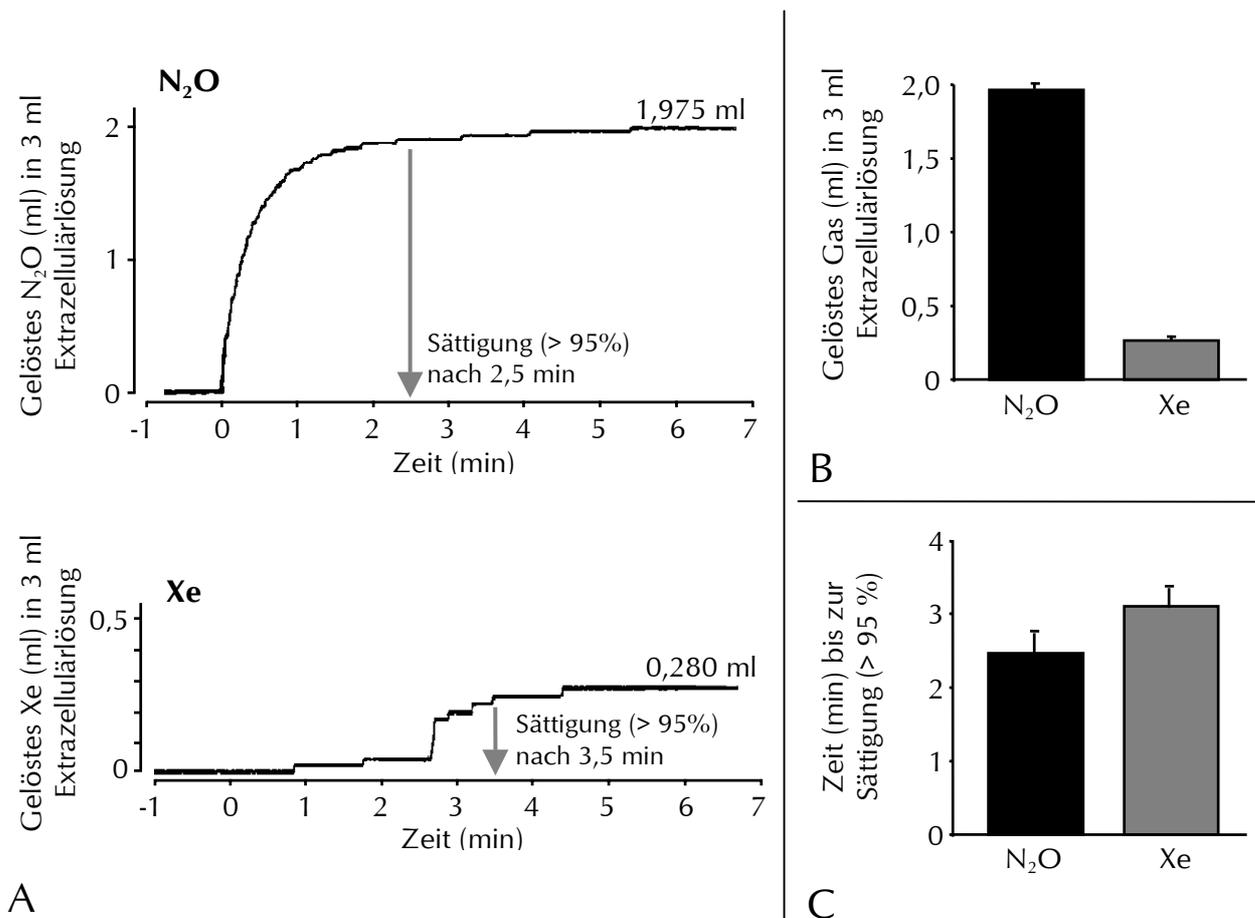


Abb. 5.3: Der Lösevorgang von N₂O und Xe in Extrazellulärlösung im Zeitverlauf. Bestimmung mittels volumetrischer Gaslöslichkeitsmessung in Flüssigkeiten. **A:** Zeitverlauf der Lösung des jeweilige Gases. Der Lösevorgang wurde zum Zeitpunkt 0 gestartet (Ventilöffnung). In den dargestellten Beispielen lösten sich 1,975 ml N₂O (0,28 ml Xe) in 3 ml Extrazellulärlösung. Sättigung (> 95%) stellte sich bei N₂O bereits nach 2,5 min, bei Xe nach 3,5 min ein. **B:** Die mittlere maximale Löslichkeit in 3 ml Extrazellulärlösung betrug bei N₂O $1,96 \pm 0,03$ ml ($n = 3$), bei Xe $0,26 \pm 0,01$ ml ($n = 4$). **C:** Sättigung (> 95%) war im Mittel bei N₂O nach $2,5 \pm 0,3$ min ($n = 3$), bei Xe nach $3,1 \pm 0,3$ min ($n = 4$) erreicht.

Veröffentlichte Löslichkeitskoeffizienten (ml/ml) in H₂O betragen im Vergleich dazu 0,6788 für N₂O und 0,1178 für Xe (Wilhelm, 1977). An anderer Stelle wurde eine Sättigung von Extrazellulärlösung mit N₂O nach 2 min beschrieben (Dzoljic, 1998).

Die MAC-Werte (Definition siehe 2.3.1, S. 19) betragen für N₂O 1,04 atm (Hornbein, 1982), für Xe 0,71 atm (Cullen, 1969). Damit liegen die mit Löslichkeitskoeffizienten bei 37° C (Wilhelm, 1977) errechneten MAC-Äquivalente für gelöstes N₂O etwa bei 20,6 mM, für gelöstes Xe bei 2,9 mM.

5.2.2. Verstärkung GABA-induzierter Ströme durch die Immobilizer N₂O und Xenon

Abb. 5.4, A zeigt exemplarisch den Effekt von N₂O auf GABA-induzierte Ströme einer Zelle. Die Applikation von 10⁻⁵ M GABA (\triangleq EC_{43±4}) induzierte einen Strom von -219 pA mit einer Anstiegszeit von 203 ms. Unter Anwesenheit von N₂O erhöhte sich die Stromamplitude auf -367 pA bei einer gleichzeitig verkürzten Stromanstiegszeit von 133 ms. Nach dem Auswasch von N₂O ging die Stromamplitude wieder auf -249 pA und die Anstiegszeit auf 183 ms zurück.

Abb. 5.4, B zeigt den sehr ähnlichen Effekt von Xe. In dem dargestellten Experiment induzierte GABA (10⁻⁶ M \triangleq EC_{6±1}) einen Strom von -95 pA (Stromanstiegszeit: 174 ms), Xe erhöhte den Strom auf -133 pA (Stromanstiegszeit verkürzt auf 137 ms). Nach dem Auswasch von Xe stellten sich annähernd die Ausgangswerte wieder ein (Amplitude: 97 pA, Stromanstiegszeit: 190 ms).

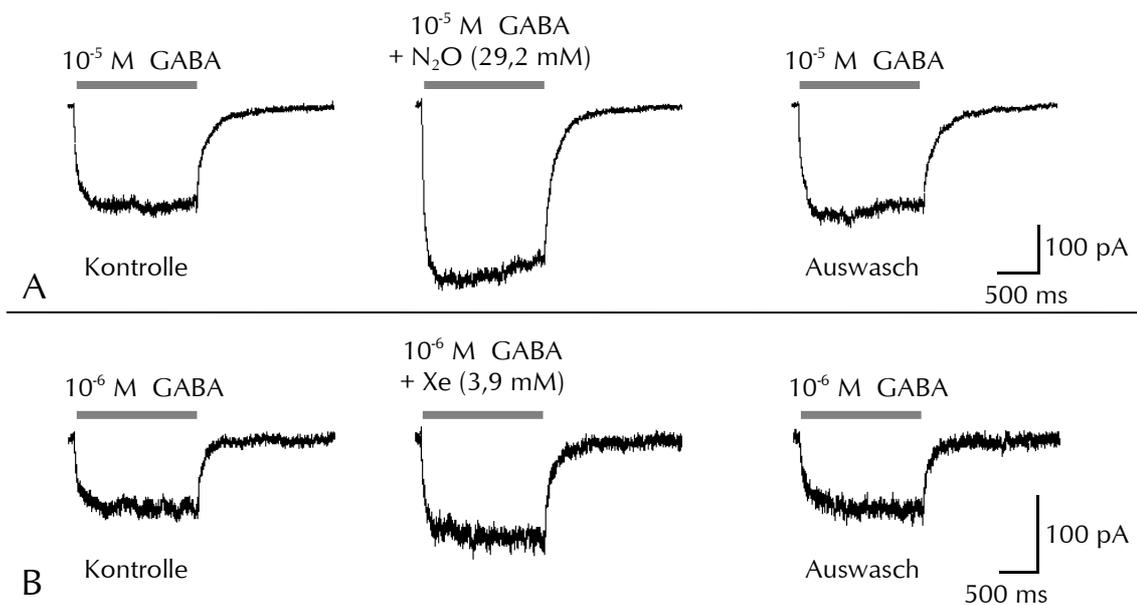


Abb. 5.4: GABA-induzierte Ströme am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor. Reversible Verstärkung der GABA-induzierten Stromantworten durch N₂O (A) bzw. Xe (B) an jeweils derselben Zelle.

In einer nachfolgenden Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit N_2O bzw. Xe die Dosiswirkungskurve von GABA am untersuchten $GABA_A$ -Rezeptor beeinflussen. Dazu wurde GABA in Konzentrationen von 10^{-7} M bis 10^{-3} M jeweils alleine sowie zusammen mit N_2O (29,2 mM) bzw. Xe (3,9 mM) appliziert. Hierbei erhöhten sowohl N_2O als auch Xe im Bereich niedrigerer GABA-Konzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-5} M) die Stromamplitude signifikant (Abb. 5.5, A und C). Gleichzeitig beschleunigten N_2O und Xe den Stromanstieg (Abb. 5.5, B und D). Dies spricht für eine Erhöhung der GABA-Assoziationskonstante K_{on} innerhalb des kinetischen Reaktionsschemas (siehe 2.1.4, S. 7).

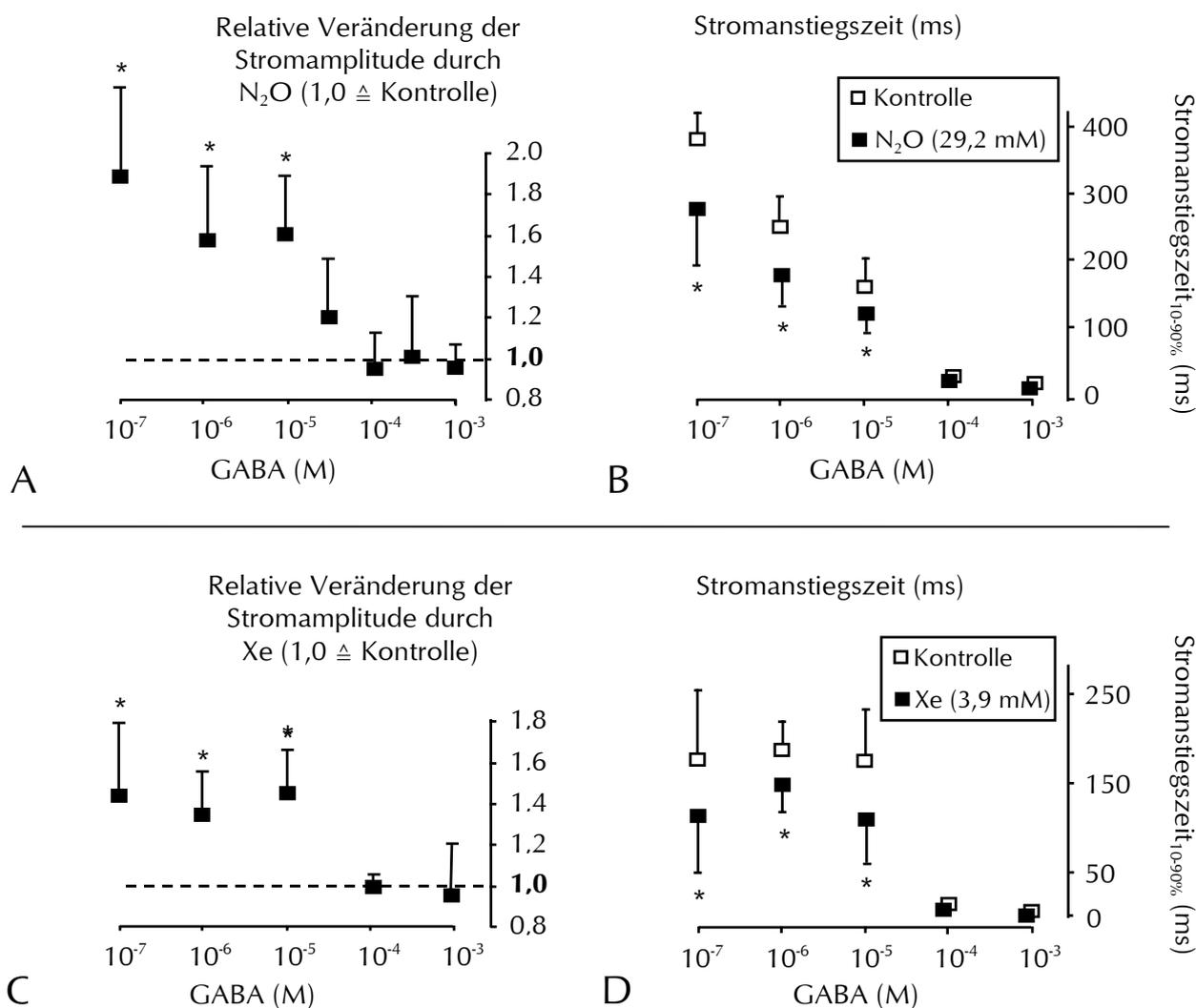


Abb. 5.5: Die Wirkung von N_2O (A & B) und Xe (C & D) auf Amplitude und Anstiegszeit der GABA-induzierten Ströme am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ - $GABA_A$ -Rezeptor. Die Vergrößerung der Ströme bei niedrigen GABA-Konzentrationen (\triangleq Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve) bei gleichzeitiger Verkürzung der Stromanstiegszeiten sprechen für eine Erhöhung der GABA-Assoziationskonstante. (Jeweils Angabe von MW \pm SD, $n = 5-9$, * $p < 0,05$ versus Kontrolle.)

Die Applikation von mit N₂O bzw. Xe gesättigter Extrazellulärlösung (ohne GABA) induzierte keine Stromantwort am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor (ohne Abbildung).

5.2.3. Kein Effekt durch den Non-Immobilizer Helium

Das Edelgas He ist nicht anästhetisch wirksam und wird deshalb in diesem Zusammenhang auch als *Non-Immobilizer* bezeichnet (Koblin, 1998). Daher sollte untersucht werden, ob diese Eigenschaft auch mit einem Ausbleiben einer Wirkung am GABA_A-Rezeptor einhergeht. Hierzu wurde eine GABA-Lösung (10⁻⁵ M) – wie in den Experimenten mit N₂O und Xe – mit He gesättigt und appliziert. Weder Amplitude (1,02 ± 0,1 versus Kontrolle, n = 6) noch Anstiegszeit der GABA-induzierten Ströme (Kontrolle: 118 ± 69 ms, He: 107 ± 64 ms; n = 6) wurden durch He signifikant verändert (siehe Abb. 5.6). Dies zeigt auch, dass die unter Anwendung von N₂O und Xe beobachtete Verstärkung der GABA-Ströme tatsächlich auf eine Eigenschaft von N₂O bzw. Xe zurückzuführen ist und nicht als Artefakt des methodischen Vorgehens zu werten ist.

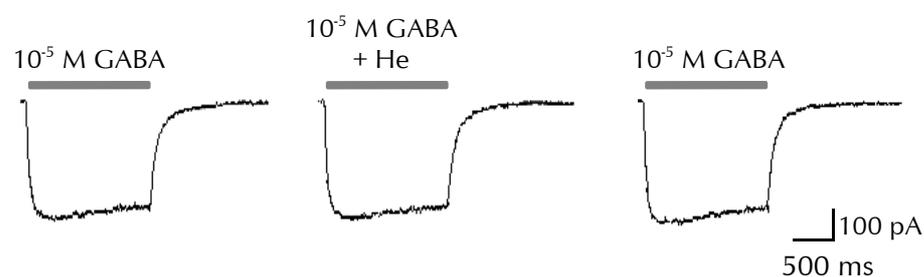


Abb. 5.6: He zeigte keinen Effekt auf GABA-induzierte Ströme am GABA_A-Rezeptor (exemplarische Messreihe an einer Zelle).

5.3. Der Effekt von Isofluran auf die Funktion des GABA_A-Rezeptors

5.3.1. Isofluran hat zwei gegensätzliche Wirkungen

Mehrere Arbeiten beschreiben eine Verstärkung GABA-induzierter Ströme durch ISO und führen u. a. darauf die klinische Wirkung dieses Anästhetikums zurück (siehe 2.3.4.2, S. 21). In der vorliegenden Arbeit soll insbesondere der zugrundeliegende Mechanismus untersucht und die Interaktion zwischen dem GABA_A-Rezeptor und ISO beschrieben werden. ISO wurde zunächst in einer Konzentrationsreihe zusammen mit GABA (10^{-5} M \triangleq EC_{43 \pm 4}) appliziert, um die ISO-Konzentration mit dem deutlichsten Verstärkungseffekt an dem hier untersuchten $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor zu ermitteln, da ISO je nach Konzentration zwei gegensätzliche Wirkungen hatte: Niedrige ISO-Konzentrationen (0,15 bis 0,5 mM) verstärkten den GABA-Strom (maximale Verstärkung $1,84 \pm 0,75$ -fach durch 0,5 mM ISO), höhere ISO-Konzentrationen (> 1,5 mM) verminderten hingegen den Strom (Abb. 5.7, A und B).

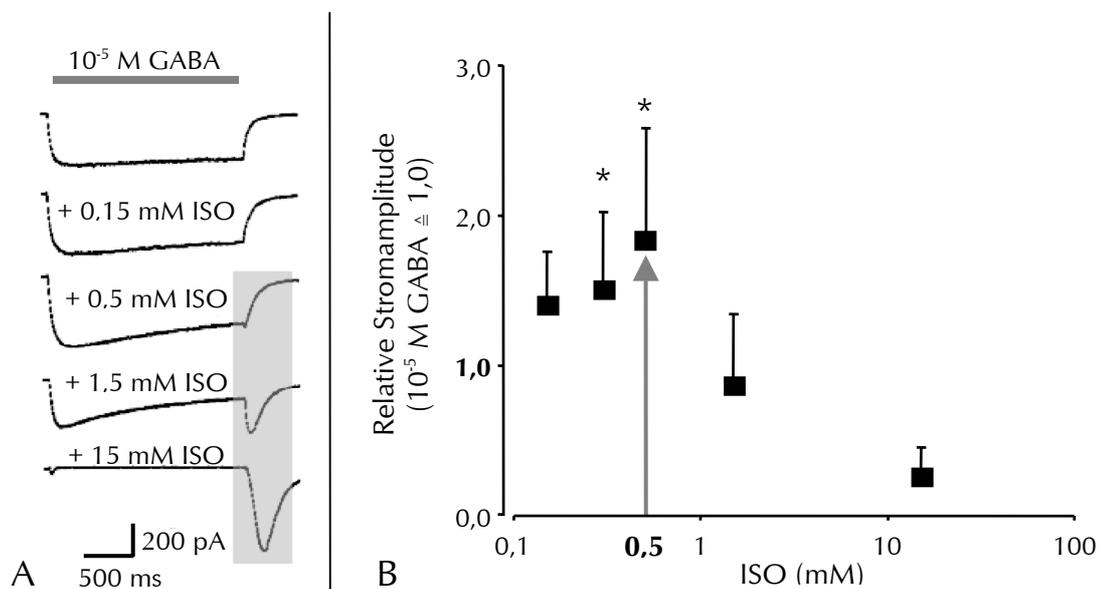


Abb. 5.7: Dualer Effekt von ISO auf die Stromantworten des $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptors. **A:** Stromantworten einer Whole-Cell-Messung. Die ab 0,5 mM ISO auftretenden sog. Wiederöffnungsströme (grau markiert) entstehen durch die Lösung eines Offenkanalblocks, der gleichzeitig die verkleinerten Ströme bei höheren ISO-Konzentrationen erklärt. **B:** Der maximale Verstärkungseffekt zeigte sich bei 0,5 mM ISO, was zugleich dem berechneten MAC-Äquivalent für ISO entspricht. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem MAC-Äquivalent und dem maximalen Verstärkungseffekt in den dargestellten Befunden muß allerdings nicht bestehen und kann zufällig sein. Zudem gibt es keine zuverlässigen Angaben über tatsächliche Wirkstoffkonzentrationen im synaptischen Spalt. (Jeweils Angabe von MW \pm SD, $n = 4-6$, * $p < 0,05$ versus Kontrolle.)

Ab 0,5 mM ISO zeigten sich bei der schnellen Desapplikation von ISO die sog. Wiederöffnungsströme (grau markiert in Abb. 5.7, A), die auf den Offenkanalblock durch ISO hinweisen.

5.3.2. Der verstärkende Effekt von Isofluran

In dieser Versuchsreihe wurde auf den Verstärkungseffekt von ISO näher eingegangen. Dazu wurde ISO zusammen mit steigenden GABA-Konzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-3} M) appliziert. Für ISO wurde eine Konzentration gewählt, bei der in der vorherigen Versuchsreihe der deutlichste Verstärkungseffekt festgestellt wurde. Abb. 5.8, A zeigt die Stromantworten einer Zelle auf 10^{-6} M GABA ohne und mit 0,6 mM ISO, Abb. 5.8, B und C zeigt die gemittelten Daten aus 9 Experimenten.

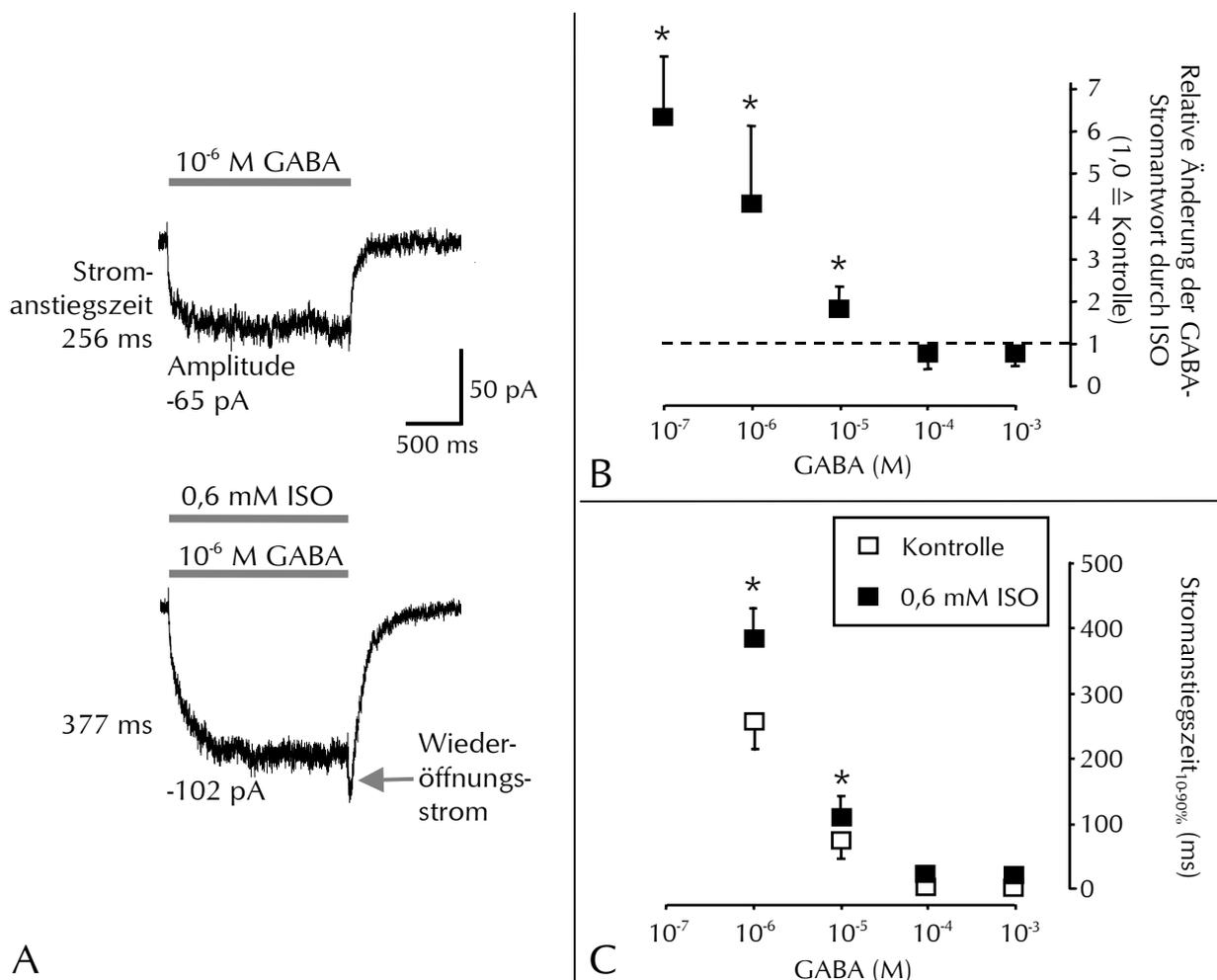


Abb. 5.8: Wirkung von ISO (0,6 mM) auf GABA-induzierte Ströme. **A:** Stromantworten einer Zelle auf 10^{-6} M GABA. ISO vergrößerte die Stromamplitude und verlängerte gleichzeitig die Stromanstiegszeit. Dies spricht für eine Verminderung der Dissoziationskonstante des Agonisten vom Rezeptor. **B:** Bei niedrigen GABA-Konzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-5} M) erhöhte ISO signifikant die Stromamplitude. Dies entspricht einer Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve. **C:** Verlängerung der Stromanstiegszeiten durch ISO. (Jeweils Angabe von MW \pm SEM, $n = 9$, $*p < 0,05$ versus Kontrolle.)

ISO (0,6 mM) vergrößerte die Stromantworten auf niedrige GABA-Konzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-5} M), was einer Linksverschiebung der GABA-Dosiswirkungskurve, also einer erhöhten Wirksamkeit von GABA am Rezeptor, entspricht (Abb. 5.8, B). Insoweit ähneln sich N_2O , Xe und ISO in ihrer Wirkung auf den hier untersuchten $GABA_A$ -Rezeptor. Nach den vorliegenden Befunden entsteht diese erhöhte Wirksamkeit von GABA jedoch auf unterschiedliche Weise. Die gasförmigen Anästhetika N_2O und Xe verkürzten die Stromanstiegszeit_{10-90%} (siehe Abb. 5.5, B & D). Dies spricht für eine vergrößerte GABA-Assoziationskonstante, der z. B. eine erleichterte GABA-Bindung zugrunde liegen könnte. Demgegenüber verlängerte ISO die Stromanstiegszeit_{10-90%} (Abb. 5.8, C). Anhand des Reaktionsschemas läßt sich dies mit einer verminderten GABA-Dissoziationskonstanten nachvollziehen. Die Wirkung von ISO könnte also in einer verlangsamten Dissoziation von GABA vom Rezeptor bestehen.

5.3.3. Isofluran bewirkt zusätzlich einen Offenkanalblock

Neben dem oben beschriebenen Verstärkungseffekt fiel auf, dass die Desapplikation von ISO zu einem kurzzeitigen Wiederanstieg der Stromantwort führte. Da solche Ströme typischerweise durch die Lösung eines sog. Offenkanalblocks, also einer Blockade des geöffneten Ionenkanals, entstehen, kann man sie als „Wiederöffnungsströme“ bezeichnen. Diese Wiederöffnungsströme traten bereits bei einer ISO-Konzentration von 0,5 mM auf und vergrößerten sich deutlich mit steigenden Konzentrationen (siehe Abb. 5.7, A). In der folgenden Versuchsreihe wurden deshalb die Wiederöffnungsströme bei höheren ISO-Konzentrationen näher untersucht. Dazu wurde GABA in ansteigenden Konzentrationen (10^{-9} M bis 10^{-3} M) zusammen mit ISO (1,5 mM bzw. 15 mM) appliziert. Abb. 5.9, A zeigt eine Messreihe mit 15 mM ISO. Hierbei nahm die Amplitude der Wiederöffnungsströme asymptotisch zu. Eine solche Zunahme zeigte sich auch bei 1,5 mM ISO, allerdings mit einem niedrigeren Maximalwert (Abb. 5.9, B). Dieser Befund verdeutlicht, dass zur Entstehung der Wiederöffnungsströme die GABA-Kanäle erst durch GABA geöffnet werden müssen, um dann von ISO blockiert werden zu können. Die Aktivierung der GABA-Kanäle im Sinne eines Ionenflusses zeigt sich dann überwiegend erst nach Lösung des Offenkanalblocks in Form des Wiederöffnungsstroms.

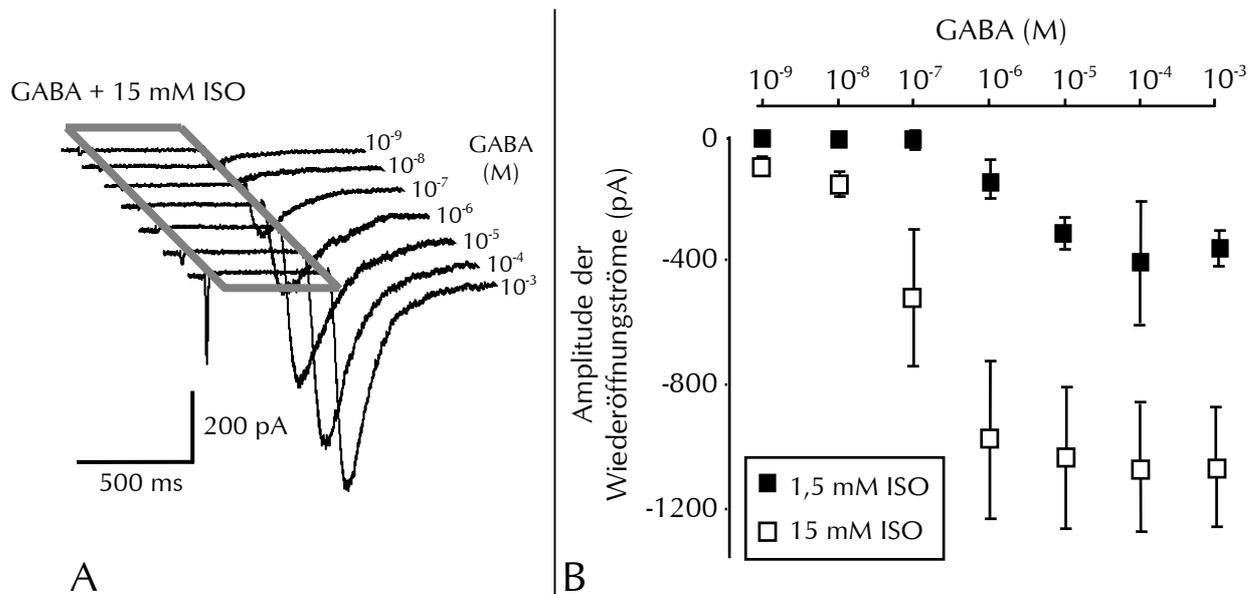


Abb. 5.9: Die Größe der Wiederöffnungsströme hängt von der GABA- und der ISO-Konzentration ab. **A:** Ströme einer Whole-Cell-Messung mit 15 mM ISO: Mit steigender GABA-Konzentration (10^9 M bis 10^3 M) nahm die Amplitude der Wiederöffnungsströme asymptotisch zu. **B:** Messungen mit 1,5 mM und 15 mM ISO. (Angabe von MW \pm SEM, $n = 4$.)

Zur weiteren Beschreibung des Offenkanalblocks wurde der Effekt von ISO mit dem von Picrotoxin verglichen, da es sich bei diesem Krampfgift nachweislich um einen Offenkanalblocker des GABA_A-Rezeptors handelt (Inoue, 1988; Gurley, 1995). Dazu wurden die GABA-induzierten Ströme mit ISO (15 mM) bzw. mit Picrotoxin (1 mM) blockiert. Eine gleichzeitige Applikation von GABA (10^{-3} M) und ISO bzw. Picrotoxin für 1,5 s erzeugte eine schnelle Stromantwort mit einem anfänglichen kurzen Peak, einem raschen Stromabfall auf das Ausgangsniveau und schließlich einem (v. a. bei ISO) deutlichen Wiederöffnungsstrom (grau markiert) nach Applikationsende (Abb. 5.10, i). Unter durchgehender Applikation von ISO bzw. Picrotoxin für mehrere Minuten kam es zu keiner nennenswerten Kanal-Aktivierung durch GABA (Abb. 5.10, ii). Dieser Befund steht zwar nicht voll im Einklang mit einem reinen Offenkanalblock-Mechanismus, da GABA wie in (Abb. 5.10, i) einen initialen Strompeak induzieren hätte müssen, kann aber damit erklärt werden, dass in den Minuten vor der GABA-Applikation spontanöffnende Kanäle zunehmend blockiert wurden. Wiederöffnungsströme blieben naturgemäß aus, da bei diesem Experiment keine Desapplikation von ISO bzw. Picrotoxin stattfand. Wurde hingegen die verlängerte Applikation von ISO/Picrotoxin durch den GABA-Puls unterbrochen (Abb. 5.10, iii), kam es im Zuge der Dissoziation der Blocker zu einem deutlichen Strom mit einem relativ langsamen Stromanstieg (grau markiert). Unter

Abwesenheit der Blocker während der GABA-Applikation nahm der Strom nicht (nennenswert) ab. Die erneute ISO/Picrotoxin-Applikation nach dem GABA-Puls beschleunigte hingegen deutlich die Kanal-Deaktivierung (grau markiert), was sich wiederum durch den Kanalblock erklären lässt. Insgesamt sprechen diese Befunde für einen sehr ähnlichen Mechanismus von ISO und Picrotoxin an dem hier untersuchten $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor.

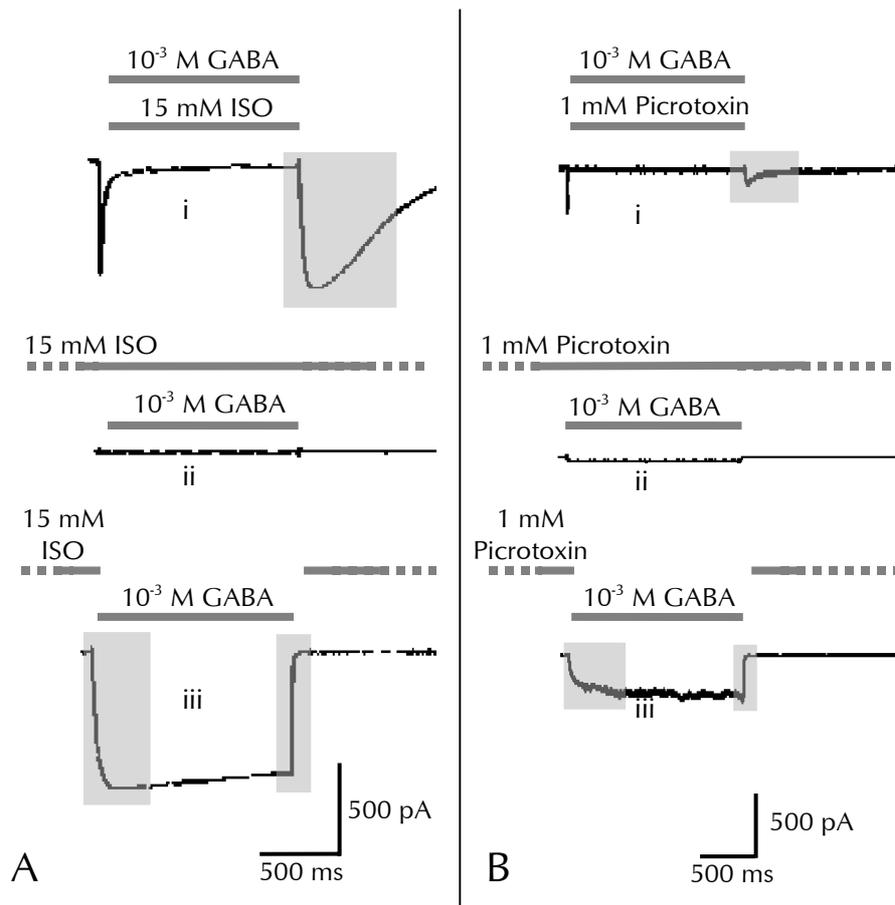


Abb. 5.10: Vergleich des Effekts von ISO (**A**) und Picrotoxin (**B**) auf GABA-induzierte Ströme. Hierbei wurde die zeitliche Abfolge der Applikation von GABA und ISO bzw. Picrotoxin entsprechend der schematischen Darstellung variiert (i-iii). Die qualitativ ähnlichen Befunde sprechen für einen ähnlichen Blockmechanismus am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor. Es ist jeweils ein repräsentatives von insgesamt jeweils drei durchgeführten Experimenten dargestellt.

5.3.4. Modell für GABA_A-vermittelte IPSC und der Effekt von Isofluran

Durch kurze (10 ms) Applikation von GABA in synaptisch relevanter Konzentration (10^{-4} M) wurden Stromantworten induziert, die in ihrer Kinetik GABA_A-vermittelten IPSC entsprachen (Jones, 1995). Diese Stromantworten können somit als Modell für postsynaptische GABA_A-Antworten angesehen werden.

Der Zeitverlauf dieser „IPSC-artigen“ GABA_A-Antworten ist durch den typischerweise biphasischen Stromabfall, der durch die Deaktivierung (siehe 4.3.6.2, S. 37) der GABA_A-Rezeptoren zustande kommt, charakterisiert. Die beiden Zeitkonstanten des Stromabfalls τ_{schnell} bzw. τ_{langsam} betragen in Übereinstimmung mit den Werten von tatsächlichen GABA_A-IPSC (Jones, 1995) 58 ± 6 ms bzw. 287 ± 30 ms. Der Wert dieser Zeitkonstanten bestimmt die Länge GABA_A-Rezeptor-vermittelter Antworten und damit die Größe dieser zentral-inhibitorisch wirksamen postsynaptischen Ladungsverschiebungen.

ISO (0,6 mM) verlängerte beide Zeitkonstanten der GABA_A-IPSC-Modelle, verringerte jedoch deren Amplitude geringfügig, was auf die Kanal-blockierende Komponente von ISO zurückzuführen ist (Abb. 5.11).

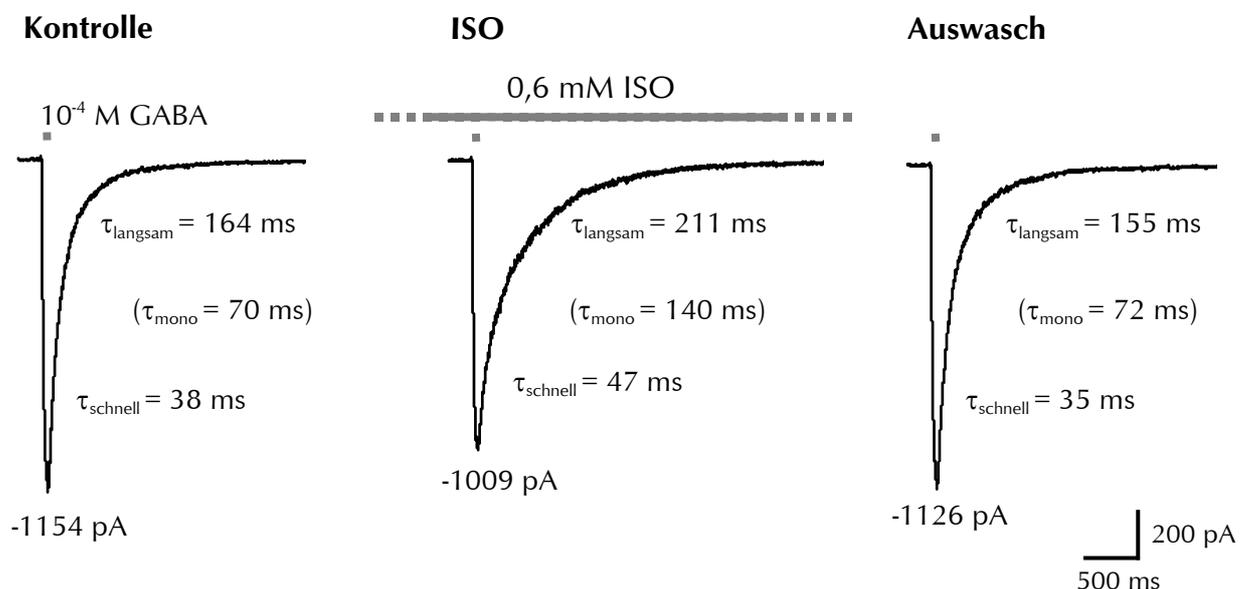


Abb. 5.11: Klinisch relevante Konzentrationen von ISO (0,6 mM entspricht etwa 1 MAC-Äquivalent) verlängerten (reversibel) die „IPSC-artigen“ GABA-Antworten. Trotz der gleichzeitig durch die blockierende Komponente von ISO verminderten Stromamplitude war insgesamt der Ladungsfluss (Fläche unter dem Strom-Zeit-Verlauf) deutlich vergrößert.

Abb. 5.12 zeigt die gemittelten Messwerte aus den „IPSC-artigen“ GABA_A-Antworten von 9 Experimenten. ISO bewirkte eine reversible Verlängerung sowohl der schnellen als auch der langsamen Zeitkonstante (Kontrolle: $\tau_{\text{schnell}} = 58 \pm 6$ ms, $\tau_{\text{langsam}} = 287 \pm 30$ ms; ISO: $\tau_{\text{schnell}} = 112 \pm 25$ ms, $\tau_{\text{langsam}} = 619 \pm 190$ ms; Auswasch: $\tau_{\text{schnell}} = 76 \pm 14$ ms, $\tau_{\text{langsam}} = 313 \pm 45$ ms; Abb. 5.12, A)⁴. Trotz Reduktion der Stromamplitude von -785 ± 267 pA (Kontrolle) auf -606 ± 187 pA⁴ (Abb. 5.12, B) erhöhte ISO durch Verlängerung der Zeitkonstanten den GABA-induzierten Ladungsfluss (Kontrolle: -73 ± 26 pAs, ISO: -111 ± 35 pAs, Auswasch: -79 ± 38 pAs; Abb. 5.12, C)⁴.

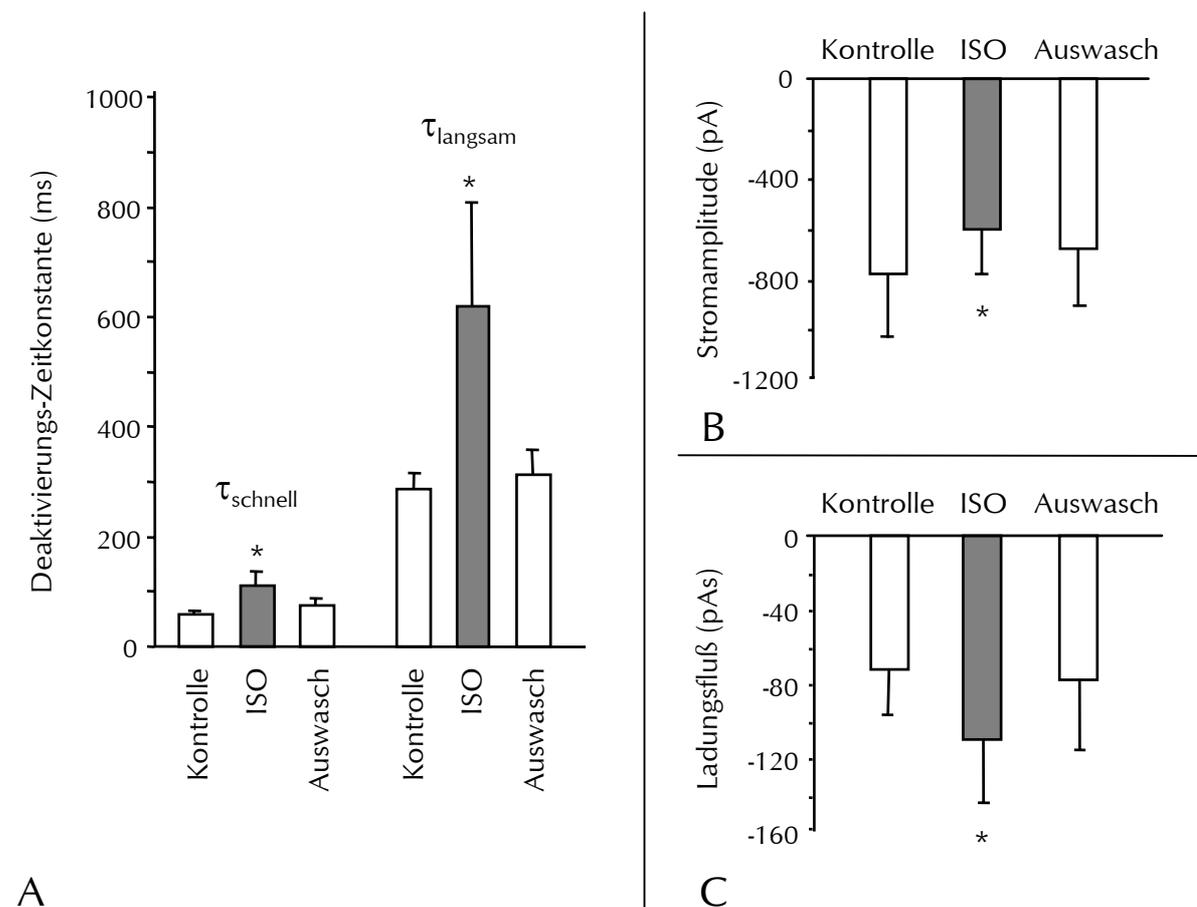


Abb. 5.12: ISO (0,6 mM) bewirkte bei den „IPSC-artigen“ Strömen ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor) eine reversible Verlängerung der schnellen und der langsamen Zeitkonstante τ (A). Trotz signifikanter Reduktion der Stromamplitude (B) erhöhte sich dadurch der GABA-induzierte Ladungsfluss (Fläche unter der Strom-Zeit-Kurve, C). (Jeweils Angabe von MW \pm SEM, n = 9, * $p < 0,05$ versus Kontrolle.)

⁴ Angabe von MW \pm SEM

5.3.5. Computersimulation der Isofluran-Wirkungen

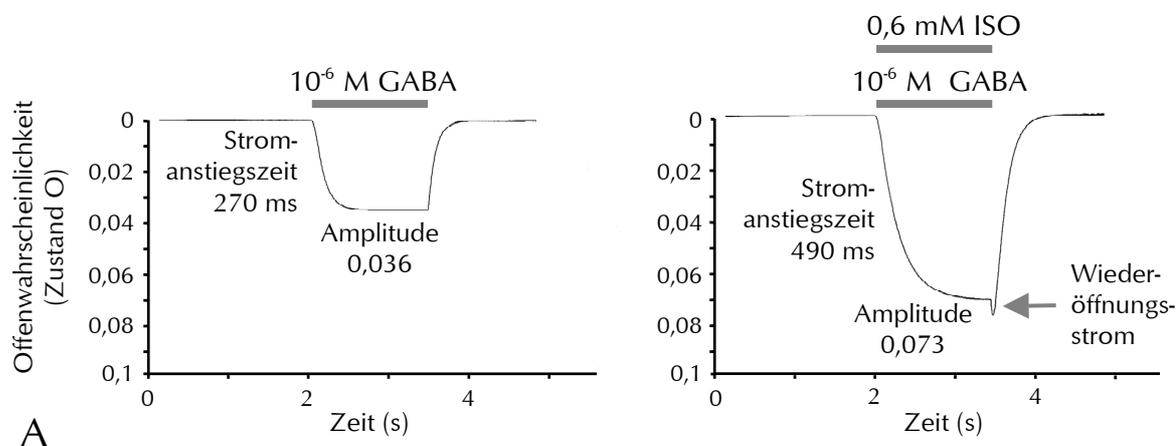
Basierend auf der „*Three-State-Kinetic-Theory*“ (del Castillo, 1957) und den theoretischen Grundlagen zur Ionenkanalkinetik (Colquhoun, 1981) sowie unter Berücksichtigung publizierter Reaktionsschemata für den GABA_A-Rezeptor (Adelsberger, 1997) wurde ein vereinfachtes Modell erstellt (Abb. 5.13, A). Die drei GABA-Bindungsschritte wurden anhand des für diesen Rezeptor ermittelten Hill-Koeffizienten von $2,4 \pm 0,2$ angenommen (siehe hierzu 5.1.1, S. 40). Anhand experimenteller Daten wurden die dazugehörigen Ratenkonstanten abgeschätzt. Für die zu behandelnden Fragestellungen wurden am Modell Vereinfachungen vorgenommen:

1. Desensitierungs-Zustände, die v. a. durch höhere Agonisten-Konzentrationen am GABA_A-Rezeptor induziert werden (Jones, 1996), wurden nicht berücksichtigt. Abb. 5.8, S. 49 zeigt, dass bei einer niedrigen GABA-Konzentration (10^{-6} M) kaum Desensitierung auftrat, was entsprechend für den simulierten Strom gilt (Abb. 5.14, A, S. 57). Zudem spielen Desensitierungs-Zustände bei der Simulation von „IPSC-artigen“ GABA-Strömen keine entscheidende Rolle, da selbst unter der hohen GABA-Konzentration von 10^{-4} M während der kurzen Applikationszeit von 10 ms nahezu keine Desensitierung auftritt. Der Stromabfall der „IPSC-artigen“ Ströme ist vielmehr durch Kanal-Deaktivierung nach Ende der GABA-Applikation bedingt.

2. Der Stromabfall der „IPSC-artigen“ GABA-Ströme verlief typischerweise biphasisch, d. h. mit einer schnellen und einer langsamen Zeitkomponente. Die Ursache hierfür ist umstritten. Diesem Phänomen könnten u. a. verschieden lange Offenzustände der Kanäle zugrunde liegen (Jones, 1995; Adelsberger, 1997). Zur Vereinfachung wurde unter Annahme eines monophasischen Verlaufs nur eine Zeitkonstante berechnet, um ein Reaktionsschema mit nur einer Art von Offenzustand (O) anzunehmen. Die Beschreibung des Stromabfalls durch also nur eine Zeitkonstante τ ergab die Werte 105 ± 14 ms (Kontrolle), 227 ± 29 ms (ISO; $p < 0,05$, $n = 9$) und 127 ± 18 ms (Auswasch).

Mit dem verwendeten kinetischen Modell (Abb. 5.13, A ohne ISO, Abb. 5.13, B mit ISO) konnten GABA-Antworten simuliert werden (Abb. 5.14), die den gemessenen Strömen entsprachen. Abb. 5.13, B zeigt ein Reaktionsschema zur Beschreibung der Effekte von ISO auf die GABA-induzierten Stromantworten. ISO hatte zwei unterschiedliche Wirkungen: Zum einen resultierte eine Linksverschiebung der GABA-Dosiswirkungskurve (siehe Abb. 5.8, B, S. 49) bei gleichzeitiger Verlangsamung des Stromanstiegs (siehe Abb. 5.8,

Simulierte Stromantworten auf eine niedrige GABA-Konzentration ohne und mit ISO



Simulation „IPSC-artiger“ GABA-Ströme ohne und mit ISO

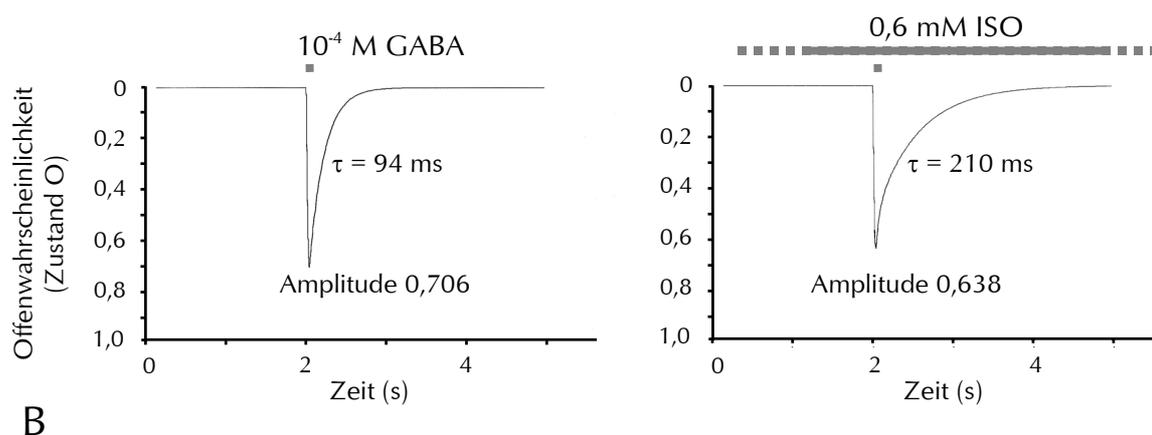


Abb. 5.14: Die unter Verwendung der obigen Modelle (siehe Abb. 5.13) simulierte GABA-Antworten ohne und mit ISO stimmen gut mit den gemessenen Strömen überein. Dargestellt ist hierbei die Wahrscheinlichkeit des Zustandekommens des Offenzustands O im Zeitverlauf. **A:** Die Simulation 1,5 s langer GABA-ISO-Koapplikation ergab, wie bei den gemessenen Strömen, GABA-Ströme mit größerer Amplitude und längerer Stromanstiegszeit. Wie im Experiment löste die (simulierte) Dissoziation von ISO einen Wiederöffnungsstrom aus. Korrespondierendes Experiment: siehe Abb. 5.8, A, S. 49. **B:** Die mit demselben Modell simulierte „IPSC-artigen“ GABA-Antworten waren (wie im Experiment) unter Anwesenheit von ISO verlängert (durch vermindertes K_{off} bedingt) und etwas verkleinert (durch den Kanalblock bedingt). Korrespondierendes Experiment: siehe Abb. 5.11, S. 53.

5.4. Der Effekt von gemeinsam appliziertem N₂O und Isofluran auf GABA-induzierte Ströme

In der klinischen Praxis wird häufig N₂O mit einem volatilen Anästhetikum kombiniert, da sich die klinische Wirkung der Substanzen gegenseitig verstärkt (die analgetische Wirkung von N₂O verringert z. B. den MAC-Wert von ISO von 1,1 Vol.% auf 0,5 Vol.%) (Larsen, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob sich dies auch in einer additiven Wirkung am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor zeigt.

5.4.1. Applikation von GABA, N₂O und Isofluran

Ausgehend von der Kontrolle (nur GABA 5×10^{-6} M \pm EC_{26±3}) wurde an jeweils einer Zelle nacheinander der Effekt von N₂O (29,2 mM N₂O + GABA), von ISO (0,2-1,2 mM ISO + GABA) und von N₂O + ISO (29,2 mM N₂O + 0,2-1,2 mM ISO + GABA) gemessen (Koapplikation der angegebenen Substanzen für jeweils 1,5 s). Abb. 5.15 zeigt exemplarisch die Stromantworten einer Zelle: Gegenüber der Kontrolle (-466 pA) bewirkten N₂O und ISO (0,6 mM) jeweils für sich einen deutlich vergrößerten Strom (N₂O: -686 pA, ISO: -679 pA). Zusammen bewirkten N₂O und ISO jedoch keine weitere wesentliche Vergrößerung des Stroms (-719 pA). Auffälligerweise wurde jedoch der durch Dissoziation von ISO ausgelöste Wiederöffnungsstrom durch N₂O vergrößert (Abb. 5.15, Insets).

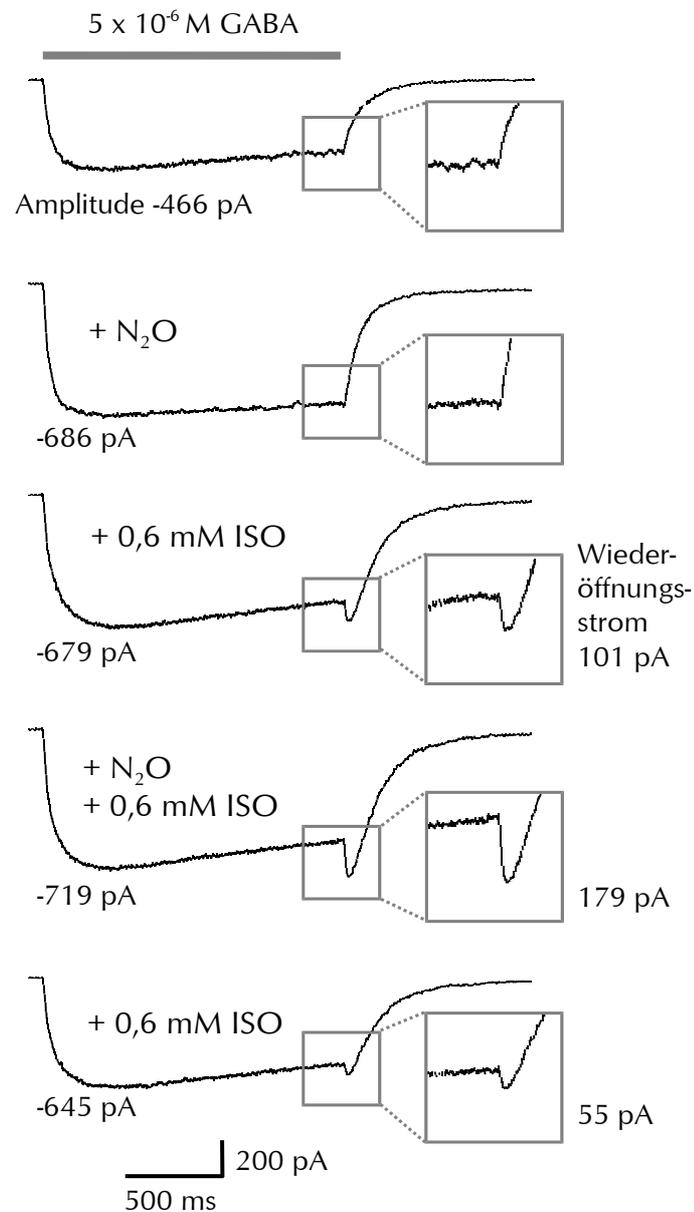


Abb. 5.15: GABAerge Stromantworten einer Zelle unter Einfluss von N₂O, ISO, und koappliziertem N₂O und ISO. Die Kombination beider Anästhetika bewirkte keine nennenswerte Steigerung der Amplitude gegenüber der durch jede einzelne Substanz erhöhten Stromantwort. N₂O vergrößerte jedoch den unter ISO auftretenden Wiederöffnungsstrom (siehe Insets). Offenbar wurden also unter dem Einfluss von N₂O mehr GABA-Kanäle durch ISO blockiert als ohne N₂O.

Die oben dargestellte Versuchsreihe wurde mit verschiedenen ISO-Konzentrationen durchgeführt. Gemessen wurden die Stromamplitude (Abb. 5.16, A) und die Größe des Wiederöffnungsstroms (Abb. 5.16, B).

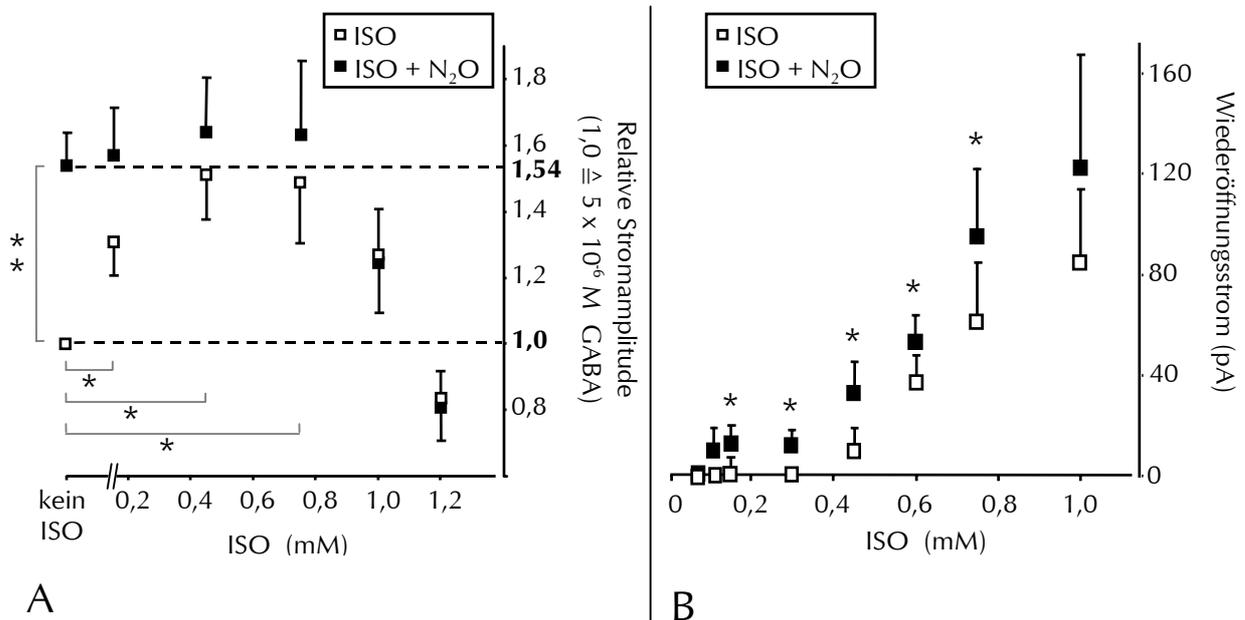


Abb. 5.16: Relative Stromamplitude (**A**) und Wiederöffnungsströme (**B**) GABA-induzierter Ströme unter Einfluss steigender ISO-Konzentrationen mit und ohne N₂O. **A:** Überlagerung von GABA-verstärkendem und Kanal-blockierendem Effekt ergab für ISO eine glockenförmige Dosis-Wirkungs-Beziehung (□). Der GABA-verstärkende Effekt von N₂O und ISO addierte sich jedoch nicht signifikant (■). (MW ± SEM, n = 7-15 je ISO-Konzentration, *p < 0,05, **p < 0,01 versus Kontrolle.) **B:** Die mit steigenden ISO-Konzentrationen größer werdenden Wiederöffnungsströme waren unter N₂O noch größer, d. h. ISO blockierte offenbar unter dem Einfluss von N₂O mehr Kanäle. Dies könnte womöglich einen additiven Effekt von N₂O und ISO auf die Stromamplitude verhindern. (MW ± SEM, n = 5-13 je ISO-Konzentration, *p < 0,05 ISO + N₂O versus ISO)

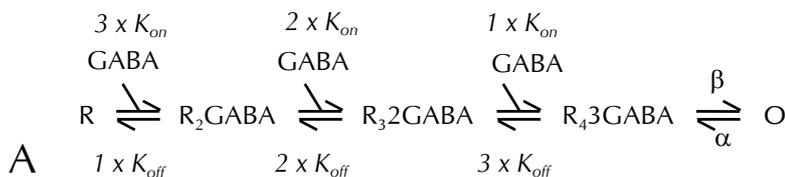
Übereinstimmend mit publizierten Daten (Neumahr, 2000) zeigte ISO für den Effekt auf den GABA-induzierten Strom eine glockenförmige Dosiswirkungskurve (Anstieg bis 0,5 mM ISO, Abfall ab 0,8 mM ISO) als Ausdruck des dualen Effekts von ISO (Verstärkung versus Block) auf den GABA_A-Rezeptor. Der Scheitelpunkt liegt bei einer $1,51 \pm 0,14$ -fachen Verstärkung durch 0,5 mM ISO (Abb. 5.16, A, □). N₂O alleine vergrößerte den GABA (5×10^{-6} M)-induzierten Strom $1,54 \pm 0,1$ -fach (n = 47; siehe auch: 5.2.2, S. 45). N₂O und ISO (0,5 mM) gemeinsam vergrößerten den Strom lediglich $1,64 \pm 0,16$ -fach (Abb. 5.16, A, ■). ISO verursachte bei Desapplikation ab Konzentrationen von durchschnittlich 0,5 mM Wiederöffnungsströme, die als Umkehrung des Offenkanalblocks zu verstehen sind. Deren Größe nahm mit steigenden ISO-Konzentrationen zu

(Abb. 5.16, B, \square). Zusammen mit N_2O traten diese Wiederöffnungsströme schon ab einer ISO-Konzentration von 0,15 mM auf und waren durchgehend größer als ohne N_2O (Abb. 5.16, B, \blacksquare). Offenbar wurden also unter dem Einfluss von N_2O mehr GABA-Kanäle durch ISO im Offenzustand blockiert. N_2O könnte demnach eine vermehrte Öffnung von GABA_A-Rezeptor-Kanälen bewirkt haben.

5.4.2. Computersimulationen

Die Effekte von N_2O und ISO lassen sich auch am kinetischen Modell für den GABA_A-Rezeptor nachvollziehen (Abb. 5.17).

Ähnlich wie ISO (0,5 mM) bewirkte N_2O eine Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve von GABA, d. h. eine erhöhte Wirksamkeit (Effizienz) des Agonisten GABA. Dies spricht für eine effektivere GABA-Bindung, die durch die Assoziationskonstante K_{on} und die Dissoziationskonstante K_{off} determiniert wird. Während allerdings ISO die Stromanstiegszeiten gleichzeitig verlängerte, was am ehesten für eine Verminderung von K_{off} spricht, lassen sich die durch N_2O verkürzten Stromanstiegszeiten durch eine erhöhte K_{on} nachvollziehen (siehe auch S. 50). Folglich ließen sich unter Anwendung des Reaktionsschemas (Abb. 5.17, B & C) die experimentellen Befunde durch eine N_2O -bedingte 1,45-fache Erhöhung der Assoziationskonstante K_{on} bzw. durch eine ISO-bedingte Halbierung der Dissoziationskonstante K_{off} simulieren. Wieder wurde der Offenkanaalblock durch ISO als Hin- und Rückreaktion in das Modell miteinbezogen (Abb. 5.17, C). So konnten auch die Wiederöffnungsströme simuliert werden (Abb. 5.18). Abb. 5.17, D stellt eine Kombination aus den Modellen B (N_2O) und C (ISO) dar, also eine durch ISO halbierte K_{off} zusammen mit dem Offenkanaalblock und eine durch N_2O 1,45-fach vergrößerte K_{on} . Die mit dem so erstellten Modell D simulierte GABA-Antwort stimmt gut mit dem Experiment überein (Abb. 5.18).

GABA (5×10^{-6} M)

	Wert	Einheit
K_{on}	2300000	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
K_{off}	16	s^{-1}
$K_{on(\text{Block})}$	30000	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$K_{off(\text{Block})}$	17	s^{-1}
α	300	s^{-1}
β	1000	s^{-1}

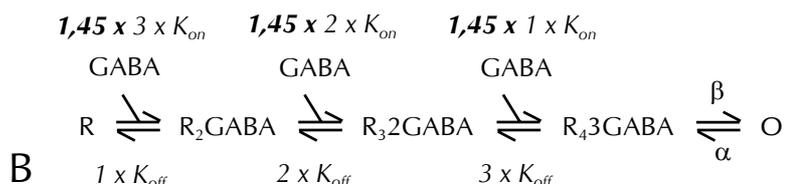
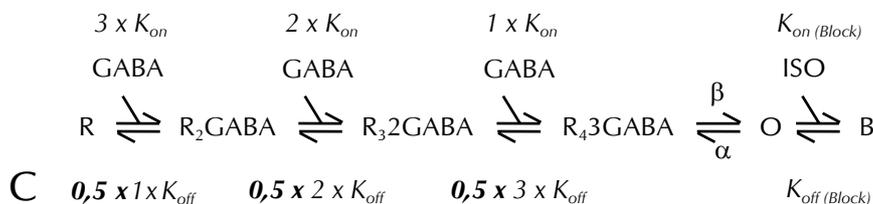
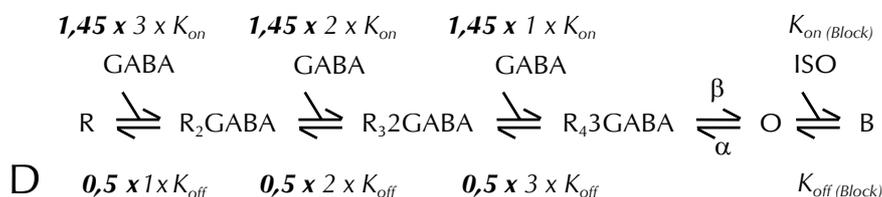
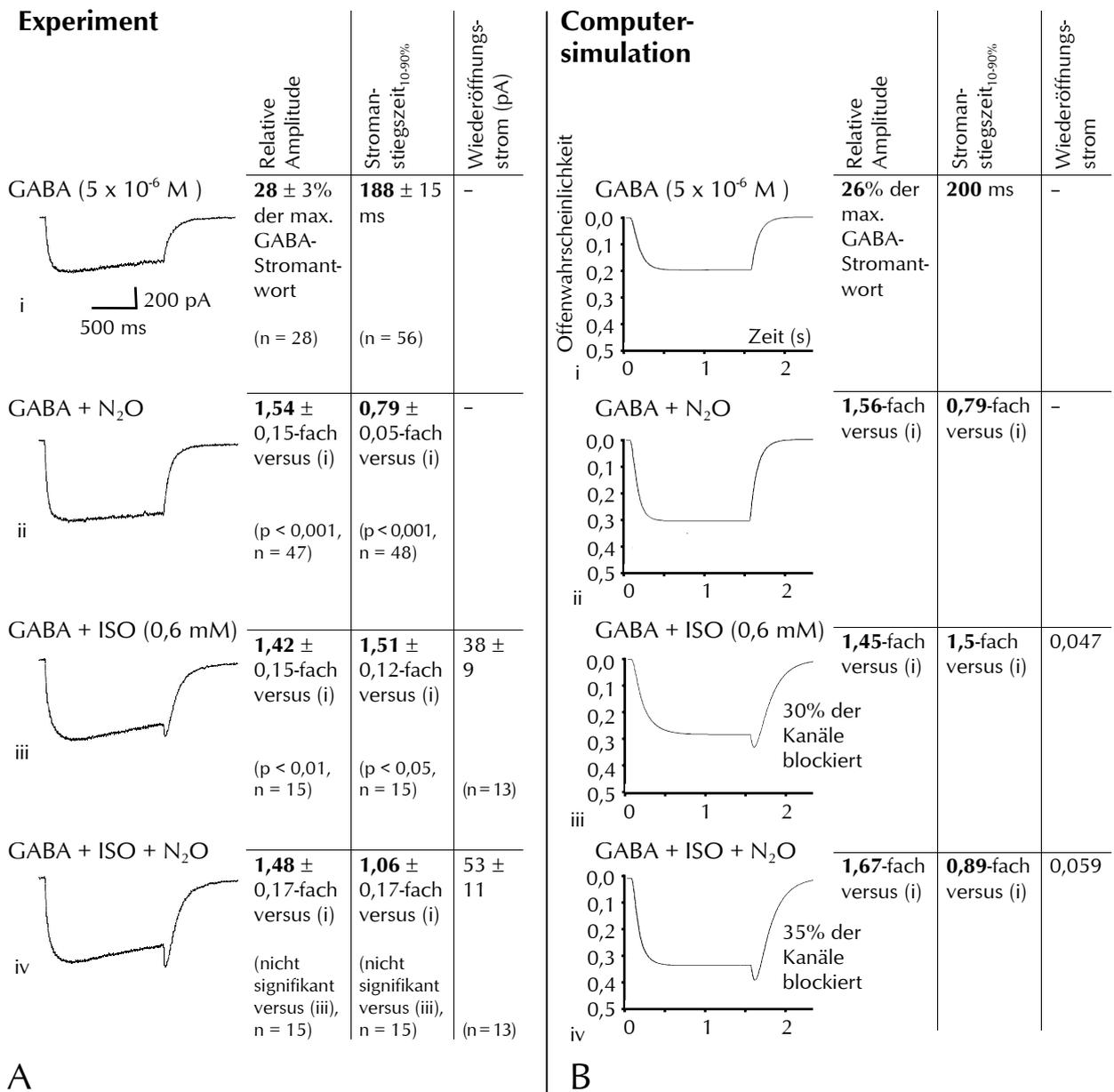
GABA (5×10^{-6} M) + N_2O (29,2 mM)**GABA (5×10^{-6} M) + ISO (0,6 mM)****GABA (5×10^{-6} M) + ISO (0,6 mM) + N_2O (29,2 mM)**

Abb. 5.17: **A:** Vereinfachtes Modell für den GABA_A -Rezeptor mit geschlossenen (R) und offenen (O) Zuständen, ohne Berücksichtigung der Desensibilisierung. **B:** N_2O bewirkte eine Linksverschiebung der GABA-Dosiswirkungskurve (siehe Abb. 5.5, A, S. 46), sowie eine Verringerung der Stromanstiegszeit_{10-90%} (siehe Abb. 5.5, B, S. 46). Diese Befunde lassen sich im Reaktionsschema mit einer N_2O -bedingten 1,45-fachen Erhöhung der GABA-Assoziationskonstante K_{on} erklären. **C:** Reaktionsschema zur Beschreibung der Effekte von ISO: 0,5-fache GABA-Dissoziationskonstante K_{off} sowie Offenkanalblock (B = blockierter Zustand des Rezeptors). **D:** In diesem Modell wurden die Effekte von N_2O und ISO unabhängig voneinander kombiniert.

Die errechnete Offenwahrscheinlichkeit (Zustand O des Kanals) im Zeitverlauf stimmte bei allen Modellen sehr gut mit den experimentell ermittelten Strömen überein (Abb. 5.18).



A

B

Abb. 5.18: Vergleich der experimentell ermittelten (A; siehe auch Abb. 5.15, S. 59) mit den simulierten (B) GABA-Antworten unter Einfluss von N₂O, ISO und N₂O + ISO. Experimentell ermittelte und simulierte Ströme stimmen bezüglich Amplitude und Stromanstiegszeit_{10-90%} gut überein. B, iii & iv: Während ISO alleine eine Blockwahrscheinlichkeit (blockierter Zustand B) von 30% bedingte (Wiederöffnungsstrom: 0,047), erhöhte N₂O die Blockwahrscheinlichkeit auf 35% und den Wiederöffnungsstrom auf 0,059.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit bilden GABA-induzierte Stromantworten von HEK 293-Zellen, die einen rekombinanten $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor der Ratte exprimieren, ein Modell für die schnelle GABAerge synaptische Transmission. Die verwendete Untereinheitenkombination des GABA_A-Rezeptors kommt auch im menschlichen ZNS am häufigsten vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass die zentral-inhibitorische Wirkung der Anästhetika N₂O, Xenon (Xe) und Isofluran (ISO) zumindest teilweise durch den GABA_A-Rezeptor vermittelt wird. Nach den in dieser Arbeit ermittelten Befunden besteht die Wirkung von N₂O, Xe und ISO u. a. in einer Erhöhung der Wirksamkeit von GABA am GABA_A-Rezeptor.

6.1. N₂O und Xe verstärken die Assoziation von GABA und GABA_A-Rezeptor

Die experimentelle Erfassung der Wirkungen gasförmiger Anästhetika auf ligandengesteuerte Ionenkanäle ist technisch anspruchsvoll und wurde bisher in nur wenigen Arbeiten durchgeführt (siehe Tab. 2.3, S. 23). Bei solchen Experimenten stellt sich zunächst die Frage, ob das Gas (in Extrazellulärlösung gelöst) überhaupt den zu untersuchenden Ionenkanal erreicht und in welcher Konzentration es wirkt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig eine Evaluierung des Zeitverlaufs des Lösevorgangs von N₂O und Xe durch eine volumetrische Bestimmung (siehe 5.2.1, S. 43). Hier konnte gezeigt werden, dass die für die elektrophysiologischen Messungen verwendete Extrazellulärlösung (kontinuierliche Begasung für mindestens 3,5 min) bereits nach wenigen Minuten mit N₂O bzw. Xe gesättigt ist. Die gemessene maximale Löslichkeit dieser Gase in der Extrazellulärlösung entspricht den jeweiligen Tabellenwerten für H₂O (Wilhelm, 1977).

N₂O und Xe vergrößern den GABA-induzierten Strom und verkürzen gleichzeitig die Stromanstiegszeit_{10-90%}, was am ehesten für eine Erhöhung der GABA-Affinität spricht (siehe Abb. 5.5, S. 46). Diese detaillierte Beschreibung der Wirkung am GABA_A-Rezeptor ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Erst die Anwendung des Systems der schnellen Agonistenapplikation (siehe 4.3.4, S. 33) in dieser Arbeit ermöglichte die hohe zeitliche Auflösung der Rezeptoraktivierung und damit die zuverlässige Angabe von

Stromanstiegszeiten. In der Computersimulation des N_2O -Effektes drückt sich dies in einer 1,45-fachen Erhöhung der GABA-Assoziationskonstante K_{on} aus (Abb. 5.17, B, S. 62). Diese kinetische Modellierung des Effekts von N_2O am $GABA_A$ -Rezeptor wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine Erhöhung GABA-induzierter Stromantworten durch N_2O wurde bislang an Hippocampusneuronen von Ratten festgestellt (Dzoljic, 1998). In einer anderen Untersuchung wurde ebenfalls eine Verstärkung GABAerger Stromantworten durch N_2O beschrieben (Yamakura, 2000). Hier wurde jedoch die beobachtete N_2O -bedingte Hemmung des NMDA-Rezeptors als bedeutsamer für die zentral-inhibitorische Wirkung von N_2O erachtet. Wegen der stark divergenten Verschaltung GABAerger Interneurone, wie sie z. B. im Hippocampus vorliegt (Freund, 1996), könnte sich jedoch selbst eine schwache Veränderung der $GABA_A$ -Rezeptor-Funktion insgesamt relativ stark auswirken.

Bisher gibt es nur wenige Publikationen zur Wirkung von Xe auf Ionenkanäle. Ein Effekt am $GABA_A$ -Rezeptor wurde dabei bisher weitgehend verneint (Franks, 1998; siehe 2.3.3.2, S. 21). Eine neuere Arbeit (Yamakura, 2000) beschreibt hingegen einen schwachen Verstärkungseffekt von Xe auf Stromantworten von in *Xenopus* Oozyten exprimierten $GABA_A$ -Rezeptoren. Die Diskrepanz der verschiedenen Arbeiten hinsichtlich des Xe-Effekts könnte möglicherweise in unterschiedlichen Untereinheitenkombinationen der jeweils untersuchten Rezeptoren begründet sein. Geringfügige Änderungen in der β -Untereinheit (Carlson, 2000) oder die Anwesenheit einer zusätzlichen (endogenen) δ - oder θ -Untereinheit (Mihalek, 1999) beeinflussen die Wirkung mancher Substanzen auf den $GABA_A$ -Rezeptor erheblich. Darüberhinaus zeigt der in der vorliegenden Arbeit untersuchte $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ - $GABA_A$ -Rezeptor bereits unterschiedliche Stromantworten, je nachdem ob er von HEK 293-Zellen oder von *Xenopus* Oozyten exprimiert wird (unveröffentlichte Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe). Diese Tatsache kann mit dem Einfluss der „Wirtszelle“ auf die Funktion und Struktur des Rezeptors erklärt werden (Connolly, 1996).

Zur Erklärung der Interaktionen zwischen Edalgasteilchen (z. B. Xe) bzw. Gasmolekülen mit zwei verschiedenen Atomen (z. B. N_2O) einerseits und Proteinen andererseits wurden sehr komplexe Computersimulationen durchgeführt (Trudell, 1998). Demnach entstehen durch Polarisierung des Moleküls sog. schwache Kräfte zwischen dem Gasmolekül und dem Protein. Die Größe des jeweiligen Moleküls korreliert dabei mit der Fähigkeit zur Polarisierung, und in der Folge mit seiner Potenz als *Immobilizer* (anästhetische Wirksamkeit im Sinne der motorischen Antwort auf Schmerzreiz; siehe

auch Erläuterung zum MAC-Begriff, S. 19; Trudell, 1998). Auf diese Weise werden verschiedene *Immobilizer* (Argon, Krypton, Xe und Stickstoff) von *Non-Immobilizern* (wie z. B. He, Neon und Wasserstoff) unterschieden (Trudell, 1998). In der vorliegenden Arbeit bewirkten die Immobilizer N₂O und Xe im Gegensatz zum *Non-Immobilizer* He eine Verstärkung GABA_A-Rezeptor-vermittelter Ströme.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass N₂O und Xe die Wirksamkeit von GABA am GABA_A-Rezeptor durch eine Verstärkung der GABA-Assoziation erhöhen. Dadurch ließe sich die *in vivo*-Wirkung dieser Gase (*Immobilizer*) zumindest teilweise erklären.

6.2. Isofluran verzögert die Dissoziation von GABA und blockiert gleichzeitig den offenen GABA-Kanal

Wie bereits in einer früheren Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe (Neumahr, 2000) dargestellt ist, hat ISO am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor einen dualen Effekt (Abb. 5.7, B, S. 48): Niedrige ISO-Konzentrationen erhöhen, hohe ISO-Konzentrationen vermindern die GABA-induzierte Stromantwort. Zudem bewirkt ISO, wenn auch in Konzentrationen, die deutlich über dem MAC-Äquivalent liegen, eine direkte Aktivierung des $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptors zusammen mit einem Offenkanalblock (Haseneder, 2002).

Die Verstärkung der GABA-induzierten Stromantwort ist bei 0,5 mM ISO am deutlichsten ausgeprägt. Diese Konzentration wird als MAC-Äquivalent von ISO angesehen (Firestone, 1986). Dennoch muss kein kausaler Zusammenhang zwischen dieser klinisch relevanten ISO-Konzentration und dem maximalen Verstärkungseffekt in den vorliegenden Befunden bestehen, zumal es auch keine zuverlässigen Angaben über tatsächliche Wirkstoffkonzentrationen im synaptischen Spalt gibt.

Die genauere Betrachtung der Aktivierungs-Kinetik der GABA-Ströme in der vorliegenden Arbeit ergab, dass ISO (0,6 mM) neben der Erhöhung der Stromamplitude gleichzeitig die Stromanstiegszeit verlängert (Abb. 5.8, B & C, S. 49). Dieser Befund spricht für eine Verzögerung der Dissoziation des Agonisten GABA von seiner Bindungsstelle. In der Computersimulation des ISO-Effekts drückt sich dies in einer Halbierung der GABA-Dissoziationskonstante K_{off} aus (Abb. 5.13, S. 56). ISO stabilisiert also offenbar die Bindung zwischen GABA und dem GABA-Rezeptor, was letztlich die inhibitorische postsynaptische Transmission verstärken könnte.

Auffällig ist, dass die rasche Entfernung (Desapplikation) von ISO (> 0,5 mM) aus der

Umgebung der GABA_A-Rezeptor-tragenden Zelle einen kurzen, transienten Wiederanstieg der Stromantwort verursacht. Das gleiche Phänomen zeigt sich auch bei Picrotoxin (Abb. 5.2, B ii, S. 42 & Abb. 5.10, B i, S. 52), einem GABA_A-Kanal-Blocker (Inoue, 1988), während Bicucullin, ein kompetitiver GABA-Antagonist, bei Desapplikation keine solchen sog. Wiederöffnungsströme auslöst (Abb. 5.2, A ii, S. 42). Die Wiederöffnungsströme entstehen also offensichtlich bei der Umkehrung eines Offenkanalblocks, wie ihn Picrotoxin und ISO am GABA_A-Rezeptor verursachen. Dieser Mechanismus konnte entsprechend unter Einbeziehung eines Bindungsschrittes, durch den ISO innerhalb des kinetischen GABA-Rezeptor-Modells einen Kanalblock bewerkstelligt, in der Computersimulation nachvollzogen werden (Abb. 5.13 & Abb. 5.14, S. 56 & 57). Überdies weisen Befunde am Drosophila-GABA-Rezeptor darauf hin, dass ISO und Picrotoxin sogar eine gemeinsame Bindungsstelle im Lumen des Ionenkanals haben (Edwards, 1997). Auch im Zusammenhang mit Kanalblockern des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors wurden ähnliche Wiederöffnungsströme beobachtet (Dilger, 1992b).

Eine andere Theorie zur Erklärung der Wiederöffnungsströme postuliert, dass diese durch einen Übergang vom desensitisierten in den offenen Zustand verursacht werden (Jones, 1995). Desensitisierung wird als Konformationsänderung des Rezeptors ohne stattfinden von Bindungsschritten definiert (Jones, 1995). Ein desensitisierte Rezeptor-Ionenkanal-Komplex ist inaktiv und gegenüber dem Agonisten insensitiv. Die zur Resensitisierung des GABA_A-Rezeptors erforderliche Zeit beträgt mehrere Sekunden (Jahn, 1997). Diese Zeit scheint zu lange, um, wie in unseren Befunden, Wiederöffnungsströme mit einer Stromanstiegszeit von 10 bis 50 ms auszulösen. Zudem konnte bei den durchgeführten Computersimulationen ein derartiger Mechanismus zur Auslösung von Wiederöffnungsströmen nicht nachvollzogen werden (nicht gezeigte Experimente). Die vorliegenden Überlegungen anhand verschiedener kinetischer Modelle lassen den Schluss zu, dass zur Entstehung von Wiederöffnungsströmen die Umkehrung eines Bindungsschritts, über den die Blockade eines aktivierten Kanals erfolgt, notwendig ist. Das Modell (Abb. 5.13, S. 56) steht auch im Einklang mit dem Befund, dass die Amplitude der Wiederöffnungsströme sowohl mit der ISO- als auch mit der GABA-Konzentration zunimmt (Abb. 5.9, S. 51). Dies bestätigt die Annahme, dass eine Zunahme der ISO-Konzentration die Anzahl der blockierten Kanäle erhöht, während eine Zunahme der GABA-Konzentration die Anzahl der insgesamt geöffneten und damit blockierbaren Kanäle erhöht.

Bis hierher läßt sich also zusammenfassen, dass ISO am GABA_A-Rezeptor einen dualen Effekt ausübt. Einerseits erhöht ISO, ebenso wie N₂O und Xe, die Wirksamkeit von

GABA am GABA_A-Rezeptor, jedoch anders als N₂O und Xe, durch eine Verminderung der GABA-Dissoziation. Zusätzlich blockiert ISO den GABA-Kanal, wenn er sich im offenen Zustand befindet.

Dabei scheint die Bedeutung dieses blockierenden Effekts zunächst unklar, da er nicht unmittelbar mit einer Verstärkung der GABAergen synaptischen Transmission in Zusammenhang zu bringen ist. Es gibt jedoch ältere Befunde zum nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor, die zeigen, dass Kanal-blockierende Substanzen die Öffnungsalven (sog. „bursts“) der einzelnen Kanäle verlängern können (Beam, 1976). Dies wird damit erklärt, dass ein Offenkanalblock das Öffnungsverhalten eines Ionenkanals dahingehend verändert, dass das blockierende Molekül die Kanalpore in einem bestimmten Gleichgewicht verschließt und wieder freigibt. Dadurch wird der kinetische Übergang des Ionenkanals vom aktivierten in den inaktiven Zustand verzögert und somit insgesamt die Offenzeit verlängert. Durch einen solchen Mechanismus könnte ISO, möglicherweise auch zusammen mit der verzögerten GABA-Dissoziation, den verlängerten Zeitverlauf GABAerger IPSC (Jones, 1993; Banks, 1999) verursachen.

Um schließlich die Wirkung von ISO auf GABAerge IPSC nachzuvollziehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell entwickelt: Hierbei induzieren kurze GABA-Applikationspulse Stromantworten, die GABAergen IPSC stark ähneln (Jones, 1995). Dies zeigt gleichzeitig, dass die Kinetik GABAerger IPSC wesentlich von der Kinetik der postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren bestimmt wird (Jones, 1995). Unter dem Einfluss einer MAC-äquivalenten ISO-Konzentration (0,6 mM) ist der Zeitverlauf dieser „IPSC-artigen“ GABA-Ströme deutlich verlängert. Dadurch vergrößert sich der GABA-induzierte Ladungsfluss, obwohl ISO gleichzeitig die Stromamplitude vermindert, was sich wiederum durch den Offenkanalblock erklären lässt (Abb. 5.11, S. 53 und Abb. 5.12, C, S. 54). Anhand des kinetischen Modells (Abb. 5.13, A, S. 56) konnten diese „IPSC-artigen“ GABA-Ströme sowie deren Veränderung durch ISO wiederum nachvollzogen werden (Abb. 5.14, B, S. 57).

Insgesamt stehen diese Befunde im Einklang mit einer direkten postsynaptischen Wirkung von ISO, die im wesentlichen in einer Verlängerung GABAerger IPSC besteht. Gemäß den vorliegenden Befunden bewerkstelligt ISO diese Verlängerung durch eine verzögerte GABA-Dissoziation, möglicherweise in Kombination mit einem Offenkanalblock der GABA-Kanäle. Durch die stark divergente Verschaltung GABAerger Interneurone, wie sie z. B. im Hippocampus vorliegt, könnte diese Wirkung von ISO zu einer deutlich verstärkten zentralen Hemmung führen.

6.3. N₂O verstärkt die Kanal-blockierende Wirkung von Isofluran am GABA_A-Rezeptor

In den dargestellten Experimenten verstärkten sowohl N₂O als auch ISO die GABA-induzierten Ströme (Abb. 5.5, S. 46; Abb. 5.8, S. 49). Allerdings unterscheiden sich die beiden Substanzen dabei im Wirkmechanismus, was sich insbesondere in unterschiedlichen Aktivierungskinetiken der Stromantworten ausdrückt. Anhand des kinetischen Modells läßt sich zeigen, dass hierbei die Wirkung von N₂O in einer Verstärkung der Assoziation, die von ISO mit einer Verzögerung der Dissoziation von GABA und GABA_A-Rezeptor bestehen könnte. Darüberhinaus bewirkt ISO einen Offenkanaalblock am GABA_A-Rezeptor. Dadurch kann ISO insbesondere in höheren Konzentrationen die GABA-induzierten Ströme deutlich reduzieren.

Obwohl in der klinischen Praxis verschiedene Anästhetika kombiniert angewendet werden, existieren bisher noch keine Daten über deren Interaktionen auf Rezeptor-Ebene. In der hier beschriebenen Versuchsreihe wurden deshalb N₂O und ISO zusammen am GABA_A-Rezeptor appliziert. Hierbei fiel v. a. auf, dass sich die verstärkenden Effekte von N₂O und ISO nicht nennenswert aufaddierten, während hingegen die durch ISO ausgelösten Wiederöffnungsströme in Anwesenheit von N₂O deutlich größer waren (Abb. 5.15, S. 59). Diese Befunde konnten in der Computersimulation nachvollzogen werden, indem die zuvor erstellten Modelle für den N₂O-Effekt bzw. für den ISO-Effekt in einem neuen Modell kombiniert wurden (Abb. 5.17, S. 62, D). Dies spricht dafür, dass beide Substanzen unabhängig voneinander ihre Wirkung am GABA_A-Rezeptor entfalten, was sich u. a. darin äußert, dass unter Einfluss von N₂O mehr geöffnete Kanäle vorliegen, die dann wiederum durch ISO blockiert werden können. Dadurch kommt möglicherweise bei Dissoziation von ISO der größere Wiederöffnungsstrom zustande. Ob allerdings in dieser Interaktion zwischen N₂O und ISO am GABA_A-Rezeptor der klinisch additive Effekt der beiden Anästhetika begründet ist, bleibt zweifelhaft und fraglich.

7. Zusammenfassung

Ein wesentlicher Wirkmechanismus von Allgemeinanästhetika besteht in der Verstärkung neuronaler Inhibition. GABA ist der vorherrschende inhibitorische Neurotransmitter im ZNS. Der GABA_A-Rezeptor, der die schnelle inhibitorische synaptische Transmission vermittelt, gilt als ein wichtiger Angriffsort für Allgemeinanästhetika.

In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die Kombination von zeitlich hochauflösender Elektrophysiologie (System zur schnellen Agonistenapplikation) und kinetischer Modellierung von Rezeptormechanismen erstmalig eine detaillierte Beschreibung der Interaktion zwischen N₂O, Xe und ISO und dem GABA_A-Rezeptor. Hierfür wurden mittels Patch-Clamp-Technik GABA-induzierte Ströme von HEK 293 Zellen, die einen rekombinanten $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptor der Ratte exprimieren, gemessen. Die gemessenen Ströme wurden anhand eines kinetischen Modells des GABA_A-Rezeptors simuliert, um den Effekt der Anästhetika qualitativ und quantitativ zu beschreiben.

N₂O, Xe und ISO erhöhen die Wirksamkeit von GABA am GABA_A-Rezeptor. Erstmals zeigt ein kinetisches Modell, dass N₂O und Xe diesen Effekt durch Verstärkung der GABA-Assoziation bewirken, ISO hingegen durch Verminderung der GABA-Dissoziation. Gleichzeitig blockiert ISO den offenen GABA_A-Kanal, ein Effekt, der sich insbesondere bei höheren ISO-Konzentrationen zeigt. Die verzögerte GABA-Dissoziation durch ISO erklärt die Verlängerung des Zeitverlaufs GABA_A-Rezeptor-vermittelter postsynaptischer Ströme. Der Offenkanalblock erklärt die Verminderung deren Amplitude. Bei klinisch relevanten Konzentrationen von ISO überwiegt dabei möglicherweise die Verlängerung des Zeitverlaufs, was insgesamt zu einer vermehrten postsynaptischen GABAergen Hyperpolarisation führt.

Die untersuchten Anästhetika verstärken die GABA_Aerge synaptische Transmission durch direkte postsynaptische Wirkung. Bisher wurde die Anästhesie erzeugende Wirkung, insbesondere von N₂O und Xe, überwiegend auf eine Verminderung der glutamatergen Exzitation zurückgeführt (Franks, 1998; Yamakura, 2000). Da aber auch die hemmenden GABAergen Interneurone glutamaterg angesteuert werden (siehe Abb. 2.1, S. 6), könnte es sein, dass eine alleinige Hemmung der glutamatergen Exzitation in der Summe nicht unbedingt zu einer verstärkten Inhibition führt. Der hierfür entscheidendere Mechanismus könnte im positiv GABAergen Effekt begründet sein, insbesondere vor dem Hintergrund einer stark divergenten Verschaltung GABAerger Neurone, wie sie z. B. im Hippocampus vorliegt. Offen bleibt, ob ein im klinischen Sinne „gutes“ Anästhetikum gerade

über eine Kombination von Exzitationshemmung und Inhibitionsverstärkung wirken muss, oder ob nur einer der genannten Mechanismen entscheidend ist. Für die künftige Beantwortung dieser Frage bedarf es tieferer Einblicke in das Phänomen Anästhesie, insbesondere hinsichtlich elektrophysiologisch erfassbarer Messparameter.

Abb. 7.1 auf der nächsten Seite stellt eine synoptische Übersicht der in dieser Arbeit erhobenen Befunde und deren Interpretation dar.

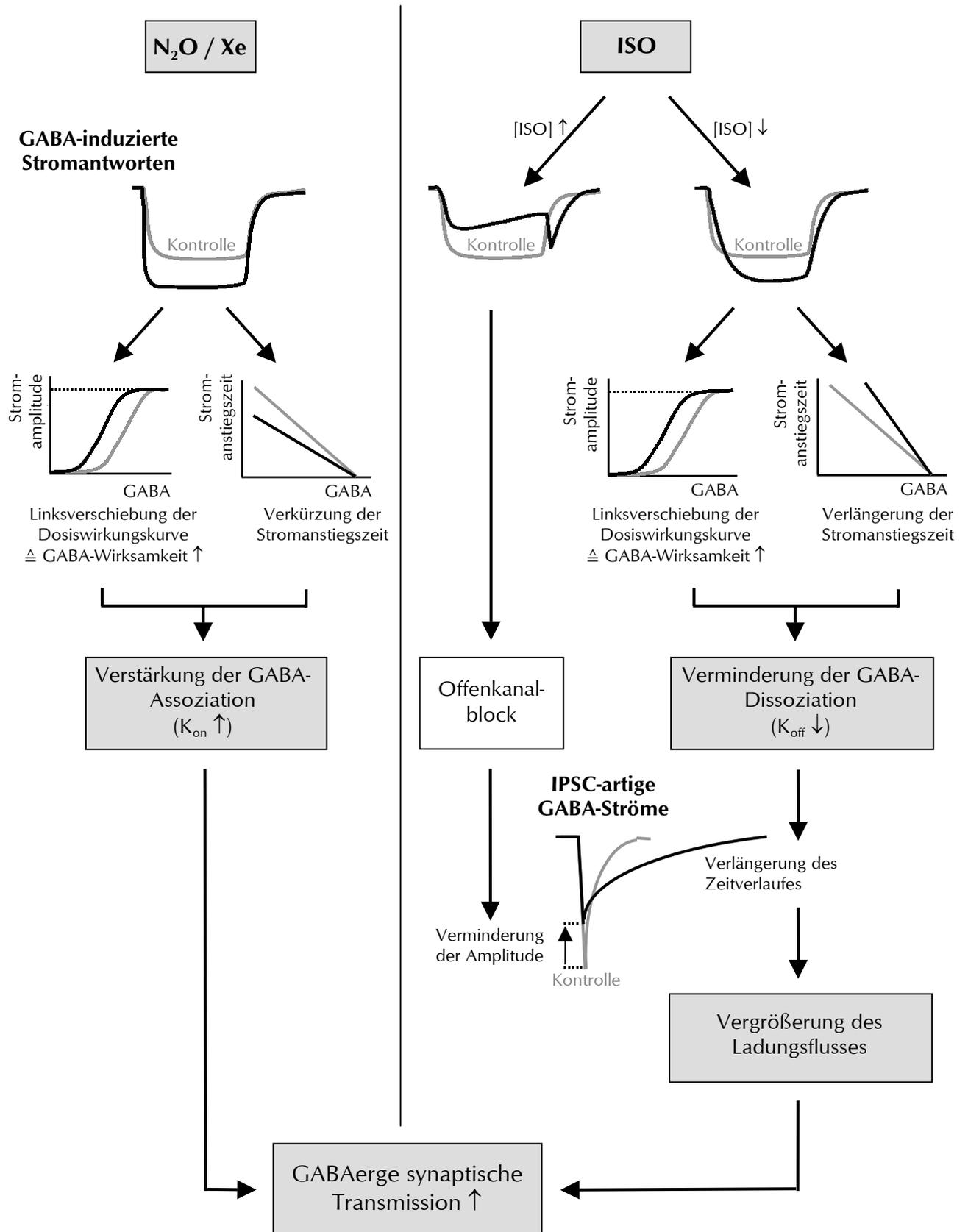


Abb. 7.1: Synaptische Übersicht über die erhobenen Befunde und deren Interpretation.

8. Literaturverzeichnis

1. Adelsberger, H., Dudel, J.: Patch clamp study and kinetic modeling on the most abundant chloride channel on distal fibers of crayfish opener muscle. *J. Comp. Physiol. [A.]* 180 (1997) 53-61
2. Adelsberger, H., Wilde, J., Franke, C., Dudel, J.: Multiple mechanisms of block by the anesthetic isoflurane of a gamma-aminobutyric acid activated chloride channel in crayfish. *J. Comp. Physiol. [A.]* 182 (1998) 51-58
3. Amin, J., Weiss, D.S.: GABA_A receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 366 (1993) 565-569
4. Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R., Lodge, D.: The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br. J. Pharmacol.* 79 (1983) 565-575
5. Awapara, J., Landua, A., Fuerst, R., Seale, B.: Free Gamma-aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.*(1950) 35-39
6. Bai, D., Pennefather, P.S., MacDonald, J.F., Orser, B.A.: The general anesthetic propofol slows deactivation and desensitization of GABA_A receptors. *J. Neurosci.* 19 (1999) 10635-10646
7. Banks, M.I., Pearce, R.A.: Dual actions of volatile anesthetics on GABA_A IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology* 90 (1999) 120-134
8. Barker, J.L., Harrison, N.L., Lange, G.D., Owen, D.G.: Potentiation of gamma-aminobutyric-acid-activated chloride conductance by a steroid anaesthetic in cultured rat spinal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 386:485-501 (1987) 485-501

9. Barnard, E.A., Darlison, M.G., Seeburg, P.H.: Molecular biology of the GABA_A receptor: the receptor/channel superfamily. *Trends. Neurosci.* 10 (1987) 502-509
10. Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., Langer, S.Z.: International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of GABA_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 291-313
11. Beam, K.G.: A voltage-clamp study of the effect of two lidocaine derivatives on the time course of end-plate currents. *J. Physiol. (Lond.)* 258 (1976) 279-300
12. Bliss, T.V., Collingridge, G.L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361 (1993) 31-39
13. Bloom, F.E., Iversen, L.L.: Localizing ³H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 229 (1971) 628-630
14. Bowery, N.: GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10 (1989) 401-407
15. Bowery, N.G.: GABA_B receptor pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33 (1993) 109-147
16. Bowery, N.G.: Pharmacology of GABA_B Receptors. In: "The GABA Receptors", Enna, S.J., Bowery, N.G. (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, 1996, 209-236
17. Carlson, B.X., Engblom, A.C., Kristiansen, U., Schousboe, A., Olsen, R.W.: A single glycine residue at the entrance to the first membrane-spanning domain of the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta(2) subunit affects allosteric sensitivity to GABA and anesthetics. *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 474-484

18. Carlson, B.X., Hales, T.G., Olsen, R.W.: GABA_A-Receptor and Anesthesia. In: "Anesthesia: Biologic Foundations", Yaksh, T.L., Lynch, C., Zapol, W.M., Maze, M., Biebuyck, J.F., Saidman, L.J. (Hrsg.), Raven Lippincott Publishers, Philadelphia, 1997, 1. Auflage, 259-275
19. Chang, Y., Wang, R., Barot, S., Weiss, D.S.: Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *J. Neurosci.* 16 (1996) 5415-5424
20. Clements, J.D.: Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends. Neurosci.* 19 (1996) 163-171
21. Colquhoun, D., Hawkes, A.G.: On the stochastic properties of single ion channels. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 211 (1981) 205-235
22. Connolly, C.N., Krishek, B.J., McDonald, B.J., Smart, T.G., Moss, S.J.: Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 89-96
23. Cullen, S.C., Eger, E.I., Cullen, B.F., Gregory, P.: Observations on the anesthetic effect of the combination of xenon and halothane. *Anesthesiology* 31 (1969) 305-309
24. De Koninck, Y., Mody, I.: Noise analysis of miniature IPSCs in adult rat brain slices: properties and modulation of synaptic GABA_A receptor channels. *J. Neurophysiol.* 71 (1994) 1318-1335
25. de Sousa, S.L., Dickinson, R., Lieb, W.R., Franks, N.P.: Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology* 92 (2000) 1055-1066
26. del Castillo, J., Katz, B.: Interaction at endplate receptors between different choline derivatives. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 146 (1957) 369-381
27. Dilger, J.P., Brett, R.S., Lesko, L.A.: Effects of isoflurane on acetylcholine receptor channels. 1. Single-channel currents. *Mol. Pharmacol.* 41 (1992a) 127-133

28. Dilger, J.P., Brett, R.S., Mody, H.I.: The effects of isoflurane on acetylcholine receptor channels.: 2. Currents elicited by rapid perfusion of acetylcholine. *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 1056-1063
29. Dilger, J.P., Liu, Y.: Desensitization of acetylcholine receptors in BC3H-1 cells. *Pflugers Arch.* 420 (1992b) 479-485
30. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F.: The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 7-61
31. Dingley, J., Ivanova-Stoilova, T.M., Grundler, S., Wall, T.: Xenon: recent developments. *Anaesthesia* 54 (1999) 335-346
32. Drew, C.A., Johnston, G.A., Weatherby, R.P.: Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci. Lett.* 52 (1984) 317-321
33. Dzoljic, M.: Nitrous Oxide. A study on neurons., Foundation for Single Cell Research, Leiden, Niederlande, 1996, 1. Auflage
34. Dzoljic, M., Erdmann, W., Dzoljic, M.R.: Visual evoked potentials and nitrous oxide-induced neuronal depression: role for benzodiazepine receptors. *Br. J. Anaesth.* 77 (1996b) 522-525
35. Dzoljic, M., Van Duijn, B.: Nitrous oxide-induced enhancement of gamma-aminobutyric acid-mediated chloride currents in acutely dissociated hippocampal neurons. *Anesthesiology* 88 (1998) 473-480
36. Edwards, M.D., Lees, G.: Modulation of a recombinant invertebrate gamma-aminobutyric acid receptor-chloride channel complex by isoflurane: effects of a point mutation in the M2 domain. *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 726-732
37. Eger, E.I., Saidman, L.J., Brandstater, B.: Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 26 (1965) 756-763
38. Emmanouil, D.E., Johnson, C.H., Quock, R.M.: Nitrous oxide anxiolytic effect in mice in the elevated plus maze: mediation by benzodiazepine receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 115 (1994) 167-172

39. Emmanouil, D.E., Quock, R.M.: Modification of nitrous oxide analgesia by benzodiazepine receptors. *Anesth. Prog.* 36 (1989) 5-8
40. Fahrmeir, L., Künstler, R., Pigeot, I., and Tutz, G.: Statistik, Springer-Verlag, Berlin, 1997, 1. Auflage
41. Feigenspan, A., Bormann, J.: Facilitation of GABAergic signaling in the retina by receptors stimulating adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 10893-10897
42. Firestone, L.L., Sauter, J.F., Braswell, L.M., Miller, K.W.: Actions of general anesthetics on acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo californica*. *Anesthesiology* 64 (1986) 694-702
43. Flood, P., Krasowski, M.D.: Intravenous anesthetics differentially modulate ligand-gated ion channels. *Anesthesiology* 92 (2000) 1418-1425
44. Franke, C., Hatt, H., Dudel, J.: Liquid filament switch for ultra-fast exchanges of solutions at excised patches of synaptic membrane of crayfish muscle. *Neurosci. Lett.* 77 (1987) 199-204
45. Franks, N.P., Dickinson, R., de Sousa, S.L., Hall, A.C., Lieb, W.R.: How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 396 (1998) 324
46. Franks, N.P., Lieb, W.R.: Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 300 (1982) 487-493
47. Franks, N.P., Lieb, W.R.: Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels. *Br. J. Anaesth.* 71 (1993) 65-76
48. Franks, N.P., Lieb, W.R.: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367 (1994) 607-614
49. Freund, T.F., Buzsaki, G.: Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6 (1996) 347-470
50. Gage, P.W., Robertson, B.: Prolongation of inhibitory postsynaptic currents by pentobarbitone, halothane and ketamine in CA1 pyramidal cells in rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 85 (1985) 675-681

51. Gonsowski, C.T., Eger, E.I.: Nitrous oxide minimum alveolar anesthetic concentration in rats is greater than previously reported. *Anesth. Analg.* 79 (1994) 710-712
52. Goodchild, C.S.: GABA receptors and benzodiazepines. *Br. J. Anaesth.* 71 (1993) 127-133
53. Greger, R.: Membranpotential. In: "Lehrbuch der Physiologie", Klinker, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996, 2. Auflage, 47-58
54. Gurley, D., Amin, J., Ross, P.C., Weiss, D.S., White, G.: Point mutations in the M2 region of the alpha, beta, or gamma subunit of the GABA_A channel that abolish block by picrotoxin. *Receptors. Channels.* 3 (1995) 13-20
55. Hales, T.G., Lambert, J.J.: The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones. *Br. J. Pharmacol.* 104 (1991) 619-628
56. Hall, A.C., Lieb, W.R., Franks, N.P.: Stereoselective and non-stereoselective actions of isoflurane on the GABA_A receptor. *Br. J. Pharmacol.* 112 (1994) 906-910
57. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391 (1981) 85-100
58. Hapfelmeier, G., Schneck, H., Kochs, E.: Sevoflurane potentiates and blocks GABA-induced currents through recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptors: implications for an enhanced GABAergic transmission. *Eur. J. Anaesthesiol.* 18 (2001) 377-383
59. Harrison, N.L., Kugler, J.L., Jones, M.V., Greenblatt, E.P., Pritchett, D.B.: Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 628-632
60. Harrison, N.L., Vicini, S., Barker, J.L.: A steroid anesthetic prolongs inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 7 (1987) 604-609

61. Haseneder, R., Rammes, G., Zieglgänsberger, W., Kochs, E., Hapfelmeier, G.: GABA_A receptor activation and open-channel block by volatile anaesthetics: a new principle of receptor modulation? *Eur. J. Pharmacol.* 451 (2002) 43-50
62. Hayashi T, Nagai K: Action of ω -amino acids in the motor cortex of higher animals, especially γ -amino- β -oxy-butyric acid as the real inhibitory principle in the brain. Abstract. *20th International Physiology Congress, Brüssel* (1956) 410
63. Hill, D.R., Bowery, N.G.: ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* 290 (1981) 149-152
64. Hirota, K., Roth, S.H.: Sevoflurane modulates both GABA_A and GABA_B receptors in area CA1 of rat hippocampus. *Br. J. Anaesth.* 78 (1997) 60-65
65. Hirouchi, M., Kuriyama, K.: Molecular pharmacology of GABA_A and GABA_B receptors. *Nippon. Yakurigaku. Zasshi.* 104 (1994) 199-206
66. Holland, K.D., Canney, D.J., Rothman, S.M., Ferrendelli, J.A., Covey, D.F.: Physiological modulation of the GABA receptor by convulsant and anticonvulsant barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 516 (1990) 147-150
67. Hornbein, T.F., Eger, E.I., Winter, P.M., Smith, G., Wetstone, D., Smith, K.H.: The minimum alveolar concentration of nitrous oxide in man. *Anesth. Analg.* 61 (1982) 553-556
68. Im, W.B., Blakeman, D.P., Davis, J.P., Ayer, D.E.: Studies on the mechanism of interactions between anesthetic steroids and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol. Pharmacol.* 37 (1990) 429-434
69. Inoue, M., Akaike, N.: Blockade of gamma-aminobutyric acid-gated chloride current in frog sensory neurons by picrotoxin. *Neurosci. Res.* 5 (1988) 380-394

70. Jahn, K., Hertle, I., Bufler, J., Adelsberger, H., Pestel, E., Zieglgänsberger, W., Dudel, J., Franke, C.: Activation kinetics and single channel properties of recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A receptor channels. *Neuroreport*. 8 (1997) 3443-3446
71. Jenkins, A., Franks, N.P., Lieb, W.R.: Effects of temperature and volatile anesthetics on GABA_A receptors. *Anesthesiology* 90 (1999) 484-491
72. Jevtovic-Todorovic, V., Todorovic, S.M., Mennerick, S., Powell, S., Dikranian, K., Benschhoff, N., Zorumski, C.F., Olney, J.W.: Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat. Med.* 4 (1998) 460-463
73. Johnston, G.A.: Molecular Biology, Pharmacology, and Physiology of GABA_C Receptors. In: "The GABA Receptors", Enna, S.J., Bowery, N.G. (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, 1996, 2. Auflage, 297-324
74. Jones, M.V., Brooks, P.A., Harrison, N.L.: Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl⁻ currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *J. Physiol. (Lond.)* 449:279-93 (1992) 279-293
75. Jones, M.V., Harrison, N.L.: Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 70 (1993) 1339-1349
76. Jones, M.V., Westbrook, G.L.: Desensitized states prolong GABA_A channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* 15 (1995) 181-191
77. Jones, M.V., Westbrook, G.L.: The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends. Neurosci.* 19 (1996) 96-101
78. Kandel, E.R., Hawkins, R.D.: Molekulare Grundlagen des Lernens. *Spektrum der Wissenschaft* 11 (1992) 36-45
79. Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B.: Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386 (1997) 239-246

80. Kendig, J.J., MacIver, M.B., Roth, S.H.: Anesthetic actions in the hippocampal formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 625 (1991) 37-53
81. Kira, T., Harata, N., Sakata, T., Akaike, N.: Kinetics of sevoflurane action on GABA- and glycine-induced currents in acutely dissociated rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 85 (1998) 383-394
82. Klinke, R.: Erregungsübertragung in Zellverbänden. In: "Lehrbuch der Physiologie", Klinke, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996, 2. Auflage, 59-78
83. Koblin, D.D., Fang, Z., Eger, E.I., Laster, M.J., Gong, D., Ionescu, P., Halsey, M.J., Trudell, J.R.: Minimum alveolar concentrations of noble gases, nitrogen, and sulfur hexafluoride in rats: helium and neon as nonimmobilizers (nonanesthetics). *Anesth. Analg.* 87 (1998) 419-424
84. Krampfl, K., Lepier, A., Jahn, K., Franke, C., Bufler, J.: Molecular modulation of recombinant rat $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptor channels by diazepam. *Neurosci. Lett.* 256 (1998) 143-146
85. Krasowski, M.D., O'Shea, S.M., Rick, C.E., Whiting, P.J., Hadingham, K.L., Czajkowski, C., Harrison, N.L.: Alpha subunit isoform influences GABA_A receptor modulation by propofol. *Neuropharmacology* 36 (1997) 941-949
86. Krauss, W., Gestrich, W.: Schnellmethode zur Bestimmung von Gaslöslichkeiten in Flüssigkeiten: Isotherme und isobare Gasvolumenkonzentration. *Chemie-Technik* 1 (1977) 35-37
87. Kravitz, E.A.: Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea. III. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. *J. Neurophysiol.*(1963) 831-850
88. Krnjevic, K., Schwartz, S.: The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp. Brain Res.* 3 (1967) 320-336
89. Krogsgaard-Larsen, P., Frolund, B., Ebert, B.: GABA_A Receptor Agonists, Partial Agonists, and Antagonists. In: "The GABA Receptors", Enna, S.J., Bowery, N.G. (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, 1996, 37-82

90. Kullmann, D.M., Asztely, F., Walker, M.C.: The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1551-1561
91. Kuriyama, K., Hirouchi, M., Kimura, H.: Neurochemical and molecular pharmacological aspects of the GABA_B receptor. *Neurochem. Res.* 25 (2000) 1233-1239
92. Kuriyama, K., Hirouchi, M., Nakayasu, H.: Structure and function of cerebral GABA_A and GABA_B receptors. *Neurosci. Res.* 17 (1993) 91-99
93. Lambert, J.J., Belelli, D., Pistis, M., Hill-Venning, C., Peters, J.A.: The Interaction of Intravenous Anesthetic Agents with Native and Recombinant GABA_A Receptors: An Electrophysiological Study. In: "The GABA Receptors", Enna, S.J., Bowery, N.G. (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, 1996, 121-156
94. Lambert, J.J., Peters, J.A., Sturgess, N.C., Hales, T.G.: Steroid modulation of the GABA_A receptor complex: electrophysiological studies. *Ciba. Found. Symp.* 153 (1990) 56-71
95. Larsen, R.: Anästhesie, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1999, 6. Auflage
96. Lavoie, A.M., Tingey, J.J., Harrison, N.L., Pritchett, D.B., Twyman, R.E.: Activation and deactivation rates of recombinant GABA_A receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform. *Biophys. J.* 73 (1997) 2518-2526
97. Lees, G., Edwards, M.D.: Modulation of recombination human gamma-aminobutyric acidA receptors by isoflurane: influence of the delta subunit. *Anesthesiology* 88 (1998) 206-217
98. Lin, L.H., Chen, L.L., Zirrolli, J.A., Harris, R.A.: General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acidA receptors expressed by *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1992) 569-578

99. Lin, L.H., Whiting, P., Harris, R.A.: Molecular determinants of general anesthetic action: role of GABA_A receptor structure. *J. Neurochem.* 60 (1993) 1548-1553
100. Little, H.J., Atkinson, H.D.: Ketamine potentiates the responses of the rat superior cervical ganglion to GABA. *Eur. J. Pharmacol.* 98 (1984) 53-59
101. Löffler, G.: Replikation und Gentechnik. In: "Biochemie und Pathobiochemie", Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997, 5. Auflage, 205-237
102. Maccaferri, G., Roberts, J.D., Szucs, P., Cottingham, C.A., Somogyi, P.: Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 524 (2000) 91-116
103. Macdonald, A.G., Ramsey, R.L.: The effects of nitrous oxide on a glutamate-gated ion channel and their reversal by high pressure; a single channel analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1236 (1995) 135-141
104. Macdonald, R.L., Olsen, R.W.: GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 569-602
105. Macdonald, R.L., Rogers, C.J., Twyman, R.E.: Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABA_A receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)* 417 (1989) 483-500
106. Maconochie, D.J., Zempel, J.M., Steinbach, J.H.: How quickly can GABA_A receptors open? *Neuron* 12 (1994) 61-71
107. Masson, J., Sagne, C., Hamon, M., El Mestikawy, S.: Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 439-464
108. McCray, J.A., Trentham, D.R.: Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:239-70. (1989) 239-270

109. Mennerick, S., Jevtovic-Todorovic, V., Todorovic, S.M., Shen, W., Olney, J.W., Zorumski, C.F.: Effect of nitrous oxide on excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 18 (1998) 9716-9726
110. Meyer, H.H.: Welche Eigenschaft der Anaesthetica bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch. Exper. Pathol. Pharmacol.* 42 (1899) 109-119
111. Mihalek, R.M., Banerjee, P.K., Korpi, E.R., Quinlan, J.J., Firestone, L.L., Mi, Z.P., Lagenaur, C., Tretter, V., Sieghart, W., Anagnostaras, S.G., Sage, J.R., Fanselow, M.S., Guidotti, A., Spigelman, I., Li, Z., DeLorey, T.M., Olsen, R.W., Homanics, G.E.: Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 12905-12910
112. Mihic, S.J., Harris, R.A.: Inhibition of rho1 receptor GABAergic currents by alcohols and volatile anesthetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 (1996) 411-416
113. Mistry, D.K., Cottrell, G.A.: Actions of steroids and bemegride on the GABA_A receptor of mouse spinal neurones in culture. *Exp. Physiol.* 75 (1990) 199-209
114. Moody, E.J., Suzdak, P.D., Paul, S.M., Skolnick, P.: Modulation of the benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid receptor chloride channel complex by inhalation anesthetics. *J. Neurochem.* 51 (1988) 1386-1393
115. Möhler, H., Benke, D., Benson, J., Lüscher, B., Rudolph, U., Fritschy, J.M.: Diversity in Structure, Pharmacology, and Regulation of GABA_A Receptors. In: "The GABA Receptors", Enna, S.J., Bowery, N.G. (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, 1996a, 2. Auflage, 11-36
116. Möhler, H., Benke, D., Fritschy, J.M.: GABA_B-receptor isoforms molecular architecture and distribution. *Life Sci.* 68 (2001) 2297-2300
117. Möhler, H., Fritschy, J.M., Luscher, B., Rudolph, U., Benson, J., Benke, D.: The GABA_A receptors. From subunits to diverse functions. *Ion. Channels.* 4 (1996b) 89-113

118. Nakahiro, M., Yeh, J.Z., Brunner, E., Narahashi, T.: General anesthetics modulate GABA receptor channel complex in rat dorsal root ganglion neurons. *FASEB J.* 3 (1989) 1850-1854
119. Neher, E., Steinbach, J.H.: Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J. Physiol. (Lond.)* 277 (1978) 153-176
120. Neumahr, S., Hapfelmeier, G., Scheller, M., Schneck, H., Franke, C., Kochs, E.: Dual action of isoflurane on the gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated currents through recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-receptor channels. *Anesth. Analg.* 90 (2000) 1184-1190
121. Nishikawa, K., MacIver, M.B.: Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology* 92 (2000) 228-236
122. Numberger, M., Draguhn, A.: Patch-Clamp-Technik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 1996, 1. Auflage
123. Olbrich, H.G., Braak, H.: Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol. (Berl.)* 173 (1985) 105-110
124. Olsen, R.W., Sapp, D.M., Bureau, M.H., Turner, D.M., Kokka, N.: Allosteric actions of central nervous system depressants including anesthetics on subtypes of the inhibitory gamma-aminobutyric acidA receptor-chloride channel complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 625 (1991) 145-154
125. Olsen, R.W., Tobin, A.J.: Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4 (1990) 1469-1480
126. Orser, B.A., Wang, L.Y., Pennefather, P.S., MacDonald, J.F.: Propofol modulates activation and desensitization of GABA_A receptors in cultured murine hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 14 (1994) 7747-7760

-
127. Otsuka, M., Iversen, L.L., Hall, Z.W., Kravitz, E.A.: Release of gamma-aminobutyric acid from inhibitory nerves of lobster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56 (1966) 1110-1115
128. Overton, C.E.: Studien über die Narkose. Zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie., Fischer-Verlag, Jena, 1901
129. Parker, I., Gundersen, C.B., Miledi, R.: Actions of pentobarbital on rat brain receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 6 (1986) 2290-2297
130. Pearce, R.A.: Volatile anaesthetic enhancement of paired-pulse depression investigated in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 492 (1996) 823-840
131. Peduto, V.A., Concas, A., Santoro, G., Biggio, G., Gessa, G.L.: Biochemical and electrophysiologic evidence that propofol enhances GABAergic transmission in the rat brain. *Anesthesiology* 75 (1991) 1000-1009
132. Petrides, P.E.: Aminosäuren und Polyaminosäuren (Proteine). In: "Biochemie und Pathobiochemie", Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997a, 5. Auflage, 33-82
133. Petrides, P.E.: Gendiagnostik und Getherapie. In: "Biochemie und Pathobiochemie", Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997b, 5. Auflage, 317-355
134. Petrides, P.E.: Nervengewebe. In: "Biochemie und Pathobiochemie", Löffler, G., Petrides, P.E. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997c, 5. Auflage, 971-993
135. Polc, P.: Electrophysiology of benzodiazepine receptor ligands: multiple mechanisms and sites of action. *Prog. Neurobiol.* 31 (1988) 349-423
136. Pritchett, D.B., Luddens, H., Seeburg, P.H.: Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* 245 (1989) 1389-1392

-
137. Proctor, W.R., Mynlieff, M., Dunwiddie, T.V.: Facilitatory action of etomidate and pentobarbital on recurrent inhibition in rat hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 6 (1986) 3161-3168
138. Raines, D.E., Zachariah, V.T.: Isoflurane increases the apparent agonist affinity of the nicotinic acetylcholine receptor. *Anesthesiology* 90 (1999) 135-146
139. Roberts, E., Frankel, S.: Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* (1950) 55-63
140. Robertson, B.: Actions of anaesthetics and avermectin on GABA_A chloride channels in mammalian dorsal root ganglion neurones. *Br. J. Pharmacol.* 98 (1989) 167-176
141. Rogers, C.J., Twyman, R.E., Macdonald, R.L.: Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABA_A receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* 475 (1994) 69-82
142. Sakmann, B., Hamill, O.P., Bormann, J.: Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitter GABA and glycine in mammalian spinal neurons. *J. Neural Transm. Suppl.* 18 (1983) 83-95
143. Sanna, E., Mascia, M.P., Klein, R.L., Whiting, P.J., Biggio, G., Harris, R.A.: Actions of the general anesthetic propofol on recombinant human GABA_A receptors: influence of receptor subunits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274 (1995) 353-360
144. Scheller, M., Bufler, J., Schneck, H., Kochs, E., Franke, C.: Isoflurane and sevoflurane interact with the nicotinic acetylcholine receptor channels in micromolar concentrations. *Anesthesiology* 86 (1997) 118-127
145. Schofield, P.R., Darlison, M.G., Fujita, N., Burt, D.R., Stephenson, F.A., Rodriguez, H., Rhee, L.M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T.A.: Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328 (1987) 221-227
146. Scholfield, C.N.: Potentiation of inhibition by general anaesthetics in neurones of the olfactory cortex in vitro. *Pflugers Arch.* 383 (1980) 249-255

-
147. Seeburg, P.H., Wisden, W., Verdoorn, T.A., Pritchett, D.B., Werner, P., Herb, A., Luddens, H., Sprengel, R., Sakmann, B.: The GABA_A receptor family: molecular and functional diversity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55 (1990) 29-40
148. Segal, M., Barker, J.L.: Rat hippocampal neurons in culture: voltage-clamp analysis of inhibitory synaptic connections. *J. Neurophysiol.* 52 (1984) 469-487
149. Shimada, S., Cutting, G., Uhl, G.R.: gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 41 (1992) 683-687
150. Singer, S.J., Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (1972) 720-731
151. Skerritt, J.H., Willow, M., Johnston, G.A.: Diazepam enhancement of low affinity GABA binding to rat brain membranes. *Neurosci. Lett.* 29 (1982) 63-66
152. Study, R.E., Barker, J.L.: Diazepam and (-)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 7180-7184
153. Tanelian, D.L., Kosek, P., Mody, I., MacIver, M.B.: The role of the GABA_A receptor/chloride channel complex in anesthesia. *Anesthesiology* 78 (1993) 757-776
154. Tomlin, S.L., Jenkins, A., Lieb, W.R., Franks, N.P.: Stereoselective effects of etomidate optical isomers on gamma-aminobutyric acid type A receptors and animals. *Anesthesiology* 88 (1998) 708-717
155. Trudell, J.R.: A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. *Anesthesiology* 46 (1977) 5-10
156. Trudell, J.R., Koblin, D.D., Eger, E.I.: A molecular description of how noble gases and nitrogen bind to a model site of anesthetic action. *Anesth. Analg.* 87 (1998) 411-418

157. Twyman, R.E., Macdonald, R.L.: Neurosteroid regulation of GABA_A receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *J. Physiol. (Lond.)* 456 (1992) 215-245
158. Twyman, R.E., Rogers, C.J., Macdonald, R.L.: Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann. Neurol.* 25 (1989) 213-220
159. Ueda, I.: Molecular mechanisms of anesthesia. *Keio. J. Med.* 50 (2001) 20-25
160. Upton, N., Blackburn, T.: Pharmacology of Mammalian GABA_A Receptors. In: "The GABA Receptors", Enna, S.J., Bowery, N.G. (Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa NJ, 1996, 2. Auflage, 83-120
161. Vicini, S., Mienville, J.M., Costa, E.: Actions of benzodiazepine and beta-carboline derivatives on gamma-aminobutyric acid-activated Cl⁻ channels recorded from membrane patches of neonatal rat cortical neurons in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243 (1987) 1195-1201
162. Wachtel, R.E.: Relative potencies of volatile anesthetics in altering the kinetics of ion channels in BC3H1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274 (1995) 1355-1361
163. Wakamori, M., Ikemoto, Y., Akaike, N.: Effects of two volatile anesthetics and a volatile convulsant on the excitatory and inhibitory amino acid responses in dissociated CNS neurons of the rat. *J. Neurophysiol.* 66 (1991) 2014-2021
164. Wilhelm, E., Battino, R., Wilcock, R.J.: Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chemical Reviews* 77(2) (1977) 219-262
165. Yamakura, T., Harris, R.A.: Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology* 93 (2000) 1095-1101
166. Yang, J., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F.: Volatile anesthetics gate a chloride current in postnatal rat hippocampal neurons. *FASEB J.* 6 (1992) 914-918

167. Yang, J., Uchida, I.: Mechanisms of etomidate potentiation of GABA_A receptor-gated currents in cultured postnatal hippocampal neurons. *Neuroscience* 73 (1996) 69-78
168. Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., McCabe, D.: In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 9568-9572
169. Yeh, J.Z., Quandt, F.N., Tanguy, J., Nakahiro, M., Narahashi, T., Brunner, E.A.: General anesthetic action on gamma-aminobutyric acid-activated channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 625 (1991) 155-173
170. Zimmerman, S.A., Jones, M.V., Harrison, N.L.: Potentiation of gamma-aminobutyric acidA receptor Cl⁻ current correlates with in vivo anesthetic potency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 987-991

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb. 2.1: Interaktion von erregenden und hemmenden Neurotransmittern	6
Abb. 2.2: Vereinfachtes kinetisches Modell zur Funktionsweise eines Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes	7
Abb. 2.3: Strukturformel des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA)	9
Abb. 2.4: Freisetzung, Wirkung und Wiederaufnahme von GABA an der GABAergen Synapse	10
Abb. 2.5: Schematischer Aufbau des GABA _A -Rezeptors	12
Abb. 2.6: Aufbau einer Untereinheit des GABA _A -Rezeptors	13
Abb. 2.7: Strukturformel von N ₂ O	19
Abb. 2.8: Strukturformel von ISO	21
Abb. 2.9: Schematische Darstellung der beiden wichtigsten Patch-Clamp-Konfigurationen	26
Abb. 2.10: Schematische Darstellung der U-Tube	27
Abb. 4.1: Herstellung einer Whole-Cell-Konfiguration	32
Abb. 4.2: Schemazeichnung des schnellen, piezobetriebenen Applikationssystems	33
Abb. 4.3: Darstellung von Applikation und Desapplikation mit resultierender Stromantwort	34
Abb. 4.4: Messgrößen am Beispiel einer Originalspur	37
Abb. 5.1: GABA-Dosiswirkungskurve am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA _A -Rezeptor	40
Abb. 5.2: Wirkung von Bicucullin und PicROTOXIN am GABA _A -Rezeptor	42
Abb. 5.3: Löslichkeit von N ₂ O und Xe im Zeitverlauf	44
Abb. 5.4: Effekte von N ₂ O und Xe auf GABA-induzierte Chloridströme	45
Abb. 5.5: Die Effekte von N ₂ O und Xe auf Amplitude und Stromanstiegszeit	46
Abb. 5.6: Fehlender Effekt von He auf GABA-induzierte Chloridströme	47
Abb. 5.7: Dualer Effekt von ISO auf die Stromantworten des $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA _A -Rezeptors	48
Abb. 5.8: Wirkung von ISO (0,6 mM) auf GABA-induzierte Ströme	49
Abb. 5.9: Abhängigkeit der Wiederöffnungsströme von der GABA-Konzentration	51
Abb. 5.10: Vergleich des Effekts von ISO und PicROTOXIN auf GABA-induzierte Ströme	52
Abb. 5.11: Effekt von ISO auf "IPSC-artige" Stromantworten (Originalspur)	53
Abb. 5.12: Effekt von ISO auf "IPSC-artige" Stromantworten (gemittelte Daten)	54
Abb. 5.13: Vereinfachtes Reaktionsschema für den $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA _A -Rezeptor	56
Abb. 5.14: Simulierte GABA-Antworten ohne und mit ISO	57
Abb. 5.15: GABAerge Stromantworten unter Einfluss von N ₂ O, ISO, und koappliziertem N ₂ O und ISO	59
Abb. 5.16: Relative Stromamplitude und Wiederöffnungsströme GABA-induzierter Ströme unter Einfluss steigender ISO-Konzentrationen mit und ohne N ₂ O	60
Abb. 5.17: Vereinfachtes Modell für die Effekte von N ₂ O, ISO, und koappliziertem N ₂ O und ISO	62
Abb. 5.18: Vergleich der experimentellen und simulierten GABA-Antworten unter Einfluss von N ₂ O, ISO und gemeinsam appliziertem N ₂ O und ISO	63
Abb. 7.1: Synoptische Übersicht über die erhobenen Befunde und deren Interpretation	72
Tab. 2.1: Auswahl der wichtigsten Agonisten und Antagonisten am GABA _A -Rezeptor	14
Tab. 2.2: Überblick über Wirkmechanismen verschiedener Anästhetika am GABA _A -Rezeptor	18
Tab. 2.3: Überblick über Mechanismen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Anästhetika an verschiedenen ligandengesteuerten Ionenkanälen	23

10. Anhang

10.1. Materialien und Geräte

10.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezug der Chemikalien, wenn nicht gesondert angegeben, bei Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland.

Minimum Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland:

	(mg/l)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	264
KCl	400
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200
NaCl	6800
NaHCO ₃	200
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	158
D-Glucose	1000
Phenolrot	10

Aminosäuren:

L-Arginin-HCl	126
L-Cystin	24
L-Histidin HCl x H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin x HCl	73
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Thyrosin	10
L-Valin	46

Vitamine:

D-Ca Pantothenat	1,0
Cholinchlorid	1,0
Folsäure	1,0
i-Inositol	2,0
Nikotinamid	1,0
Pyridoxal-HCl	1,0
Riboflavin	0,10
Thiamin-HCl	1,0

Phosphat Buffered Saline (PBS)-Puffer:

	(%)
KCl	0,2
NaCl	8,0
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,4
KH ₂ PO ₄	0,2
pH \triangleq 7,3	

Elektroporationspuffer:

	(mM)
KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	50
K-Acetat	20
pH \pm 7,35 (eingestellt mit CH ₃ COOH)	

Magnesiumsulfatlösung:

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 M
pH \pm 7,67 (eingestellt mit NaOH)	

Extrazellulärlösung:

	(mM)
NaCl	162
KCl	5,3
Na ₂ HPO ₄	0,67
KH ₂ PO ₄	0,22
HEPES	15
L-Glucose	5,6
CaCl ₂	2,0
pH \pm 7,35 (eingestellt mit NaOH)	
Osmolarität: 340 mOsm/l	

Intrazellulärlösung:

	(mM)
KCl	140
MgCl ₂	2,0
EGTA	11
HEPES	10
Glucose	10
pH \pm 7,3 (eingestellt mit KOH)	
Osmolarität: 340 mOsm/l	

Weitere Chemikalien:

DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Deutsche Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Sevofluran	Maruishi Pharmaceutical Co., Osaka, Japan
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
GABA, Penicillin/Streptomycin, Trypsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Färbemittel Lissamingrün BN C.I. 44090 (Acid Green)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Plasmid PPK 235	Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Deutschland
cDNA-Inserts für GABA _A -Rezeptor- Untereinheiten	Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Deutschland

Gase:

N ₂ O, Helium, Luft	Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland
Xenon	Messer-Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland

10.1.2. Zellkultur

HEK 293-Zellen (ATCC⁵ CRL 1573) DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

10.1.3. Verbrauchsmittel

Zellpräparation und Transfektion:

Petrischalen (100 x 20 mm) Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 Petrischalen (35 x 20 mm) Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Patch-Clamp-Methodik:

Borosilikat Glaspipetten (GC150TF-10) Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, England

10.1.4. Geräte

Zellpräparation und Transfektion:

Digifuge GL Heraeus Instruments, München, Deutschland
 Lamin Air© Heraeus Instruments, München, Deutschland
 Brutschrank IG 150 Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
 Elektroporationssystem Biotechnologies and Experimental Research, Inc., San Diego, CA, USA

Patch-Clamp-Methodik:

Feinwaage SBC 32 Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
 Elektrodenziehgerät
 DMZ-Universalpuller Zeitz Instruments, Augsburg, Deutschland
 Auflichtmikroskop Axiovert Zeiss, Göttingen, Deutschland
 Fluoreszenzlampe (Filter: 460 nm)
 mit HBO 50 Zeiss, Göttingen, Deutschland
 Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
 Analog-Digital-Wandler
 Digidata 1200 A/D Converter Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
 Piezokristall Minitranslator P-249.20 Physik Instrumente, Waldbronn, Deutschland

EDV-Umgebung:

Power Macintosh 7200/90 Apple Computer, Cupertino, CA, USA
 Vektra Pentium PC Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA
 pClamp 6.0 Software Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
 AxoGraph 3 Software Axon Instruments Inc., Forster City, CA, USA
 SigmaStat 2.03 Software SPSS Sience, Chicago, IL, USA
 Bioq 2.0 Software Parnas & Parnas Neurobiology Lab, Hebrew University, Jerusalem, Israel (www.ls.huji.ac.il/~parnas/BIOQ/bioq.html)

⁵ American Type Culture Collection

10.2. Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. E. Kochs für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Promotion an der Klinik für Anaesthesiologie durchführen zu können, sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung der Arbeit.

Herrn Dr. G. Hapfelmeier für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die vorzügliche Betreuung und Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit.

Herrn Prof. F. Hofmann, der sich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. H. Adelsberger für die Hilfe bei den Computersimulationen.

Herrn Dr. K. Meister für die volumetrische Gaslöslichkeitsmessungen der N₂O- und Xe-gesättigten Lösungen.

Herrn S. Schmidt für die Unterstützung bei der Zellkultur und Transfektion.

10.3. Verzeichnis eigener Publikationen

Originalarbeiten:

Haseneder R., Rammes G., Zieglgänsberger W., Kochs E., Hapfelmeier G.: GABA_A receptor activation and open-channel block by the anaesthetic isoflurane: a new principle of receptor modulation. *Eur J Pharmacol* 2002; 451:43-50

Deiml T., Haseneder R., Zieglgänsberger W., Rammes G., Eisensamer B., Rupprecht R., Hapfelmeier G.: α -Thujone Reduces 5-HT₃ Receptor Activity by an Effect on the Agonist-Induced Desensitization. *submitted (J Neuropharmacol)*

Hapfelmeier G., Tredt C., Haseneder R., Zieglgänsberger W., Kochs E., Eisensamer B., Rupprecht R., Rammes G.: Coexpression of the 5-HT_{3B} Receptor Subunit Determines the Biophysical Properties of the 5-HT₃ Receptor. *Biophys J* 2003; 84:1720-1733

Hapfelmeier G.*, Haseneder R.*, Lampadius, K., Rammes G., Rupprecht R., Zieglgänsberger W.: Cloned Human and Murine 5-HT_{3A} Serotonin Receptors Expressed in Human Embryonic Kidney 293 Cells Display Different Single-Channel Kinetics. *Neurosci Lett* 2002; 335:44-48

Hapfelmeier G., Haseneder R., Kochs E., Beyerle M., Zieglgänsberger W.: Co-administered nitrous oxide enhances the effect of isoflurane on GABAergic transmission by an increase in open-channel block. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298:201-8

Hapfelmeier G., Haseneder R., Eder M., Adelsberger H., Kochs E., Rammes G., Zieglgänsberger W.: Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ -GABA_A receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block. *Neurosci Lett* 2001; 307:97-100

Hapfelmeier G., Haseneder R., Schneck H., Kochs E.: Patch-Clamp-Untersuchungen an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren mittels ultraschnellem Applikations-System. *AINS* 2000; 35:601-3

Hapfelmeier G., Zieglgänsberger W., Haseneder R., Schneck H., Kochs E.: Nitrous oxide and xenon increase the efficacy of GABA at recombinant mammalian GABA_A receptors. *Anesth Analg* 2000; 91:1542-9

Abstracts:

Haseneder R., Kurz J., Zieglgänsberger W., Rammes G., Hapfelmeier G.: Isoflurane reduces glutamatergic neurotransmission in superficial dorsal horn - evidence for a presynaptic site of an analgesic action. *submitted (ASA 2003)*

Kurz J., Haseneder R., Kochs E., Zieglgänsberger W., Hapfelmeier G.: Flupirtine reduces synaptic plasticity in the amygdala of the mouse *in vitro*. *submitted (ASA 2003)*

Hapfelmeier G., Haseneder R., Zieglgänsberger W., Kochs E.: Wie bewirkt Isofluran die zentrale Hemmung? Elektrophysiologie und Computer-Simulationen geben Hinweise zu Wirkmechanismen am GABA_A-Rezeptor. *Anästhesiol Intensivmed* 2001; 42:855-856 (DGAI 2001)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Kochs E.: Isoflurane slows inactivation kinetics of rat recombinant GABA_A receptors: enhancement of GABAergic transmission despite an open-channel block. *Eur J Anaesthesiology* 2002; 19:208-222 (EAA 2001)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Kochs E.: Isofluran und N₂O wirken beide verstärkend, aber nicht additiv am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptor. *Anästhesiol Intensivmed* 2000; 41:823-4 (DGAI 2000)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Scheller M., Neumahr S., Zieglgänsberger W., Schneck H., Kochs E.: Xenon erhöht die GABA-Affinität am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptor. *Anästhesiol Intensivmed* 2000; 41:420, No 1.B.3 (DAK 2000)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Kochs E.: Effects of isoflurane and sevoflurane on the GABA_A receptor: potentiation, activation, and channel block. *J Neurosurgical Anesthesiology* 2000; 12(4):396, No 27 (SNACC 2000)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Kochs E.: Effects of isoflurane and sevoflurane on GABA_A receptor: potentiation, activation, and channel block. *Anesthesiology Sep* 2000; V93, No 3A, A-752 (ASA 2000)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Neumahr S., Scheller M., Schneck H., Kochs E.: N₂O increases the sensitivity of GABA_A receptors (GABA_AR) for GABA. *Anaesthesiology Intensive Therapy* 1999; 29(Suppl 2):41, P55 (EAA 1999)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Schneck H., Kochs E.: Both N₂O and xenon potentiate GABA gating at recombinant GABA_A receptors. *Eur J Anaesthesiology* 2000; 17(Suppl 20):7, No 013 (3rd Meeting ISMG 1999)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Scheller M., Neumahr S., Kochs E.: N₂O induces a leftward shift in the GABA response at recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A receptors (GABA_AR). *J Neurosurgical Anesthesiology* 1999; 11(4):31, No 1305 (SNACC 1999)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Scheller M., Neumahr S., Schneck H., Kochs E.: N₂O and isoflurane are not additive in potentiating the chloride current through recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A receptors (GABA_AR). *J Neurosurgical Anesthesiology* 1999; 11(4):31, No 1304 (SNACC 1999)

Hapfelmeier G., Scheller M., Neumahr S., Franke C., Haseneder R., Kochs E.: N₂O induces a leftward shift in the GABA response at recombinant GABA_A receptors (GABA_AR). *Anesthesiology Sep* 1999; 91(3A):A796 (ASA 1999)

Hapfelmeier G., Haseneder R., Scheller M., Neumahr S., Franke C., Schneck H.: N₂O and isoflurane are not additive in potentiating the chloride current through recombinant GABA_A receptors (GABA_AR). *Anesthesiology Sep* 1999; 91(3A):A795 (ASA 1999)

Scheller M., Hapfelmeier G., Neumahr S., Haseneder R., Schneck H., Kochs E.: Xenon and N₂O have similar actions on recombinant mammalian GABA_A receptors (GABA_AR). *Anesthesiology Sep* 1999; 91(3A):A757 (ASA 1999)

10.4. Lebenslauf

Rainer Thomas Haseneder

Am 22. März 1974 geboren in Regensburg, Sohn von Edgar Haseneder, Lehrer und Christa Haseneder, geb. Barth, Verwaltungsangestellte

Schulbildung:

1980 bis 1984	Grundschule Regensburg-Reinhausen
1984 bis 1993	Werner-von-Siemens Gymnasium, Regensburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1993 bis 1994	Malteser Hilfsdienst, Regensburg
---------------	----------------------------------

Hochschulbildung:

1994 bis 1995	Studium des Maschinenbauwesens, Fachhochschule Regensburg
1995 bis 1997	Medizinstudium, Vorklinischer Studienabschnitt Universität Regensburg
1997 bis 2002	Medizinstudium, Klinischer Studienabschnitt, Technische Universität München
seit 1998	Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation und anschließende wissenschaftliche Mitarbeit an der TU München, Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der Isar
seit 1. August 2002	Arzt im Praktikum, Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der Isar