

Aus der
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Inaugural-Dissertation

**Untersuchung des Einflusses von Inflammation auf den
GAT-1 GABA-Wiederaufnahmetransporter in
organotypischen murinen Rückenmark-Zellkulturen**

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Paul, Wiebke

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Antkowiak
2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Schwarz

Tag der Disputation: 23.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Entzündung und ihre Bedeutung in der Anästhesiologie.....	5
1.2. Die GABAerge Synapse im Rückenmark.....	7
1.3. Die Familie der GABA-Wiederaufnahme-Transporter	9
1.4. Medikamentöse Hemmung des GABA-Wiederaufnahmetransporters GAT-1	11
1.5. Phasische und tonische Inhibition im GABAergen System	12
1.6. Der Wirkmechanismus von Diazepam	13
1.7. Verwendung organotypischer Kulturen	14
1.8. Induktion der Inflammation	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Herstellung der organotypischen Rückenmark-Zellkulturen.....	17
2.2. Behandlung der Kulturen mit LPS	19
2.3. Medikamente und Standardlösungen.....	20
2.4. Extrazelluläre Messungen & Videoaufzeichnungen	21
2.5. Intrazelluläre Messungen	22
2.6. Datenanalyse	25
2.6.1. Auswertung der Extrazellulärdaten	25
2.6.2. Auswertung der Videodaten.....	27
2.6.3. Auswertung der Patch-Clamp-Daten.....	28
3. Ergebnisse	31
3.1. Grundaktivität der organotypischen Kulturen	31
3.2. Wirkung von NO711 in Kulturen ohne und mit LPS Inkubation	35
3.3. Vergleich der Wirkung von Diazepam mit und ohne Entzündung	38
3.4. Beeinflussung der Muskelaktivität durch Entzündung und NO711	46
3.5. Einfluss von Entzündung und NO711 auf inhibitorische postsynaptische Ströme	51
3.6. Einfluss von Entzündung und NO711 auf tonische Ströme.....	55
4. Diskussion	60
4.1. Aussagekraft der organotypischen Kulturen des Rückenmarks	60
4.2. Induktion von Inflammation in Zellkulturen	62

4.3.	Entzündung vermittelt Veränderungen im neuronalen Netzwerk	64
4.4.	GABA _A -Rezeptor und GAT-1 als mögliche Angriffspunkte für Inflammation	66
4.5.	Die Veränderung motoneuronaler Aktivität durch Inflammation	70
4.6.	Der Einfluss von Inflammation auf GABAerge tonische Inhibition	72
4.7.	Ausblick.....	74
5.	Zusammenfassung	76
I.	Veröffentlichung von Teilergebnissen	78
II.	Literaturverzeichnis	81
III.	Erklärung zum Eigenanteil	87
IV.	Danksagung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau einer GABAergen Synapse.....	7
Abb. 2: Fotografie eines ca. 15 Tage alten Mäuseembryos	17
Abb. 3: Fotografie einer organotypischen Co-Kultur des Rückenmarks mit Muskelzellen	18
Abb. 4: Messprotokoll der extrazellulären Messungen und Videoaufzeichnungen	22
Abb. 5: Sicht durch das Mikroskop bei der Patch-Clamp-Technik.....	23
Abb. 6: Messprotokoll der intrazellulären Messungen	24
Abb. 7: Exemplarische Rohdatenspur einer extrazellulären Messung mit NO711	31
Abb. 8: Histogramme der Grundaktivitäten extrazellulärer Messungen ohne und mit LPS-Inkubation.....	32
Abb. 9: Grundaktivität ohne und mit LPS-Inkubation als Boxplot	33
Abb. 10: Grundaktivität am Median geteilt.....	34
Abb. 11: Einfluss der Grundaktivität auf die NO711-Wirksamkeit.....	36
Abb. 12: Normalisierter Effekt von 50 nM NO711 ohne und mit LPS-Inkubation	37
Abb. 13: Rohdatenspur einer extrazellulären Messung mit Diazepam	39
Abb. 14: Einfluss der Grundaktivität auf die Diazepam-Wirksamkeit.....	40
Abb. 15: Normalisierter Effekt von 1,5 µM Diazepam ohne und mit LPS-Inkubation	42
Abb. 16: Auswertung der intrazellulären Messungen mit 5 µM Diazepam	44
Abb. 17: Rohdatenspuren videomikroskopischer Messungen.....	47
Abb. 18: Motoneuronale Aktivität unter verschiedenen Bedingungen	48
Abb. 19: Wirksamkeit von NO711 auf motoneuronale Aktivität	49
Abb. 20: Rohdatenspur einer intrazellulären Messung.....	51
Abb. 21: Abklingzeit und Halbwertsbreite in intrazelluläre Messungen mit 500 nM NO711	53
Abb. 22: Rohdatenspur einer intrazellulären Messung tonischer GABAerger Ströme	56

Abb. 23: Effekt von 500 nM NO711 und 100 μ M Bicucullin auf die Basislinie intrazellulärer Ableitungen mit und ohne Induktion von Entzündung.....	57
Abb. 24: Normalisierter Effekt von 500 nM NO711 und 100 μ M Bicucullin auf die Basislinie.....	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung des Nährmediums der Kulturen	19
Tab. 2: Zusammensetzung der ACSF Lösung	20
Tab. 3: Zusammensetzung der Patch Clamp Pipettenlösung	22
Tab. 4: Bedeutung der Signifikanzsternchen.....	25
Tab. 5: Mittelwerte der IPSC-Parameter mit NO711	52
Tab. 6: Mittelwert und Standardfehler der normalisierten IPSC-Daten mit 500 nM NO711	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACSF	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Cl⁻	Chlorid-Ion
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Caesiumchlorid
CsOH	Caesiumhydroxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	Et Alii
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GAT	GABA-Transporter
GBSS	Gey's balanced salt solution
HEPES	4-((2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Chlorwasserstoff
H₂O	Wasser
Hz	Hertz
IC₅₀	Konzentration der halbmaximalen Hemmung
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPSC	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
K⁺	Kalium-Ion
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mg	Milligramm
Mg²⁺	Magnesium-Ion
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mm	Millimeter
mM	Millimol
mV	Millivolt
Na⁺	Natrium-Ion
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
nM	Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO711	1-[2-[[[(Diphenylmethyl)imino]oxy]ethyl]-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridincarboxylsäure hydrochlorid
pA	Picoampere
RM	Rückenmark
ROI	Region of interest
Tab.	Tabelle
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm

1. Einleitung

1.1. Entzündung und ihre Bedeutung in der Anästhesiologie

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen von Entzündung auf eine für die Anästhesiologie sehr relevante Struktur im Körper: dem Rückenmark.

Entzündung beschreibt die Reaktion des Körpers auf einen schädigenden Reiz. Dieser Reiz kann vielfältiger Natur sein, zum Beispiel eine mechanische Verletzung oder eine chemische Reizung. Der Körper versucht nach der Schädigung mithilfe von Abwehrzellen, Entzündungsmediatoren und anderen Mechanismen den Reiz einzudämmen und die Schädigung zu beseitigen. Fällt diese Reaktion übermäßig stark aus, können körpereigenen Zellen geschädigt werden. Eine überschießende Entzündungsreaktion wird als Sepsis bezeichnet. Dabei kommt es zu einer unverhältnismäßig gesteigerten Aktivierung des Immunsystems und in deren Folge zu Organschäden. Aufgrund der möglichen Organschäden liegen septische PatientInnen meist auf der Intensivstation, werden dort überwacht und oft auch sediert. Hier findet sich eine der Schnittstellen von Entzündung und Anästhesiologie.

Ein Großteil der in der Anästhesiologie gängigen Sedativa, wie beispielsweise Propofol, volatile Anästhetika oder Benzodiazepine, wirken über eine Modulation der Wirkung von γ -Aminobuttersäure (GABA), indem sie mit dem GABA_A-Rezeptor interagieren (Antkowiak & Rammes 2019). Sie können zusätzlich zur Sedierung zu Anxiolyse und antikonvulsiv wirkender, zentraler Muskelrelaxation führen. Damit spiegeln sie auch die Bandbreite der vielen möglichen Wirkungen GABAerg vermittelter Signalweiterleitung wider.

Klinische Beobachtungen legen nahe, dass eine Standarddosis Anästhetikum bei septischen PatientInnen zu einer tieferen Narkose führt als bei PatientInnen ohne Sepsis (Monk et al. 2005, Sessler et al. 2012). Die für eine suffiziente Sedierung benötigten Anästhetika-Dosierungen sind also bei PatientInnen mit systemischer Entzündung geringer.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass periphere Entzündung, zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt, auch zu Veränderungen im zentralen Nervensystem führt (Riazi et al. 2008). Unter anderem wurde gezeigt, dass bei

peripher induzierter Entzündung im zentralen Nervensystem (ZNS) Neuroinflammation, also Entzündung der Nervenzellen, die GABAerge Informationsweiterleitung verändert. Dabei kommt es bei Entzündung im ZNS zu erhöhter Oberflächenexpression des GABA-Rezeptors und erhöhten GABAerg gesteuerten Strömen im Cortex (Serantes et al. 2006). Zudem kommt es entzündungsbedingt zu einer verstärkten synaptischen Inhibition von Neuronen im Hippocampus (Hellstrom et al. 2005).

Bisher nicht bekannt ist, ob Entzündung eine vergleichbare Wirkung auf das GABAerge System im Rückenmark zeigt. Die in Studien beschriebene Erhöhung der GABAergen Netzwerkaktivität durch Entzündung (Serantes et al. 2006, Hellstrom et al. 2005) könnte verantwortlich sein für eine durch Entzündung verstärkte GABAerge Inhibition und dadurch für die beschriebene stärkere Wirkung der Anästhetika (Monk et al. 2005, Sessler et al. 2012).

1.2. Die GABAerge Synapse im Rückenmark

Zunächst soll das GABAerge System genauer betrachtet werden. Ein wichtiger Angriffspunkt für viele Anästhetika ist der Ort der Signalübertragung zwischen den Neuronen – die Synapse. Die GABAerge Synapse besteht aus Prä- und Postsynapse. An der präsynaptischen Membran wird der wichtigste inhibitorische Transmitter, GABA aus Vesikeln ausgeschüttet. GABA diffundiert durch den synaptischen Spalt und löst am Beginn des nächsten Neurons, der Postsynapse, ein inhibitorisches Signal über die für GABA spezifischen GABA_A-Rezeptoren aus.

Abb. 1 zeigt den Aufbau der Synapse schematisch. Es sind sowohl die Prä- und die Postsynapse, als auch die für die vorliegende Arbeit wichtigen Strukturen dargestellt: der GABA-Wiederaufnahme-Transporter 1 (GAT-1), der GABA-Rezeptor sowie der NO711-Wirkungsort am GAT-1 und die Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA-Rezeptor.

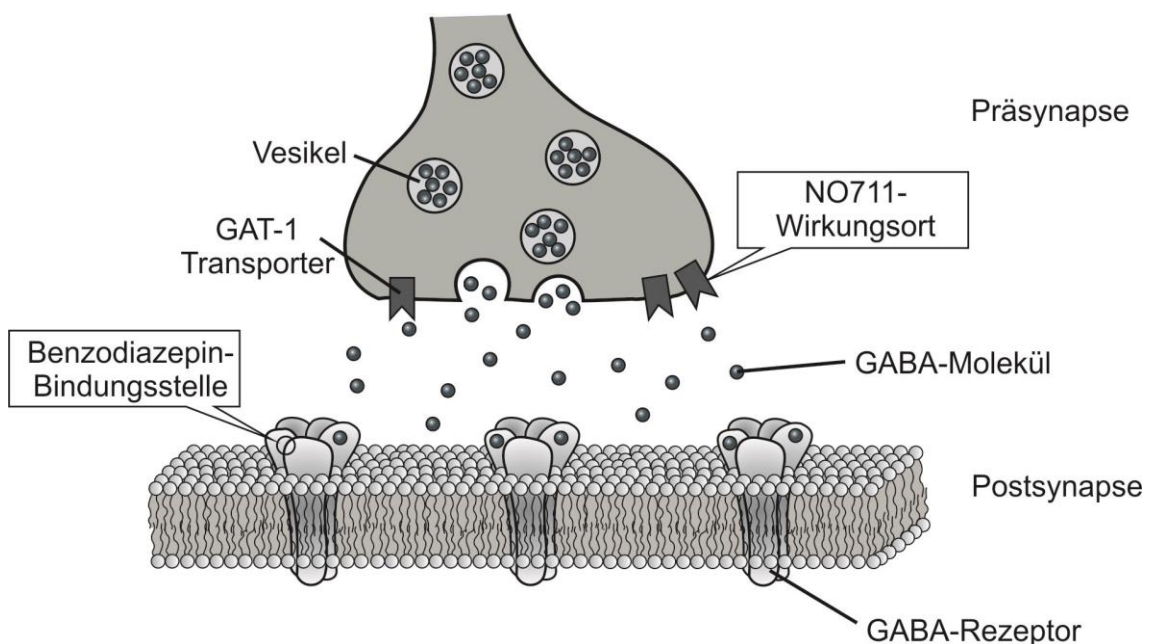


Abb. 1: Aufbau einer GABAergen Synapse

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Prä- und Postsynapse. GABA-Moleküle sind, verpackt in Vesikeln in der Präsynapse und im synaptischen Spalt eingezeichnet. Postsynaptisch sind GABA-Rezeptoren in einer Doppellipidmembran dargestellt. Zusätzlich sind an der Präsynapse mehrere GAT-1 eingezeichnet. Markiert ist der NO711-Wirkungsort am GAT-1 und die Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA-Rezeptor.

(Abbildung modifiziert nach Drexler et al. 2006)

Die Stärke und Dauer des inhibitorischen Signals an der Postsynapse wird von der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt und der extrasynaptischen Konzentration beeinflusst. Sowohl die Konzentration von GABA im synaptischen Spalt als auch die extrasynaptische Konzentration ist unter anderem von der Geschwindigkeit der Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse abhängig. Die Wiederaufnahme wird durch intra- und extrasynaptisch sitzende GABA-Wiederaufnahme-Transporter kontrolliert, zu denen auch GAT-1 gezählt wird (Frahm et al. 2001, Borden 1996, Conti et al. 2004).

An der Postsynapse befinden sich die GABA_A-Rezeptoren, über die das inhibitorische Signal im postsynaptischen Neuron ausgelöst wird. GABA_A ist ein ionotroper Rezeptor und als Heteropentamer aufgebaut. Die fünf Untereinheiten bilden in der Mitte eine für Chloridionen durchlässige Pore.

Bei Aktivierung des Rezeptors durch den inhibitorischen Transmitter GABA wird der Einstrom von Chloridionen in die Zelle erhöht, wodurch es zur Hyperpolarisation und dadurch zur Inhibition der Postsynapse kommt.

Es gibt 19 homologe Untereinheiten aus denen das Heteropentamer zusammengesetzt sein kann (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , ρ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ). Die unterschiedlichen Kombinationen der Untereinheiten lassen eine weitere Unterteilung der GABA_A-Rezeptoren in verschiedene Typen zu (Olsen 2008). Der mit 60% am häufigsten im ZNS nachgewiesene Rezeptortyp ist $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (Whiting 2003).

An den einzelnen Untereinheiten gibt es verschiedene Bindungsstellen. GABA bindet zwischen der α - und der β -Untereinheit an den Rezeptor. Zusätzlich zu der GABA-Bindungsstelle existieren weitere Bindungsstellen für einige Medikamente, wie zum Beispiel die Benzodiazepin-Bindungsstelle (Whiting 2003).

Die verschiedenen Untereinheiten des Rezeptors haben unterschiedliche Funktionen. So wird beispielsweise Immobilisation hauptsächlich über die β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors im Rückenmark vermittelt (Antkowiak 2015), während unter anderem die α_1 -Untereinheit Sedierung vermittelt (McKernan et al. 2000). Beschrieben ist, dass Inflammation hauptsächlich die Oberflächenexpression extrasynaptischer GABA-Rezeptoren mit α_5 -Untereinheit steigert (Wang et al. 2012), was einen möglichen Mechanismus der Anästhetika-Hypersensibilität bei Inflammation darstellen kann (Avramescu

2016). Die verschiedenen Funktionen der Untereinheiten sind in der Anästhesie von hohem Interesse. Medikamente, welche nur an eine Untereinheit binden, haben eine spezifischere Wirkung und können weniger Nebenwirkungen aufweisen (Drexler et al. 2006).

Zur Terminierung der durch den Rezeptor vermittelten Inhibition wird der Transmitter durch die GABA-Wiederaufnahme-Transporter wieder in die Präsynapse aufgenommen und dort erneut in Vesikel verpackt. Auch eine Blockade der beschriebenen Wiederaufnahme führt zu einem Mehrangebot an GABA und so zu verstärkter postsynaptischer Inhibition.

1.3. Die Familie der GABA-Wiederaufnahme-Transporter

Es gibt vier verschiedene GABA-Wiederaufnahme-Transporter: GAT-1, GAT-2, GAT-3 und den Betanin-GABA-Transporter 1 (BGT-1) (Borden 1996, Conti et al. 2004). Diese unterscheiden sich im Vorkommen, der Affinität und den Aufgaben. Einige Transporter dienen spezifisch der Wiederaufnahme von GABA in schnelle inhibitorische Synapsen. Dadurch sind sie für die Dauer und Stärke des Chlorid-Einstroms in die Postsynapse und damit das weitergeleitete hemmende Signal entscheidend. Andere, extrasynaptisch sitzende Transporter regulieren die GABA-Konzentration außerhalb des synaptischen Spalts (Conti et al. 2004).

Von den unterschiedlichen Eigenschaften der Transporter lässt sich auch auf ihre Relevanz und Funktionsweise schließen. GAT-1 und GAT-3 weisen, im Vergleich zu anderen GABA-Wiederaufnahme-Transportern eine sehr hohe Affinität zu GABA auf. BGT-1 beispielsweise hat mit einer Michaeliskonstante von $K_m=80 \mu\text{M}$ die niedrigste, GAT-3 im Vergleich dazu mit $K_m=0,8 \mu\text{M}$ die höchste Affinität. GAT-1 liegt mit einem K_m -Wert von $8 \mu\text{M}$ dazwischen. Die Michaeliskonstante leitet sich aus der Michaelis-Menten-Gleichung ab und entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. GABA ist im Extrazellulärraum des Gehirns während des Ruhemembranpotentials nur in sehr geringer Konzentration ($0,4 \mu\text{M}$) nachzuweisen (Carver & Reddy 2013). Diese Konzentration liegt unterhalb des K_m -Wertes von GAT-3. Während der Depolarisation der Zellmembran steigt die Konzentration auf $3,1 \mu\text{M}$ (Attwell et al. 1993). Von der niedrigen Konzentration in Ruhe kann man

auf eine effiziente Elimination von GABA durch die GABA-Wiederaufnahmetransporter aus dem Extrazellulärraum schließen. BGT-1 ist bei dieser niedrigen Konzentration durch den vergleichsweise hohen K_m -Wert weniger relevant für die Elimination als GAT-1 und GAT-3 im Gehirn. Zusätzlich sind GAT-1 und GAT-3 im ZNS von Mäusen stärker exprimiert als BGT-1. Sowohl die Expression als auch die Funktion der Transporter ist bei vielen Säugetierspezies sehr ähnlich (Belelli et al. 2009, Zhou & Danbolt 2013).

Die GABA-Wiederaufnahmetransporter bewegen über einen Cotransport von zwei Na^+ und einem Cl^- ein GABA-Molekül, sind also sowohl vom Natrium- als auch vom Chloridgradienten abhängig (Jin et al. 2011).

Die Transporter sind im ZNS unterschiedlich verteilt. Die höchste Konzentration von GAT-1 finden sich im cerebralen Cortex, die höchste Konzentration von GAT-3 hingegen im Hirnstamm. GAT-2 und BGT-1 werden hauptsächlich nicht im ZNS, sondern in der Leber und in den Nieren exprimiert (Lopez-Corcuera et al. 1992). Da in der vorliegenden Arbeit mit den Zellen von Mäusen gearbeitet wird, ist im Verlauf das ZNS von Mäusen Forschungsgrundlage, außer es ist explizit eine andere Spezies benannt.

GAT-1 entwickelt sich während der Embryonalphase nicht an allen Stellen des ZNS gleich schnell. Am 15. Tag der embryonalen Entwicklung (E15) findet sich GAT-1 hauptsächlich an der Präsynapse inhibitorischer Axone im Hinterhorn. Noch bevor die GABAergen Synapsen im Hinterhorn vollständig ausgebildet sind, beginnt der Transporter dort schon pränatal mit der Wiederaufnahme von GABA. Bis zum 21. postnatalen Tag steigt die Konzentration des GAT-1 weiter an und die Synapsen reifen. Im Vorderhorn werden schon früh GABAerge Synapsen ausgebildet, im Gegensatz zum Hinterhorn wird jedoch erst spät in der embryonalen Entwicklung GAT-1 an den Synapsen exprimiert. GAT-3 wird im Vorderhorn bis E12 und im Hinterhorn bis E15 entwickelt und ist in den Astrozyten lokalisiert, dort nimmt es GABA in die Astrozytenfortsätze auf (Kim et al. 2014).

Die GABA-Wiederaufnahme-Transporter spielen, durch die hohe Affinität zu GABA und die häufige Expression, im gesamten ZNS eine wichtige Rolle bei der Beendigung der GABAergen Inhibition an der Postsynapse. Eine Veränderung in

diesem System, beispielsweise durch Inflammation, könnte weitreichende Folgen in Bezug auf die extrazelluläre GABA-Konzentration und somit auch auf die Wirkung von Medikamenten haben. So führt Inflammation, wie schon in Kapitel 1.1 beschrieben, zu einer stärkeren Wirksamkeit von Anästhetika (Avramescu et al. 2016). Ob dabei ein möglicher Einfluss von Inflammation auf den Wiederaufnahme-Mechanismus für GABA eine Rolle spielt, ist bisher nicht bekannt.

Um eventuelle Auswirkungen von Inflammation speziell an GAT-1 zu testen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit NO711, einem GABA-Wiederaufnahmehemmer, welcher für GAT-1 spezifisch ist, gearbeitet.

1.4. Medikamentöse Hemmung des GABA-Wiederaufnahmetransporters GAT-1

Die verwendete Substanz NO711 (1-[2-[[[(Diphenylmethyl)imino]oxy]ethyl]-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridincarboxylsäure Hydrochlorid) der Firma SIGMA-Aldrich® (St. Louis, USA) gehört zu den selektiven und potenten GABA-Wiederaufnahmehemmern. NO711 setzt am GAT-1 an und blockiert hier die Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse (Suzdak et al. 1992), wirkt dabei jedoch nicht als Substrat am Transporter (Keros & Hablitz 2005). Es ist dreifach selektiver am GAT-1 als andere GAT-1-selektive Wiederaufnahmehemmer und hat einen IC_{50} von 47 nM (Suzdak et al. 1992).

Im klinischen Alltag wird eine ähnliche Wirkung durch das 1996 auf den Markt gebrachte Antikonvulsivum Tiagabin erzielt. Dieses hat ebenfalls eine hohe Affinität spezifisch zum GAT-1 (Fattorini et al. 2017) und blockiert an diesem die Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse (Borden 1996, Borden et al. 1994, Froestl 2011, Madsen et al. 2010, Skovstrup et al. 2010).

Durch Blockade der Wiederaufnahme kommt es über die Anreicherung von GABA im synaptischen Spalt zu einer Verstärkung inhibitorischer Ströme (Smith et al. 2007) und einer erhöhten Diffusion. Durch die Abdiffusion des Transmitters aus dem synaptischen Spalt werden weitere, in räumlicher Nähe liegende, extrasynaptische GABA-Rezeptoren angesprochen (Gonzalez-Burgos et al. 2009, Keros & Hablitz 2005, Nusser & Mody 2002, Semyanov et al. 2003). Diese Art von Inhibition des neuronalen Systems durch extrasynaptische GABA-Rezeptoren wird als tonische Inhibition bezeichnet.

1.5. Phasische und tonische Inhibition im GABAergen System

Man unterscheidet bei GABAerger Inhibition zwischen phasischer und tonischer Inhibition. Phasische Inhibition findet durch Wirkung von GABA an intrasynaptisch sitzenden Rezeptoren, tonische Inhibition durch GABAerge Wirkung an extrasynaptischen Rezeptoren statt. Die extrasynaptischen Rezeptoren binden dabei Transmitter aus dem umliegenden Extrazellulärraum ohne gezielt von einer Präsynapse angesteuert worden zu sein (Nusser & Mody 2002).

Allgemeinanästhetika wirken sowohl über intra- als auch über extrasynaptische GABA-Rezeptoren (Chiara et al. 2016). Die involvierten Rezeptoren sind dabei meist GABA_A-Rezeptoren, bei denen statt der γ -Untereinheit eine δ -Untereinheit vorhanden ist (Estler 2007), oder Rezeptoren, die eine $\alpha 5$ -Untereinheit aufweisen (Brickley & Mody 2012). Die GABA_A-Rezeptoren mit δ -Untereinheit werden auch als „One-glass-of-wine“-Rezeptoren bezeichnet, da sie für die typischen Verhaltensveränderungen unter Alkoholeinfluss verantwortlich sind (Olsen et al. 2007). Die Rezeptoren der beiden Inhibitions-Wege können hinsichtlich ihrer Kinetik unterschieden werden. So werden Rezeptoren, welche für phasische Inhibition verantwortlich sind, nach einem Aktionspotential schnell inaktiviert, während tonische Rezeptoren einen konstanteren Strom aufweisen (Semyanov et al. 2004). Tonische Rezeptoren werden von niedrigeren GABA-Konzentrationen als phasische Rezeptoren aktiviert, weisen jedoch eine geringere Wirksamkeit auf nachfolgende Signalkaskaden auf (Zhou et al. 2018).

1.6. Der Wirkmechanismus von Diazepam

Als möglicher Angriffspunkt von Entzündung kommen nicht nur die GABA-Wiederaufnahmetransporter an der Präsynapse infrage, sondern auch der postsynaptische GABA_A-Rezeptor. Um die dort möglichen Veränderungen darzustellen, benötigt man eine Substanz, welche ihre Wirkung am GABA-Rezeptor vermittelt, wie es beispielsweise die Benzodiazepine tun. Diazepam gehört dabei mit einer Halbwertszeit von 20-50 h zu den langwirksamen Benzodiazepinen und verstärkt die inhibierende Wirkung von GABA.

Zwischen der α -Untereinheit und der γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors gibt es eine spezifische Bindungsstelle für Benzodiazepine. Über die Bindung daran verstärken sie die Affinität von GABA an der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und wirken so als allosterische Agonisten (Sigel et al. 1998). Durch die verstärkte Bindung von GABA kommt es zu einer Konformationsänderung des Chloridkanals. Die Folgen davon sind ein verlängerter Chlorideinstrom, Hyperpolarisation und eine herabgesetzte neuronale Aktivität (Dellas 2014). Benzodiazepine wirken also nur in Anwesenheit von GABA und unterliegen dem sogenannten Ceiling-Effekt, d.h. die maximale Wirksamkeit der Benzodiazepine ist mit der maximalen ausgeschütteten GABA-Konzentration erreicht.

Benzodiazepine wirken antiepileptisch, hypnotisch und sedativ (Karow 2015). Die sedierende Wirkung von Diazepam, welche klinisch gern genutzt wird, wird von GABA-Rezeptoren vermittelt, die eine α_1 -Untereinheit besitzen (Antkowiak 2015, McKernan et al. 2000). Die muskelrelaxierende Wirkung des Diazepams wird hauptsächlich durch die α_2 -, α_3 - und α_5 -Untereinheit vermittelt (Estler 2007). Die α_2 -Untereinheit ist zusätzlich für die anxiolytische Wirkung von Benzodiazepinen verantwortlich (Mohler et al. 2002).

Von der Strukturformel von Diazepam leiten sich die meisten anderen 1,4-Benzodiazepine ab (Mutschler 2013). GABA-Rezeptoren, die eine α_4 - oder α_6 -Untereinheit besitzen, sind insensitive für Diazepam (Wisden et al. 1991). Zusätzlich sind Rezeptoren mit einer δ -Untereinheit insensitive für Benzodiazepine, da die Bindungsstelle zwischen der α -Untereinheit und der γ -Untereinheit fehlt.

1.7. Verwendung organotypischer Kulturen

In der vorliegenden Arbeit werden die Veränderungen am GABA-Rezeptor in organotypischen Kulturen des Rückenmarks gemessen. Die Methode der organotypischen Kultur ist bewährt. Besonders gut kann die Netzwerkaktivität und durch medikamentöse Blockade von Signalwegen auch die Aktivitäten einzelner Rezeptortypen nachvollzogen werden (Spenger et al. 1991). Sowohl die Rezeptorverteilung als auch die neuronalen Interaktionen ähneln den Bedingungen im lebenden Tier (Holopainen & Lauren 2003). Dadurch lässt sich der Effekt von Substanzen sehr gut testen, ohne dass dabei Nebenwirkungen am Tier oder der Stoffwechsel eine Rolle spielen. Durch die Verwendung von Kulturen anstelle von Versuchstieren ist ein besonders standardisierter Ablauf der Messungen möglich (Drexler et al. 2010).

Die Kulturen generieren spontan Aktionspotentiale. Diese Aktionspotentiale können durch Veränderung des Transmitterangebotes oder durch Rezeptorblockade reguliert werden. Die Potentiale sind mittels elektrophysiologischer Messungen aus dem neuronalen Netzwerk ableitbar und können auf verschiedene Parameter hin untersucht werden.

Es ist möglich, in den Kulturen nicht nur Nervengewebe, sondern gleichzeitig auch Muskelfasern zu züchten. Diese Kulturen werden als Co-Kulturen bezeichnet, da zwei verschiedene Gewebetypen zusammen kultiviert werden. Während der Kultivierung der Zellen wachsen die Axone der Motoneurone aus und bilden neuromuskuläre Synapsen mit den Muskelzellen. Die Aktivität des neuronalen Netzwerks kann dann die motoneuronale Aktivität beeinflussen. So ist eine Messung der Veränderung motoneuronaler Aktivität in den organotypischen Co-Kulturen möglich (Spenger et al. 1991).

1.8. Induktion der Inflammation

Um bei den verwendeten organotypischen Co-Kulturen eine Entzündung zu induzieren, wurden die Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Lipopolysaccharide sind Teile der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und bestehen aus drei Komponenten: O-Antigen, Core-Polysaccharid und Lipid A, welches auch als Endotoxin bezeichnet wird. Der hydrophile Zuckerteil des LPS variiert stark zwischen verschiedenen Bakterienarten, in der vorliegenden Arbeit wird LPS von *Escherichia coli* von der Firma SIGMA-Aldrich® verwendet. Bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien sorgt LPS beim Menschen für die typischen Krankheitssymptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Erbrechen. Das Lipid A (Endotoxin) kann auch zu einer toxischen Schockreaktion führen. Zellen reagieren auf LPS mithilfe des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4), des LPS-bindenden Plasmaproteins (LBP) und des löslichen Glykoproteins CD14 (Freudenberg 2005). In den Kulturen löst die Inkubation mit LPS eine Erhöhung entzündungsspezifischer Zytokine wie TNF α , IL-6 oder IL-1 β aus (Streißenberger 2018).

1.9. Fragestellung und Herangehensweise

Aktuell existieren nur wenige Veröffentlichungen zur Auswirkung von Entzündung auf das GABAerge System auf spinaler Ebene. Besonders auf die Wiederaufnahme von GABA wird wenig eingegangen. Ziel der Arbeit ist es, die Relevanz des GAT-1 bei neuroinflammatorischen Prozessen zu untersuchen. Die durchgeführte Blockade der GABA-Wiederaufnahme an GAT-1 durch NO711 kann dabei Aufschlüsse über die Beteiligung dieses Transporters bei der Inhibition neuronaler Spontanaktivität im Rückenmark geben. Durch die Blockade des GAT-1 kann es im synaptischen Spalt sowohl zu einer Verlängerung des Angebots von GABA als auch zu einer Konzentrationserhöhung kommen. Dieses Mehrangebot an GABA führt über die Wirkung an postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren zu einer gesteigerten postsynaptischen Inhibition und so zu einer verminderten Spontanaktivität im neuronalen Netzwerk.

Messungen der neuronalen Spontanaktivität unter Einfluss von NO711 sollen zeigen, ob die Blockade der Wiederaufnahme an GAT-1 zu einer signifikanten Veränderung der Spontanaktivität führt. Durch den Vergleich mit Messungen, bei denen zuvor mit LPS eine Entzündung in den Zellkulturen induziert wurde, soll ein möglicher Einfluss der Inflammation auf das GABAerge System im Allgemeinen und den GAT-1 im Besonderen gezeigt werden. Dazu werden sowohl Messungen der neuronalen Netzwerkaktivität im Rückenmark von Mäusen durch extrazelluläre Ableitungen, als auch Messungen der Aktivität einzelner Rezeptoren durch intrazelluläre Ableitungen durchgeführt. Zusätzlich soll die Wirkung von Entzündung speziell auf den GABA_A-Rezeptor untersucht werden. Dazu werden Messungen mit Diazepam unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit LPS durchgeführt. Um nicht nur die Aktivität der Neurone, sondern auch die Auswirkung auf nachfolgende Neurone, in diesem Fall Motoneurone, auswerten zu können, wurde außerdem die Aktivität von Muskelzellen in Co-Kulturen betrachtet. In der Zusammenschau sollen die Messergebnisse einen Einblick in die durch Neuroinflammation ausgelösten Veränderungen an der GABAergen Synapse geben. So soll die Hypothese, dass Neuroinflammation einen signifikanten Einfluss auf die GABAerge Informationsweiterleitung im Rückenmark hat, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung der organotypischen Rückenmark-Zellkulturen

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren wurden in Übereinkunft mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und durch das Ethikkomitee der Universität Tübingen und das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Antrag „Pharmakologische Interaktionen zwischen Narkosemitteln und Neurosteroiden“ (Antkowiak) vom 1.3.2017).

Die verwendeten organotypischen Zellkulturen stammen aus dem Rückenmark 14-15 Tage alter embryonaler Wildtyp-Black6-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, USA).

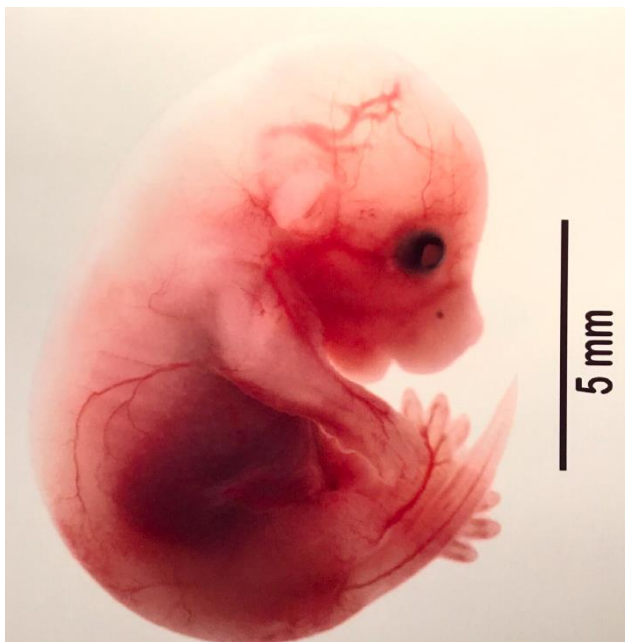


Abb. 2: Fotografie eines ca. 15 Tage alten Mäusembryos

Zur Gewinnung des Gewebes wurde eine schwangere Maus in Isofluran-Narkose (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) dekapitiert und die Embryonen entnommen. Abb. 2 zeigt die Fotografie eines solchen Mäusembryos kurz nach der Entnahme aus dem Uterus. Bei den Embryonen wurde das Rückenmark samt einiger in der Nähe liegenden Muskelfasern frei-präpariert. Die präparierten Gewebestücke wurden in

1,5 %igen Agar, der in Gey's Balanced Salt Solution (GBSS) (Sigma Aldrich) gelöst wurde, eingegossen, um Schnitte anfertigen zu können. Um den Stoffwechsel der Nervenzellen zu verlangsamen wurde die Temperatur immer möglichst niedrig gehalten. Dies wurde erreicht, indem der Agar mit eiskalter Dissektionslösung (500 ml GBSS + 4 ml 50% Glucose + 5 ml 1 Mol Mg^{2+}) vorsichtig umgossen wurde. Mit der gleichen Lösung wurde auch die Kammer des Schneidegeräts (Vibroslicer, Campden Instruments, Loughborough, England) gefüllt. Auf den Probenhalter des Schneidegeräts wurde ein Block 2%iger Agar (in 0,9% NaCl-Lösung gelöst) mit Sekundenkleber als Stütze festgeklebt. Der

Agarblock mit den eingegossenen Gewebestücken wurde vorsichtig davorgestellt und mit weiteren Tropfen flüssigen Agars am Stützklotz befestigt.

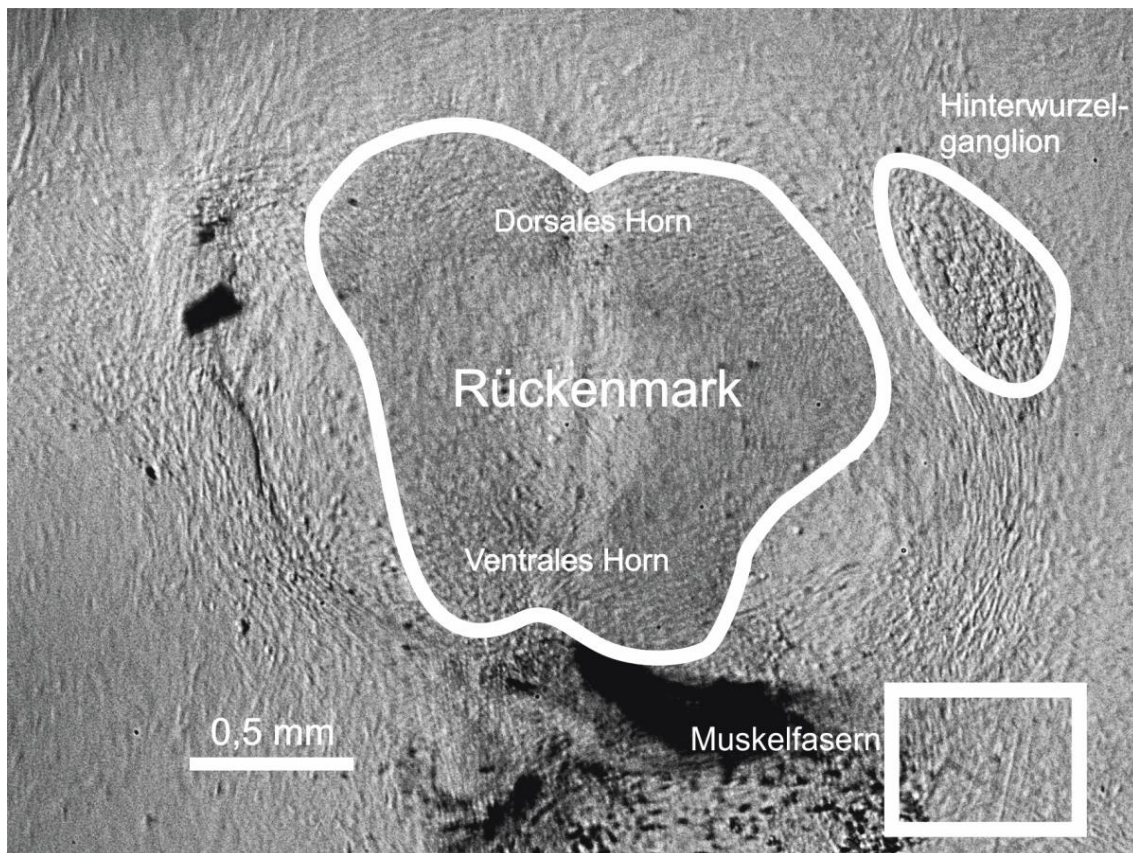


Abb. 3: Fotografie einer organotypischen Co-Kultur des Rückenmarks mit Muskelzellen

Der Maßstab ist in der linken unteren Ecke eingezeichnet. Zusätzlich sind wichtige Strukturen markiert und beschriftet (Abbildung modifiziert nach Eckle 2014)

Mithilfe des Vibroslicers wurden 300 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Fotografie eines Schnittes ist in Abb. 3 gezeigt. Die Schnitte wurden auf Deckgläser aufgeklebt, die zuvor mit Poly-d-Lysin (Sigma) beschichtet wurden, um eine bessere Haftung zu erzielen. Dazu wurden auf jedes Deckglas 13 µl Hühner-Plasma (Sigma) gegeben und der Schnitt hineingelegt. Dann wurden 13 µl Thrombin (Sigma) hinzugegeben. Nach vorsichtiger Mischung härtete die Lösung aus. Die Deckgläser wurden in Kulturröhrchen (Rollertubes, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) zusammen mit 750 µl eines Nährmediums (modifiziert nach Gähwiler, 1981; Tab. 1) kontinuierlich im Brutschrank bei 36°C bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung des Nährmediums zu gewährleisten.

Zusammensetzung des Nährmediums	
Pferdeserum (ThermoFisher, Waltham, USA)	100 ml
Basal Eagle Medium (Sigma)	200 ml
Hank´s Balanced Salt Solution (AppliChem, Darmstadt)	100 ml
Glucose 50% (Sigma)	4 ml
Glutamin 200mM (Sigma)	2 ml
Nerve Growth Factor β der Ratte (Sigma)	15 μ l

Tab. 1: Zusammensetzung des Nährmediums der Kulturen

Modifiziert nach Gähwiler 1981

Die Modifikation des Nährmediums im Vergleich zur Publikation von Gähwiler besteht aus einer zusätzlichen, einmaligen Zugabe von Nerve Growth Factor β (NGF) der Ratte (Sigma Aldrich) kurz nach der Präparation. Damit wird eine Konzentration von 0,01 mg NGF/ml erreicht.

Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Am Tag nach der Präparation wurde einmalig zu den pro Kultur verwendeten 750 μ l Medium zusätzlich 10 μ l Mitosehemmer (5-Fluor-2-Deoxyuridin, Cytosin-b-D-Arabino-Furanosid, Uridin; Sigma) hinzugegeben, um ein überschießendes Wachstum von Gliazellen zu verhindern. Die Kulturen wurden direkt nach der Präparation und nach jedem Medienwechsel für mindestens 90 Minuten mit 5 % CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) begast.

Verunreinigte Zellkulturen lassen sich unter anderem durch den pH-Wert des Mediums erkennen, es zeigt sich ein Farbumschlag nach gelb und das Medium kann zusätzlich trüb werden. Diese Kulturen mussten verworfen werden.

2.2. Behandlung der Kulturen mit LPS

Ein Teil der Kulturen wurde 18 h vor der Messung mit 3 μ g/ml Lipopolysaccharid (Sigma) behandelt, um eine Inflammation zu induzieren. Dazu wurde ein Medienwechsel vorgenommen und in das neue Medium LPS hinzugegeben. Dann wurden die Kulturen abermals mindestens 90 min mit 5 % CO₂ begast. Während der Messung erfolgte keine weitere Inkubation mit LPS.

2.3. Medikamente und Standardlösungen

Die Messungen wurden in artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) vorgenommen, in der die jeweiligen Substanzen gelöst wurden, deren Einfluss auf das Rückenmark gemessen werden sollte. Die Zusammensetzung der ACSF ist in Tab. 2 aufgelistet.

NO711-Hydrochlorid wurde in den Konzentrationen 50nM und 500 nM in ACSF verwendet (Skovstrup et al. 2010). NO711 weist einen IC_{50} von 47 nM auf (Suzdak et al. 1992), sodass die gewählten Konzentrationen sowohl die Testung einer sehr geringen Konzentration als auch die einer hohen, deutlich über der IC_{50} liegenden Konzentration zulassen.

Diazepam-Lipuro (Braun, Melsungen, Deutschland) wurde in den Konzentrationen 1,5 μ M und 5 μ M in ACSF verwendet. Diese Konzentrationen wurden gewählt, um sowohl eine Konzentration am unteren Ende des Wirkspektrums, als auch eine Konzentration am oberen Ende, welche ihre Wirkung gerade noch über die spezifische Benzodiazepin-Bindungsstelle am $GABA_A$ -Rezeptor vermittelt, zu testen (Drexler et al. 2010).

Bei Kulturen mit Muskelaktivität wurde zusätzlich für jede letzte videomikroskopische Messung an einer Kultur der ACSF 1 μ M Pancuronium (Sigma) zugesetzt. Pancuronium ist ein Antagonist am nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptor und zählt zu den nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien. Es diente hier dazu, autonom bewegliche Muskelfasern von Fasern zu unterscheiden, die über Acetylcholin von Signalen aus dem Rückenmark erregt werden.

Tab. 2: Zusammensetzung der ACSF Lösung
Modifiziert nach Avramescu 2016

Bestandteil	mM
NaCl	120
KCl	3,5
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,13
MgCl ₂ 6H ₂ O	1
NaHCO ₃	26
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,2
D-Glucose	11

2.4. Extrazelluläre Messungen & Videoaufzeichnungen

In den Rückenmarkschnitten (Abb. 3) ist erkennbar, wo der ventrale und der dorsale Teil des Rückenmarks liegt. Bei einigen Kulturen sieht man außerdem schon nach 3-4 Tagen Muskelkontraktionen einzelner Muskelfasern, bei den meisten traten diese jedoch erst nach 10-14 Tagen auf. Die extrazellulären und videomikroskopischen Messungen wurden nach mindestens 14 Tagen Inkubation im Brutschrank durchgeführt und durch die Axoscope 10.7 Software dargestellt. Erfasst werden können Signale mit einer Amplitude, die größer als 0,1 mV ist. Für eine bessere Ansicht wurden die Daten in Axoscope 10.7 mit einem 1 Hz Hochpassfilter und einem 5000 Hz Tiefpassfilter gefiltert und später auf verschiedene Parameter hin ausgewertet.

Die Messkammer besteht aus einem Metallrahmen mit Glasboden (Kindler O. GmbH & Co. Mikroskopische Gläser, Freiburg, Deutschland) der Größe 24x32 mm. Die Messkammer wurde auf 34°C aufgeheizt und diese Temperatur wurde die gesamten Messungen über beibehalten. Die Kammer wurde mit ACSF, welche zunächst mit Carbogen (Westfalen AG, Münster, Deutschland) begast wurde, gefüllt. Danach wurde ein Deckglas mit einem aufgeklebtem Zellschnitt in die Messkammer gelegt.

Zwei mit ACSF luftblasenfrei gefüllte Glaselektroden aus Borosilikat (World Precision Instruments, Sarasota, USA) mit einem Elektrodenwiderstand von 2-5 M Ω wurden mit einem Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) in die Kultur bewegt, bis die Aktionspotential-Aktivität messbar war. Dabei muss das Signal deutlich erkennbar und größer sein als das Grundrauschen.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden über ein Teflon-Schlauchsystem und eine Peristaltikpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit einer Laufrate von 1 ml/min in die Badkammer eingewaschen.

Für die Videoaufzeichnungen wurde eine kontrahierende Muskelfaser aufgesucht und das Bild der Kamera (DMK 21AU04, The Imaging Source, Bremen, Deutschland) mit einem möglichst hohen Kontrast zur Umgebung auf diese scharfgestellt. Dann wurde die Faser zeitgleich mit der Aufzeichnung der elektrophysiologischen Daten gefilmt. Der Ablauf der Messungen und die Reihenfolge der zugefügten Substanzen ist in Abb. 4 dargestellt. Die Messungen wurden

entweder mit Kulturen ohne vorherige LPS-Inkubation oder mit Kulturen mit vorheriger Inkubation durchgeführt.

	30 min	6 min	12 min	6 min	12 min	6 min	12 min	6 min
Eingewaschene Substanzen	ACSF		ACSF + 50 nM NO711 / 1,5 µM Diazepam		ACSF + 500 nM NO711 / 5 µM Diazepam		ACSF + 1 µM Pancuronium	

Abb. 4: Messprotokoll der extrazellulären Messungen und Videoaufzeichnungen

Gezeigt sind zuoberst in weiß die Einwaschzeiten sowie schwarz hinterlegt die Dauer der Messung. Außerdem sind verwendeten Substanzen samt Dosierung angegeben.

2.5. Intrazelluläre Messungen

Mit der Voltage Clamp Technik wurden gerichtete Ionenströme über die Zellmembran einzelner Zellen gemessen (Numberger 1996). An der Zelle wurde ein Haltepotential von -70 mV angelegt und der vom Verstärker erzeugte Kompensationsstrom – um dieses Potential aufrecht zu erhalten – wurde aufgezeichnet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (22-28 °C) durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine Pipette hergestellt, indem eine Borosilikat-Glaskapillare (World Precision Instruments) mit einem Laser-Puller (P-2000, Sutter Instruments Company, Novato, USA) gezogen wurde. In der Glaspipette befand sich die Elektrode, ein chlorierter Silberdraht, und die Pipette wurde mit einer isoosmolaren Lösung (Tab. 3) luftblasenfrei gefüllt.

Unter Sicht durch ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Deutschland) wurde in 40 facher Vergrößerung eine Glaspipette mit einem Widerstand von 2-4 MΩ an den Gewebeschnitt mit einem Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) herangefahren.

Tab. 3: Zusammensetzung der Patch Clamp Pipettenlösung

Modifiziert nach Avramescu 2016

Substanz	Konzentration (mM)
CsCl	121
CsOH	24
HEPES	10
EGTA	5
MgCl ₂	1
ATP	2
HCl	1000

Die Signale wurden mit dem Multiclamp 700B Verstärker (Axon Instruments, San Jose, USA), ausgestattet mit einer CV-7B Headstage erhoben und mit Clampex 10.1 (Axon Instruments) und der Digitalisierungskarte Digidata 1440 (Axon Instruments) aufgenommen.

Abb. 5 zeigt die Schritte vom Annähern der Pipette bis zum Ankoppeln der Zelle. Mit Überdruck in der Pipette wurde die Pipettenspitze soweit der Zelle genähert, bis der sogenannte „Dimple“ entsteht, ein mikroskopisch sichtbarer Lichtreflex, entstanden durch die Eindellung der Zellmembran (Abb. 5 a). In Abb. 5 b lässt sich der Dimple gut vor der Pipettenspitze an der Zellwand erkennen. Nun wurde die Zelle mit Unterdruck an die Pipette angesaugt. Man befindet sich dann im sogenannten „Cell-attached-Mode“, die Zellmembran unter der Pipettenspitze ist dabei noch intakt. Dies ist in Abb. 5 c zu sehen, gut erkennbar ist die Pipettenspitze, welche an der Zellwand direkt anliegt. Nun wurde das Haltepotential von -70 mV angelegt. Wenn die Zellwand durch plötzlichen leichten Unterdruck geöffnet wird befindet man sich im „Whole-Cell-Mode“ und die Ganzzelleableitung kann vorgenommen werden. Das Zellinnere wurde mit der Pipettenlösung gefüllt, sodass die Ströme über die Zellmembran zwischen zwei Lösungen mit bekannter Zusammensetzung gemessen werden konnten.

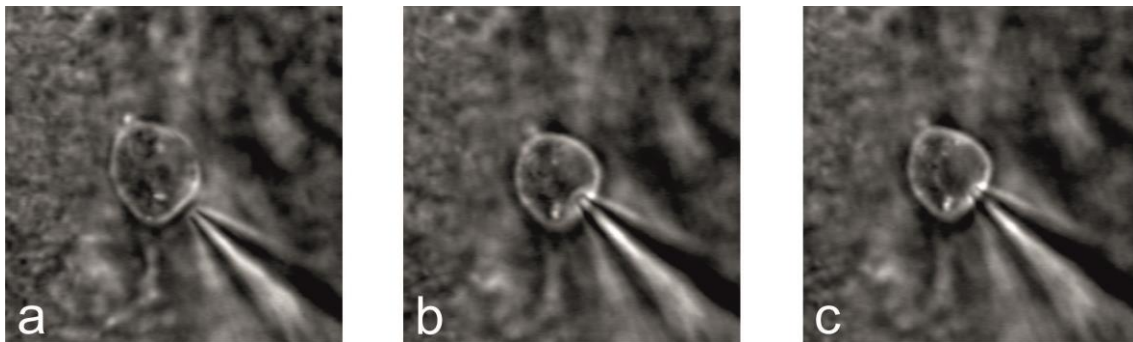


Abb. 5: Sicht durch das Mikroskop bei der Patch-Clamp-Technik
a Annäherung mit der Pipette an eine Zelle, b Bildung des Dimples, c Cell-attached-Mode; Arbeitsgruppeninterne Abbildung mit freundlicher Erlaubnis von Christoph Doolittle-Koncz

Die Kapazität der Zelle und der Serienwiderstand (bis zu 20 M Ω) müssen durch den Verstärker kompensiert werden, da bei einem zu hohen Serienwiderstand das Haltepotential der Zelle nicht sicher auf -70 mV eingestellt werden kann. Auch vor jeder Messung musste die Kompensation erneut geprüft und

gegebenenfalls neu eingestellt werden, falls es zu Änderungen des Serienwiderstands kam.

Durch jede Aktivierung der GABA-Rezeptoren durch den Transmitterinhalt eines Vesikels kommt es zu einem Ausstrom von Chloridionen, was sich als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSC) in der Messung darstellt (Numberger 1996). Die Basislinie der IPSCs lag zwischen -200 und -1000 pA. Signale mit einer Basislinie unter -1000 pA wurden nicht aufgezeichnet und die Messungen verworfen. Während der Aufzeichnung wurden die Signale mit einem 10 kHz Tiefpassfilter gefiltert.

Um nur die GABAergen Ströme zu messen, wurden während des gesamten Messvorgangs 25 µM des selektive NMDA-Antagonist AP5 (2-Amino-5-phosphonovalerian-säure) (Sigma) und 10 µM des kompetitive AMPA-Antagonist CNQX (6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-dion) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) in die Badkammer eingebracht. Außerdem wurde 1 µM Strychnin (Sigma), ein kompetitiver Glycin-Antagonist zur Unterdrückung der glycinergen Ströme eingebracht. Die Drogen wurden mit einem gasdichten Spritzensystem (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in die Badkammer geleitet.

Zur Unterdrückung der GABAergen Ströme und Erfassung der tonischen Ströme wurde in der jeweils letzten Messung der intrazellulären Messreihe 100 µM Bicucullin, ein selektiver kompetitiver GABA_A-Rezeptorantagonist zugegeben. Die Reihenfolge und Dauer der Messungen sind in Abb. 6 dargestellt. Pro zugesetzter Konzentration von NO711 oder Diazepam wurden zwei Messungen aufgezeichnet (Abb. 6, schwarz unterlegt). Ausgewertet wurde die stabilere der beiden. Die Messungen wurden an Kulturen ohne vorherige LPS-Inkubation und an Kulturen mit vorheriger Inkubation durchgeführt.

	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min
Eingewaschene Substanzen	ACSF	ACSF + 50 nM NO711 / 1,5 µM Diazepam		ACSF + 500 nM NO711 / 5 µM Diazepam		ACSF + 500 nM NO711 / 5 µM Diazepam + 100 µM Bicucullin				
	25 µM AP5 + 10 µM CNQX + 1 µM Strychnin									

Abb. 6: Messprotokoll der intrazellulären Messungen

Gezeigt sind zuoberst in weiß die Einwaschzeiten sowie schwarz hinterlegt die Dauer der Messung. Außerdem sind je Messung verwendeten Substanzen mit der jeweiligen Dosierung angegeben.

2.6. Datenanalyse

Zur Datenanalyse wurden verschiedene MATLAB-Skripte (MathWorks, Natick, USA) verwendet, die von Dr. Harald Hentschke und Prof. Dr. Bernd Antkowiak, erstellt wurden. Diese wurden von mir auf die verwendeten statistischen Tests und die auszuwertenden Daten jeweils angepasst.

Die so berechneten Signifikanzen werden in den im Ergebnisteil folgenden Abbildungen durch Sternchen gekennzeichnet. Dabei wurde folgendes, international bekanntes Format verwendet. Jegliche Zahlenwerte wurden auf drei Nachkommastellen gerundet. Das Signifikanzniveau lag immer bei $\alpha=0,05$.

Symbol	Bedeutung	Tab. 4: Bedeutung der Signifikanzsternchen <i>In den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Abbildungen gilt für alle Signifikanzsternchen dieses Format.</i>
*	$p \leq 0,05$	
**	$p \leq 0,01$	
***	$p \leq 0,001$	
****	$p \leq 0,0001$	

2.6.1. Auswertung der Extrazellulärdaten

Um die Aktionspotentialfrequenz auszuwerten, wurden die Daten mit einem Butterworth-Hochpassfilter mit einer 3 dB Eckfrequenz von 300 Hz gefiltert.

Bei jeder Messung, bestehend aus vier Einzelmessungen mit vier verschiedenen Bedingungen (Kontrolle, NO711/Diazepam in zwei Konzentrationen und Auswasch) wurde anhand der ersten Messung optisch ein Schwellenwert deutlich oberhalb des Rauschens gewählt und dieser Schwellenwert bei allen drei folgenden Einzelmessungen dieser Messung angewendet. Aus der Anzahl der Signale, die größer als der gewählte Schwellenwert waren, ergab sich die Feuerrate. Dadurch war zu erkennen, ob NO711 oder Diazepam durch Verstärkung des GABAergen Einflusses eine Veränderung der Frequenz der Netzwerkaktivität hervorruft. Nicht in die statistische Auswertung aufgenommen wurden Datensätze, bei denen sich das Vorzeichen der Amplitude der aufgezeichneten Signale im Laufe der Einzelmessungen ändert, viele Artefakte auftreten oder die Zelle im Laufe der Messungen eine zu starke Aktivierung zeigt. Die starke Aktivierung ließ sich bei Durchsicht der Daten in den meisten Fällen auf Artefakte an den

Messapparaturen zurückführen, die im Laufe einer Messung durch verschiedene Störfaktoren (kleine Bewegungen des Schnitts, zunehmendes Rauschen etc.) zustande kamen. Eine Aktivierung der Neuronen mit entsprechendem Frequenzanstieg im neuronalen Netzwerk im Laufe der Messungen ist bis zu einem gewissen Grad denkbar. Die verstärkte Wirkung von GABA kann zu einer Inhibition hemmender Interneurone führt und somit zu einer Erhöhung der Netzwerkaktivität. Die Höhe der Aktivierung ist jedoch begrenzt, da auch die aktivierenden Interneurone gehemmt werden. Aktivitätssteigerungen, die größer als das 1,5 fache des Interquartilabstands waren, bezogen auf die Grundgesamtheit der Daten einer Messreihe ohne bzw. mit LPS-Inkubation, wurden deshalb aus der Auswertung ausgeschlossen, da von einer fehlerhaften Messung auszugehen war.

Mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben wurde die mittlere Frequenz der Kontrollmessung der nicht vorbehandelten und der mit LPS vorbehandelten Kulturen miteinander verglichen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit einem arbeitsgruppeneigenen MATLAB Skript (7.7.0 R2008b). Die Daten wurden zusätzlich nach den Grundfrequenzen am Median aufgeteilt, um Messungen mit besonders niedriger bzw. hoher Frequenz besser auswerten zu können. Es wurde die Frequenzänderung in Abhängigkeit von der eingewaschenen Substanz und der LPS-Vorbehandlung der Kultur betrachtet. Mittels des Lilliefors-Tests wurden die unter den verschiedenen Bedingungen gemessenen Extrazellulärdaten auf Normalverteilung getestet. Da die Datensätze keine Normalverteilung aufwiesen, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Getestet wurde, ob man bei den Datensätzen jeweils die Nullhypothese ablehnen konnte. Die Nullhypothese war in diesem Fall, dass die Droge zu keiner Veränderung in der Aktivität der Zellkulturen führt. Es wurde gegen den Wert von 1 getestet, wie wahrscheinlich es ist, dass unter Annahme der Nullhypothese im Experiment Daten gemessen werden, die wie die vorliegenden Datensätze verteilt sind oder extremer.

2.6.2. Auswertung der Videodaten

Auch die Muskelkontraktionen in der Zellkultur wurden auf ihre Frequenz hin untersucht. Die aufgezeichneten Videos wurden mit arbeitsgruppeneigenen MATLAB Skripten (7.7.0 R2008b) ausgewertet. Dazu wurde eine 33 x 33 Pixel große Region of Interest (ROI) in einem Bildausschnitt, in dem sich eine Muskelfaser bewegt und in dem ein hoher Kontrast herrscht, bestimmt. Dann wertete das Skript die Lumineszenz in der ROI aus. Eine Änderung der Lumineszenz kommt durch Bewegung der dunklen Muskelfaser vor dem hellen Hintergrund zustande. Jede Lumineszenzänderung wurde, aufgetragen gegen die Zeit, in einem Graphen als Ausschlag dargestellt. In diesen Graphen legte man – wie schon zuvor bei den Extrazellulärdaten – optisch eine Schwelle. Jeder Messwert oberhalb der Schwelle wurde als Muskelkontraktion gezählt. Aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden Datensätze, bei denen in der abschließenden Messung mit 1 μ M Pancuronium keine deutliche Hemmung der Muskelaktivität sichtbar wurde. So konnte sichergestellt werden, dass autonom aktive Muskelfasern nicht in die Auswertung aufgenommen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte abermals mit einem arbeitsgruppeneigenen MATLAB Skript, getestet wurde mithilfe des Lilliefors-Tests auf Normalverteilung sowie, je nach Verteilung, auf eine mögliche Ablehnung der Nullhypothese mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests. Die Nullhypothese war hierbei, dass die verwendeten Substanzen und die LPS-Inkubation keinen Einfluss auf die motoneuronale Aktivität haben.

2.6.3. Auswertung der Patch-Clamp-Daten

Die Rohdatenspurten der IPSCs wurden mit einem arbeitsgruppeninternen MATLAB-Skript (7.6.0 R2008a) ausgewertet. Zunächst wurden, wie bei den Extrazellulärdaten auch, Ereignisse detektiert. Dafür wurden die Rohdaten zunächst mit einem Butterworth Tiefpassfilter und danach mit einem Pseudodifferentiationsfilter gefiltert, dieser orientiert sich am möglichst steilen Kurvenabfall (Banks & Pearce 2000). Signale, bei denen die Kurve flach abfällt oder bei denen die Basislinie, das durchschnittliche Aktivitätsniveau der Zelle, zu große Veränderungen zeigte, wurden nicht als Spike gezählt. Anschließend wurde manuell eine Schwelle gesetzt. Spikes, welche die Schwelle überschreiten wurden als Ereignis gezählt.

Mit einem weiteren MATLAB-Skript wurden die detektierten Spikes weiter angepasst, dabei wurden mit einem Savitzky-Golay-Filter die IPSCs geglättet, die generelle Form der Potentiale dabei erhalten. Dies ermöglicht eine genauere und standardisierte Betrachtung der IPSCs im Laufe der Messungen. IPSCs bestehen aus einem schnellen, fast senkrechten Abfall des Potentials durch den Chlorideinstrom und einem längeren, exponentiellen Abklingen zurück auf den Ursprungswert der Basislinie durch Wegfall des Einflusses von GABA. Der Wiederanstieg der IPSCs besteht dabei meist aus zwei oder mehr exponentiellen Komponenten, einer Schnellen und einer Langsamen (Mody & Pearce 2004, Mozrzymas 2004). Um den Kurvenanstieg in der Abklingphase möglichst gut wiederzugeben, wurden pro IPSC je zwei Exponentialfunktionen an den Verlauf des IPSCs angepasst, die verwendete Funktionsformel ist aufgezeigt.

$$f(t) = a_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + a_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

Bei manchen IPSCs war eine Anpassung an das Modell mit zwei Exponentialfunktionen nicht möglich. Diese wurden durch das MATLAB Skript automatisch aussortiert. Von den angepassten IPSCs wurden noch weitere anhand von zwei Fehlermaßen ($R^2 \geq 0,3$ und $mse_{nc} \leq 1,0$) manuell aussortiert. Diese beschreiben die Qualität der Anpassung der Exponentialfunktionen, abhängig von der Amplitude des IPSCs und dem Hintergrundrauschen.

Aus der beschriebenen Exponentialfunktion lassen sich einige Parameter berechnen: Die Abklingzeit (τ) entspricht der Zeit, in der die Höhe des Signals wieder auf 37 % vom Ursprungswert angestiegen ist. Die mittlere Ladung pro IPSC wird durch das Kurvenintegral der Exponentialfunktionen berechnet. Die Halbwertsbreite stellt die Hälfte der Dauer dar, die ein IPSC benötigt, um wieder auf das ursprüngliche Niveau anzusteigen. Die gemessenen Werte basieren auf den angepassten IPSCs nach Entfernung derer an die keine Exponentialfunktion angepasst werden konnte. Lediglich die Frequenz wurden über alle gemessenen IPSCs ermittelt, da für die Bestimmung der Frequenz eine Anpassung der Exponentialfunktionen nicht relevant ist. Die Basislinie dient als Qualitätsmerkmal. Je weniger sich dieser Wert innerhalb einer Messung ändert, desto verlässlicher ist diese. Die Amplitude eines IPSCs wird aus der Differenz zwischen dem Mittelwert eines kurzen Intervalls der Basislinie kurz vor Beginn des jeweiligen IPSCs und dem Maximalwert an Spitze des IPSCs gemessen.

Die an die Funktionen angepassten IPSCs wurden mit dem Lilliefors-Test auf Normalverteilung und im Anschluss, je nach Verteilung, mit dem t-Test oder dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf Signifikanz getestet. Mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests oder des t-Tests für nicht gepaarte Stichproben wurden die Messungen auf einen signifikanten Unterschied zwischen Messungen ohne bzw. mit LPS-Inkubation untersucht. Die Tests wurden durch ein arbeitsgruppeninternes MATLAB Skript (7.6.0 R2008a) vorgenommen.

2.6.4. Auswertung der tonischen Ströme

Die Auswertung der tonischen Ströme erfolgte mithilfe von Excel (Excel für Microsoft 365 Version 2007). Die Rohdaten wurden aus den MATLAB Auswertungen der intrazellulären Messungen entnommen.

Um die tonische Hemmung in Zahlen fassen zu können, wurde die Basislinie vor und nach Wirkungseintritt von Bicucullin über 40 Sekunden gemittelt und das Ergebnis in eine Excel-Tabelle eingetragen. Die Höhe der Basislinie wurde vor und nach dem Beginn der Bicucullinwirkung verglichen.

Mithilfe des Lilliefors-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Entsprechend des Ergebnisses wurde entweder mit dem t-Test, dem Mann-Whitney-U-Test oder dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test die statistische Signifikanz verschiedener Hypothesen untersucht. Die statistischen Tests wurden in einem arbeitsgruppeninternen MATLAB Skript (7.6.0 R2008a) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Grundaktivität der organotypischen Kulturen

Die verwendeten organotypischen Kulturen des Rückenmarks generieren spontan Aktionspotentiale. Die Frequenz dieser Aktionspotentiale lässt sich, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, elektrophysiologisch ableiten.

Von Kultur zu Kultur unterscheidet sich die Frequenz, sie weist auch innerhalb einer Messung kein regelmäßiges Muster auf. So gibt es Phasen mit hoher Aktionspotentialfrequenz und Phasen, in denen wenig, bis keine Aktivität in der Kultur messbar ist.

Diese Phasen wechselnder Aktivität sind in der exemplarischen Rohdatenspur in Abb. 7 gut erkennbar. Die gemessenen Ströme sind dabei in Millivolt gegen die Zeit aufgetragen. Jeder senkrechte Strich entspricht einem Aktionspotential.

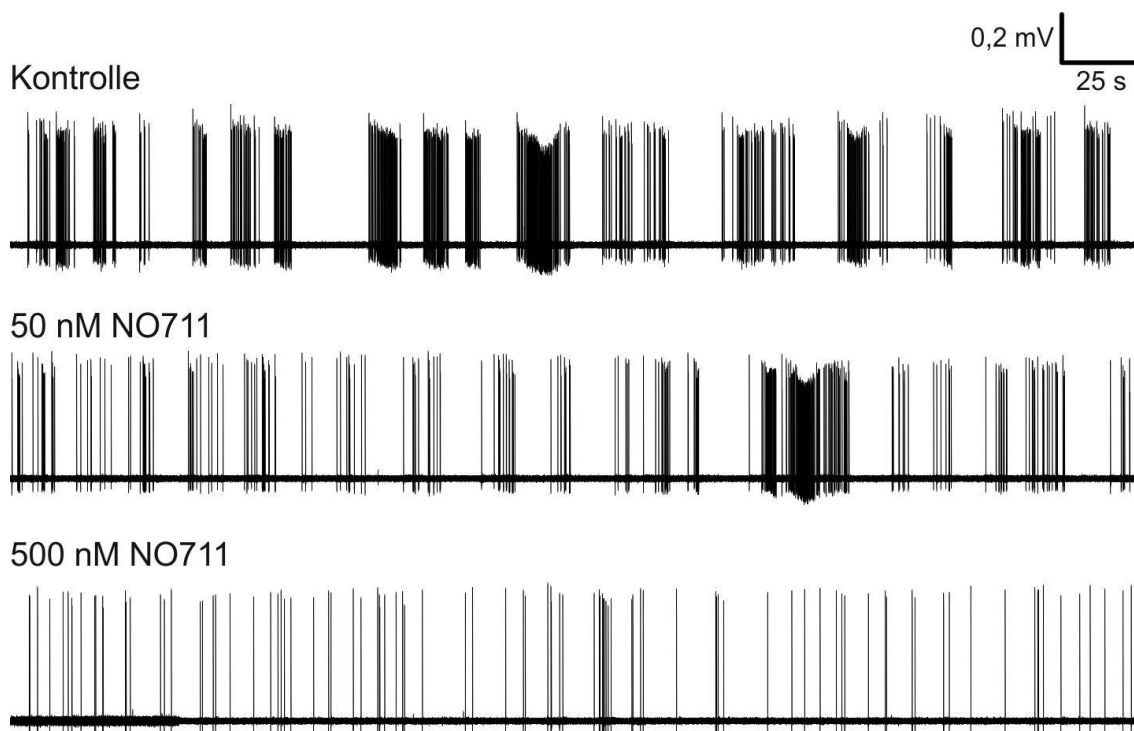


Abb. 7: Exemplarische Rohdatenspur einer extrazellulären Messung mit NO711

Zuerst sind die Aktionspotentiale in der Kontrollmessung, dann die der Messung mit 50 nM NO711 und zum Schluss die der Messung mit 500 nM NO711 abgebildet. Die Skalen von x- und y-Achse sind rechts oben dargestellt. Die gesamte Messung ist je Bedingung 6 Minuten lang.

Gut erkennbar ist das Grundrauschen als waagerechte Linie über die gesamte Zeit der Messung. Die Aktionspotentiale heben sich mit einer Höhe von ca. 0,7 mV deutlich von diesem Grundrauschen ab. Bereits erkennbar ist, dass die Frequenz der Aktionspotentiale mit steigender NO711-Konzentration im Vergleich zur Kontrollmessung abnimmt.

Für die Auswertung der spontanen Aktivität innerhalb der Zellkultur wurde, wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, die mittlere Aktionspotentialfrequenz jeder Kultur berechnet.

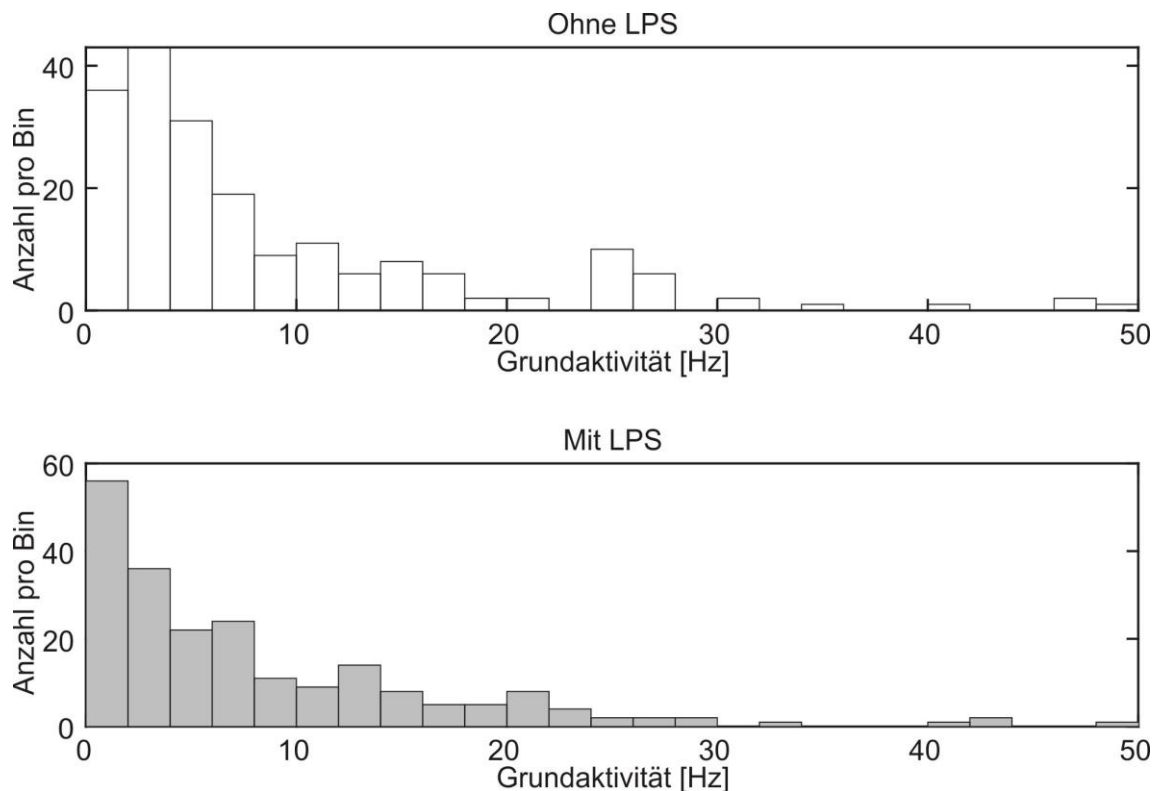


Abb. 8: Histogramme der Grundaktivitäten extrazellulärer Messungen ohne und mit LPS-Inkubation

Die in den Kulturen gemessenen Aktionspotential-Frequenzen sind in Bins unterteilt deren Breite 2 Hertz beträgt. Die absolute Anzahl der Kulturen pro Bin ist auf der y-Achse dargestellt, die steigenden Frequenzen in Hertz auf der x-Achse. In weiß ist die Grundaktivität der Kulturen, welche nicht mit LPS behandelt wurden, dargestellt. In diesen Datensatz wurden 217 Messungen aufgenommen. Die 233 mit LPS behandelten Kulturen sind in grau aufgetragen.

Zur Klärung, ob LPS-Inkubation die Grundaktivität der Zellkulturen beeinflusst, wurden Kontrollkulturen ohne LPS-Inkubation sowie Kulturen nach Inkubation mit LPS hinsichtlich der Aktionspotentialfrequenz analysiert. Die mittleren

Aktionspotentialfrequenzen sind in den Histogrammen in Abb. 8 dargestellt. Auf der x-Achse sind die Kulturen nach steigender Frequenz in Hertz aufgetragen. Der größte Teil der gemessenen Aktionspotential-Aktivität liegt zwischen 0-4 Hz. Nur wenige Kulturen haben eine Grundaktivität über 10 Hz. Der Lilliefors-Test auf Normalverteilung wurde auf beide Datensätze angewandt und zeigt, dass die Messdaten nicht normalverteilt sind ($p < 0,05$). Dies muss in den folgenden statistischen Auswertungen der Daten berücksichtigt werden.

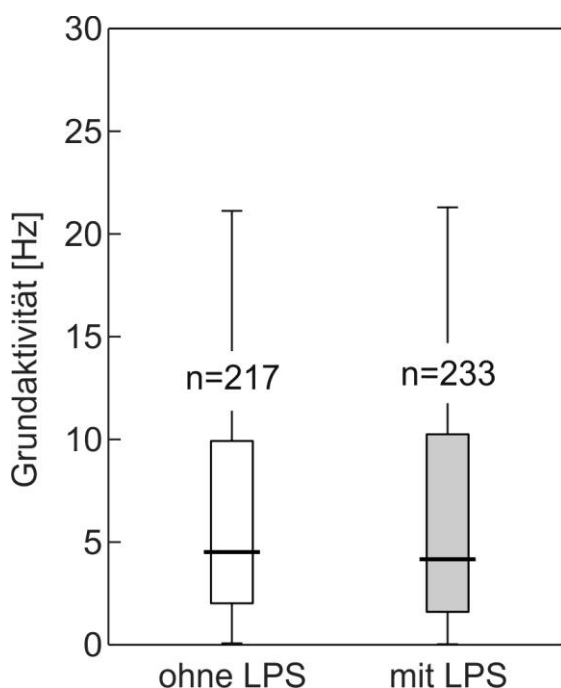


Abb. 9: Grundaktivität ohne und mit LPS-Inkubation als Boxplot
 Die Höhe Grundaktivität in Messungen ohne LPS-Inkubation (weiß) und mit LPS-Inkubation (grau) ist dargestellt. Die y-Achse zeigt die Höhe der Frequenz in Hertz. Die Querstriche in den Boxen stellen den Median dar, die Whiskers den 1,5 fachen Interquartilabstand. n = Anzahl der Messungen

Die Histogramme der Grundaktivitäten (Abb. 8) sind in Abb. 9 als Boxplot zusammengefasst, dort ist auch der Median und die Streuung der Daten abgebildet. Der Median der Kulturen ohne LPS-Inkubation liegt bei 4,5 Hz, die Kulturen mit LPS-Inkubation haben einen Median von 4,14 Hz. Da die Datensätze nicht normalverteilt sind wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet, um zu prüfen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Grundaktivitäten der Kulturen besteht. Mit $p=0,43$ lässt sich jedoch kein signifikanter Einfluss von Entzündung auf die Grundaktivität nachweisen.

Aufgrund der großen Streuung der Grundaktivität (Abb. 8), wurden die Daten am Median in zwei Teilgruppen unterteilt. Diese wurden erneut getrennt auf eine signifikante Änderung der Grundaktivität durch Inflammationsinduktion mittels LPS

untersucht (Abb. 10). So soll ausgeschlossen werden, dass durch die große Streuung ein möglicher Einfluss auf Zellen mit besonders starker oder schwacher Grundaktivität übersehen wird.

Abb. 10 zeigt, dass es in der Teilgruppe der niederfrequenten Grundaktivitäten bei der Inkubation mit LPS zu einer signifikant niedrigeren Aktionspotentialfrequenz kommt (Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test $p=0,001$). In der Teilgruppe der Kulturen mit hochfrequenter Grundaktivität zeigt sich bei Induktion einer Inflammation jedoch keine signifikante Veränderung der Grundaktivität (Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test $p=0,8$).

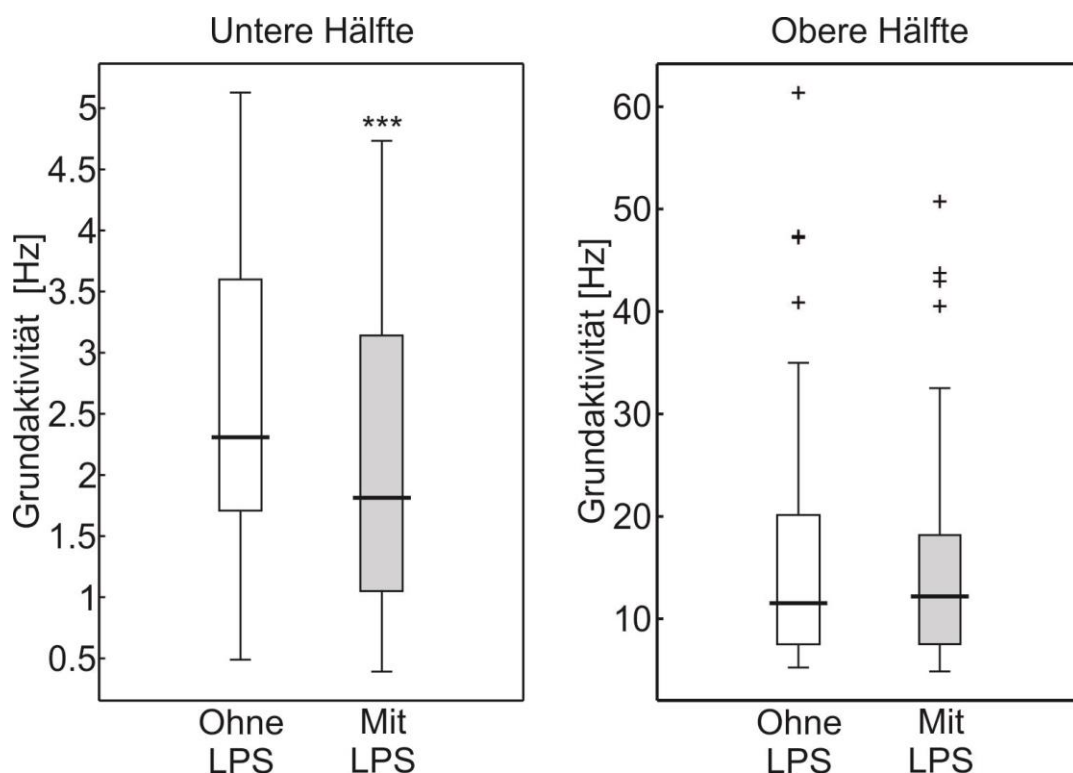


Abb. 10: Grundaktivität am Median geteilt

Dargestellt ist die absolute Frequenz der Kulturen als Boxplot. Die Frequenz in Hertz ist auf der y-Achse aufgetragen. Aufgeteilt wurden Messungen nach LPS-Inkubation. Ohne LPS-Inkubation in weiß, mit LPS-Inkubation in grau. Der linke Boxplot zeigt Daten < 5 Hz, der rechte Messungen > 5 Hz. Die Whiskers stellen den 1,5 fachen Interquartilabstand dar. Ausreißer, die größer als das 1,5 fache des Interquartilabstands sind, sind gekennzeichnet (+). Signifikante Effekte sind gekennzeichnet (*).

3.2. Wirkung von NO711 in Kulturen ohne und mit LPS Inkubation

Um weitere Einblicke in die Wirkung von Entzündung auf Ebene der GABAergen Synapse zu erhalten wurde zunächst der präsynaptische GAT-1 näher untersucht. Die Zugabe des GABA-Wiederaufnahme-Hemmers NO711 führt dabei durch Blockade des GAT-1-Wiederaufnahmetransporters zu einer Erhöhung der Konzentration von GABA im synaptischen Spalt (vgl. Abschnitt 1.4). Dadurch kommt es zu verstärkter GABAerger Wirkung an der Postsynapse und einer nachfolgenden Verlangsamung der Aktionspotentialfrequenz in den Zellkulturen durch Hemmung nachgeschalteter Neurone. Diese Frequenzabnahme ist abhängig von der Grundaktivität der Aktionspotentiale in den Zellkulturen, da eine hohe Grundaktivität eine größere Menge GABA im synaptischen Spalt bedingt.

Zunächst wurde einerseits geprüft, ob unterschiedliche Grundaktivität in den Kulturen die Wirkung von NO711 beeinflusst und andererseits, ob niedrige und hohe Konzentrationen von NO711 unterschiedliche Effekte haben.

Abb. 11 zeigt den Effekt, den 50 nM bzw. 500 nM NO711 auf die Aktionspotentialfrequenz der jeweiligen Kultur in Abhängigkeit von der Grundaktivität hat. Um den frequenzsenkenden Effekt von NO711 darzustellen, wurde die Aktionspotential-Frequenz nach Zugabe von NO711 gegenüber der Grundaktivität der jeweiligen Zellkultur in der Kontrollmessung normalisiert. Anhand der linearen Regressionsgeraden in Abb. 11 lässt sich erkennen, dass, je höher die Grundaktivität der Zellkulturen, desto stärker die aktivitätssenkende Wirkung von NO711. Je steiler die Regressionsgerade abfällt, desto stärker hemmt NO711 die Aktivität bei logarithmisch steigender Grundaktivität.

500 nM NO711 hemmt augenscheinlich die Aktivität stärker als 50 nM NO711, was sich am steileren Gefälle der Geraden in Abb. 11 b und d (500 nM) im Vergleich zum Gefälle der Geraden in Abb. 11 a und c (50 nM NO711) erkennen lässt. Erkennbar ist, dass die Regressionsgeraden bei Kulturen, die zuvor mit LPS behandelt wurden (Abb. 11 c & d), flacher abfallen als die Regressionsgeraden der Kulturen ohne LPS-Behandlung (Abb. 11 a & b). Dies ist sowohl in den Messungen mit 50 nM NO711 (Abb. 11 a & c), als auch in den Messungen mit 500 nM NO711 (Abb. 11 b & d) erkennbar. Bei vorangegangener LPS-Inkubation

ist die Wirkung von NO711 also augenscheinlich schwächer und weniger von der Grundaktivität abhängig.

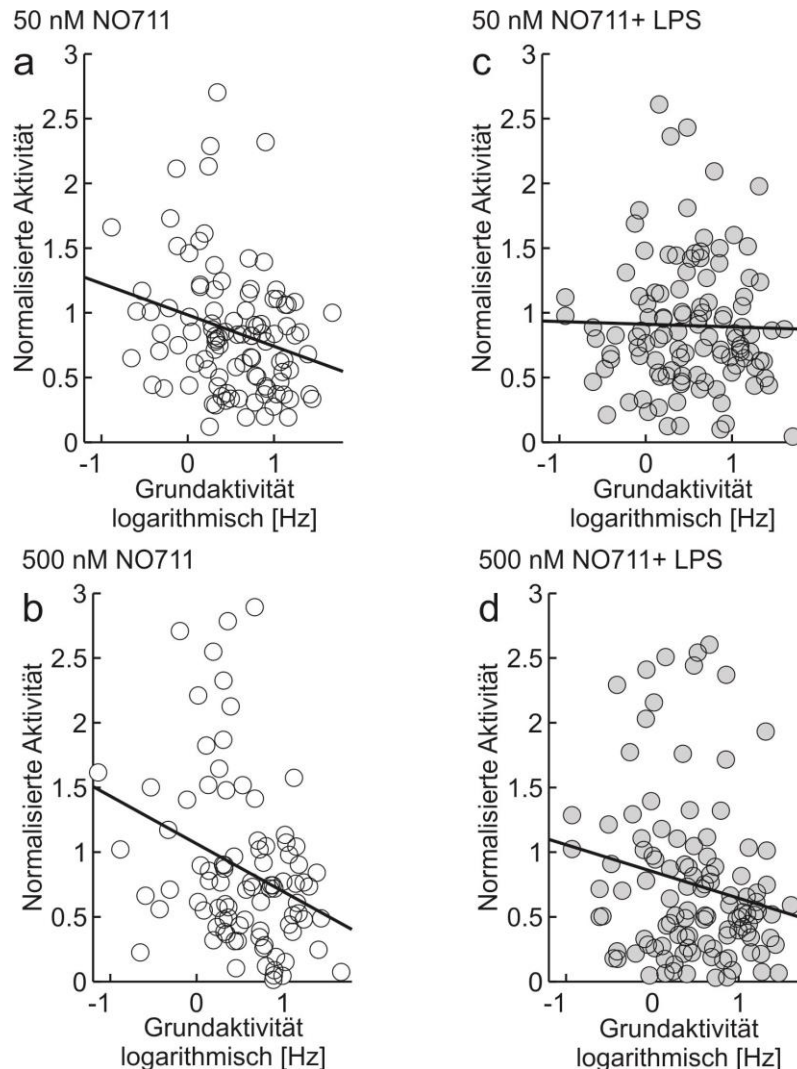


Abb. 11: Einfluss der Grundaktivität auf die NO711-Wirksamkeit
 Jeder Punkt stellt eine Einzelmessung dar. Die Daten wurden gegen die Grundaktivität normalisiert. Dabei entspricht ein Wert von 1 einer fehlenden Hemmung der Aktionspotentialfrequenz durch Zugabe von NO711, ein Wert von 0,5 einer Hemmung um 50% und ein Wert von 2 einer Erhöhung um 100%. Die Grundaktivität der Zellkulturen (x-Achse) ist logarithmisch aufgetragen gegen den normalisierten Effekt (y-Achse), den 50 nM (a und c) bzw. 500 nM (b und d) NO711 auf die Aktionspotentialfrequenz der jeweiligen Kulturen haben. Es wurde jeweils eine einfache lineare Regressionsgerade anhand der Messwerte berechnet und als Linie eingezeichnet. Es sind Kulturen ohne vorherige LPS-Inkubation (weiß) und Kulturen mit vorheriger LPS-Inkubation (grau) dargestellt. Ausgewertet wurden 104 Messungen ohne LPS-Inkubation und 120 Messungen mit vorheriger Inkubation.

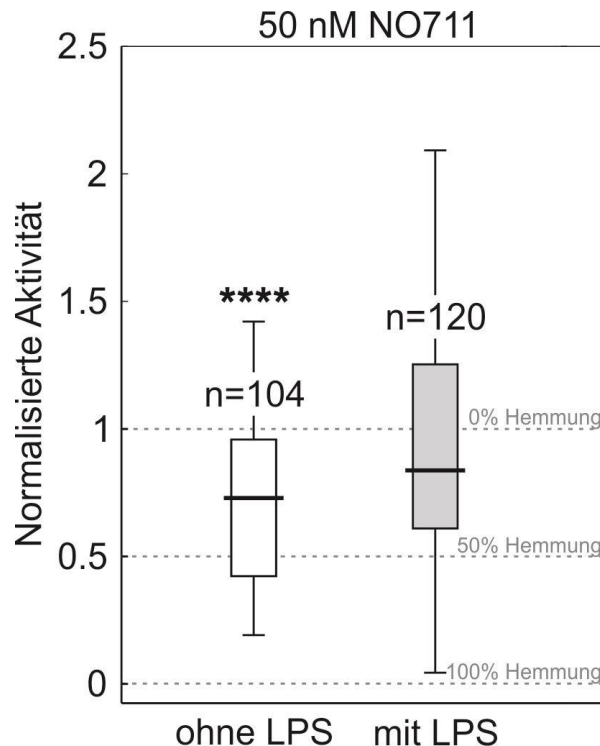


Abb. 12: Normalisierter Effekt von 50 nM NO711 ohne und mit LPS-Inkubation

Die Aktivität nach Zugabe von 50 nM NO711 wurde gegen die Grundaktivität der jeweiligen Kultur normalisiert. So entspricht der Wert 0 einer 100%igen Hemmung der neuronalen Aktivität, der Wert 0,5 einer 50%igen Hemmung und ein Wert von 1,5 würde eine Aktivierung um 50% darstellen. Zur besseren Anschaulichkeit sind die Werte für 0%, 50% und 100% Hemmung durch horizontale Linien markiert. Es sind Daten ohne vorherige LPS-Inkubation (weiß) und Daten mit vorheriger LPS-Inkubation (grau) dargestellt. Die normalisierte Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Der Querstrich in der Box stellt den Median dar, die Whiskers den 1,5 fachen Interquartilabstand. n = Anzahl der Messungen. Signifikante Effekte von 50 nM NO711 sind gekennzeichnet (*).

Die Beobachtung, dass NO711 nach LPS-Behandlung einen schwächeren Effekt auf die Aktivität im kultivierten neuronalen Netzwerk hat, wird durch Abb. 12 verdeutlicht und statistisch bestätigt. Es ist die normalisierte Aktivität der Zellkulturen nach Zugabe von 50 nM NO711 bei Zellen ohne, bzw. mit vorheriger LPS-Inkubation als Boxplot dargestellt. In die Auswertung mit eingeschlossen wurden 114 Messungen ohne LPS-Inkubation und 120 Messungen mit vorheriger LPS-Inkubation.

50 nM NO711 hemmt in Zellkulturen ohne vorherige LPS-Behandlung die Frequenz der Aktionspotentiale statistisch signifikant ($p=9.6766 \times 10^{-6}$). Bei Zellkulturen, die zuvor mit LPS inkubiert wurden, zeigt sich keine signifikante

Senkung der Frequenz ($p=0,108$). Jedoch ist eine größere Streuung der Daten bei Kulturen mit vorheriger LPS-Inkubation im Boxplot erkennbar. Auch am Median erkennt man, dass in den Kontrollkulturen NO711 eine stärkere Wirkung zeigt als in Zellkulturen mit induzierter Entzündung: ohne LPS-Inkubation entspricht der Median (0,729) einer 27,1-prozentigen Hemmung der Aktionspotential-Frequenz, mit LPS-Inkubation entspricht der Median (0,837) nur einer 16,4-prozentigen Hemmung der Aktionspotential-Frequenz.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine verminderte Wirksamkeit des GABA-Wiederaufnahme-Hemmers NO711 nach Induktion von Entzündung.

3.3. Vergleich der Wirkung von Diazepam mit und ohne Entzündung

Um eine eventuelle Wirkung von LPS-Inkubation am GABA-Rezeptor nachzuweisen, wurde eine mögliche Änderung der Wirkung von Diazepam untersucht. Diazepam bindet an der spezifischen Benzodiazepin-Bindungsstelle am postsynaptischen GABA-Rezeptor und führt so zu Verstärkung der GABAergen Wirkung auf die nachfolgenden Neurone (vgl. Abschnitt 1.6). Eine veränderte Wirksamkeit von Diazepam durch vorherige Inkubation der Zellkultur mit LPS kann auf eine durch Entzündung ausgelöste Veränderung direkt am GABA-Rezeptor hinweisen. So lassen die Messungen mit Diazepam eine Eingrenzung der Wirkungsstelle von Neuroinflammation im Rückenmark zu.

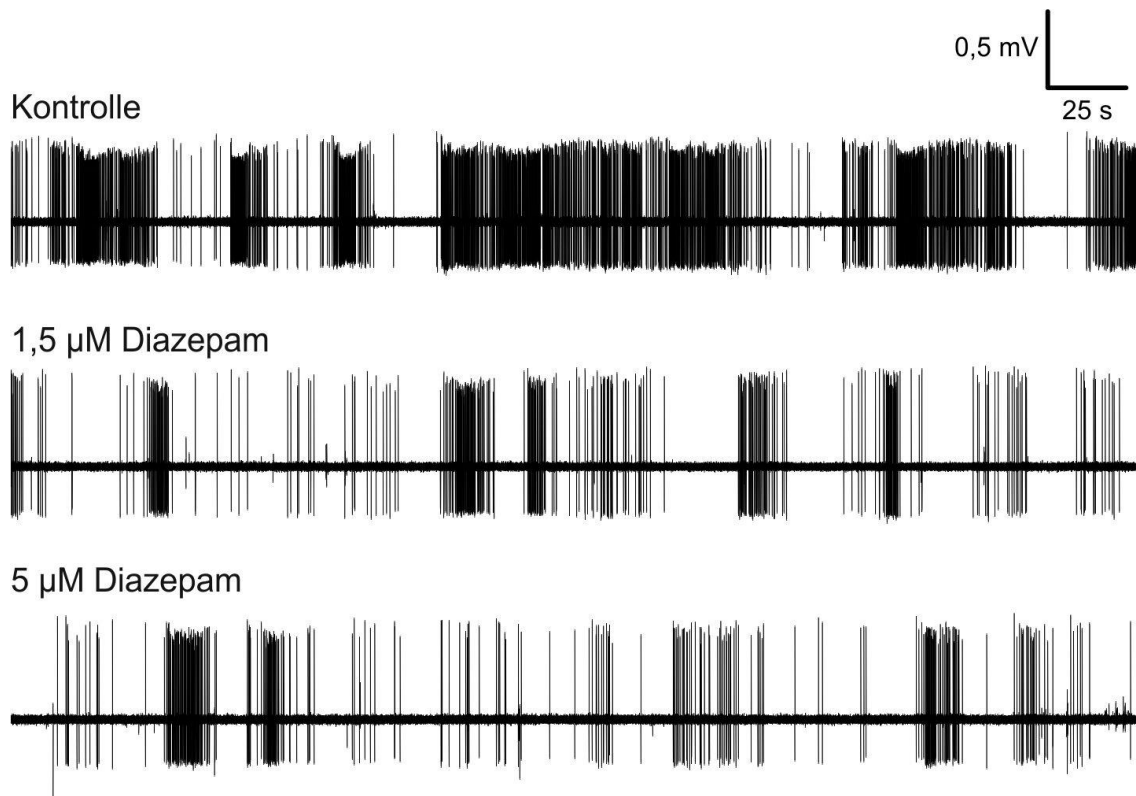


Abb. 13: Rohdatenspur einer extrazellulären Messung mit Diazepam
 Dargestellt sind die Aktionspotentiale einer Kontrollmessung und je einer Messung mit 1,5 μM , bzw. 5 μM Diazepam. Jeder senkrechte Strich entspricht einem Aktionspotential. Die Größenverhältnisse von x- und y- Achse sind rechts oben dargestellt. Die gesamte Messung ist je Bedingung 6 Minuten lang.

Abb. 13 zeigt zunächst exemplarische Rohdatenspuren der Messungen der Grundaktivität und der Messungen mit Zugabe von Diazepam. Es ist zu erkennen, dass, ähnlich wie schon in Abb. 7, die Frequenz der Aktionspotentiale mit steigender Diazepam-Konzentration abnimmt.

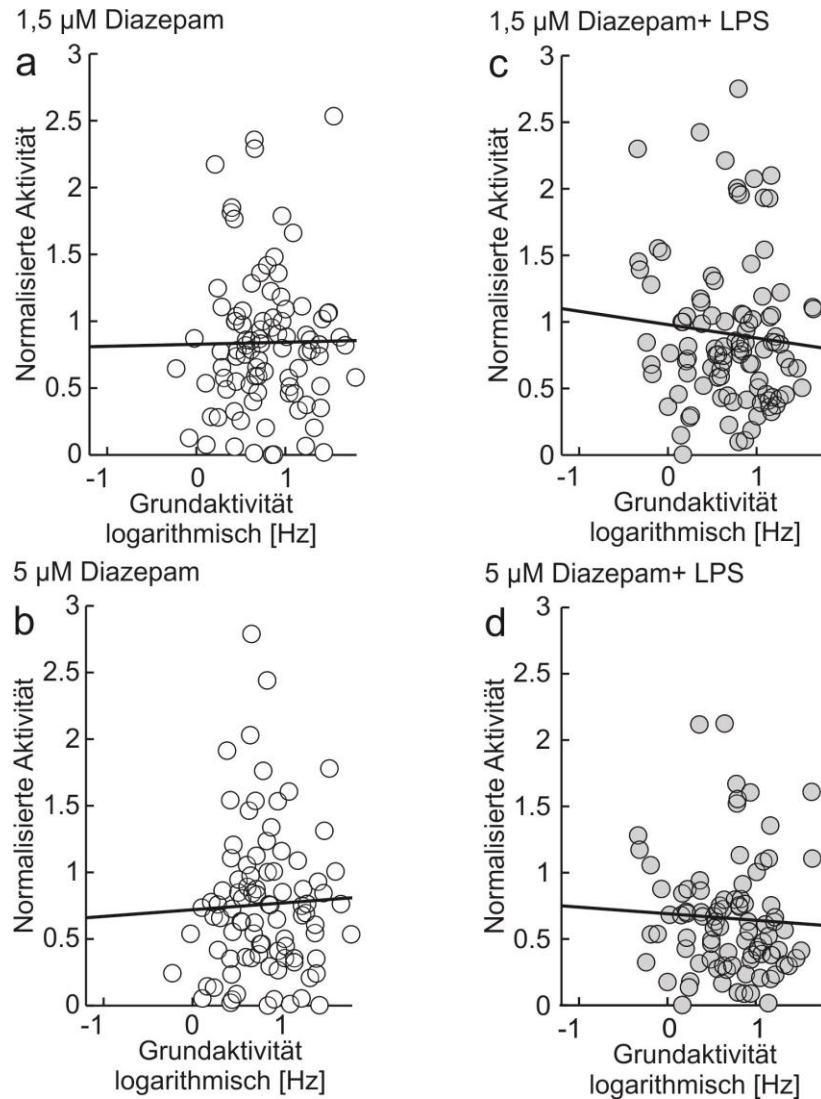


Abb. 14: Einfluss der Grundaktivität auf die Diazepam-Wirksamkeit
 Jeder Punkt stellt eine Einzelmessung dar, die Daten wurden gegen die Grundaktivität normalisiert. Dabei entspricht ein Wert von 1 einer fehlenden Hemmung der Aktionspotentialfrequenz durch Zugabe von Diazepam, ein Wert von 0,5 einer Hemmung um 50% und ein Wert von 2 einer Erhöhung um 100%. Die Grundaktivität der Zellkulturen (x-Achse) ist logarithmisch aufgetragen gegen den normalisierten Effekt (y-Achse), den 1,5 μM (a und c) bzw. 5 μM (b und d) Diazepam auf die Aktionspotential Frequenz der jeweiligen Kulturen haben. Es wurde jeweils eine einfach lineare Regressionsgerade anhand der Messwerte berechnet und als Linie eingezeichnet. Es sind Kulturen ohne vorherige LPS-Inkubation (weiß) und Kulturen mit vorheriger LPS-Inkubation (grau) dargestellt. Ausgewertet wurden 103 Messungen ohne LPS-Inkubation und 113 Messungen mit vorheriger Inkubation.

Um den Einfluss von LPS-Inkubation auf den GABA-Rezeptor näher zu untersuchen wurde der Effekt von 1,5 μM und 5 μM Diazepam in Abhängigkeit von der Grundaktivität der Zellkulturen dargestellt (Abb. 14). Dabei wurden Kontrollkulturen mit Kulturen nach vorangegangener LPS-Inkubation verglichen.

Auch hier wurde die Aktionspotential-Frequenz nach Diazepam-Zugabe gegenüber der Aktivität in der Kontrollmessung normalisiert (vgl. Abb. 11).

Die Steigungen der Regressionsgeraden in Abb. 14 lassen eine Betrachtung der Aktivitätsabhängigkeit der Diazepam-Wirkung zu. Je steiler die Gerade verläuft, desto abhängiger ist die Wirkung von Diazepam von der Grundaktivität. Teilabbildung **Abb. 14 a** und **b** stellen die Wirkung von 1,5 μM Diazepam (Abb. 14 a) und

5 μM Diazepam (Abb. 14 b) ohne den Einfluss von LPS dar, in Abb. 14 c und d sind die Messungen unter LPS-Einfluss gezeigt.

In Teilabbildung 14 a, der Messung des Effektes von 1,5 μM Diazepam, lässt sich kein relevanter Einfluss der Grundaktivität auf den Effekt von Diazepam erkennen, da die Gerade weder relevant abfällt noch ansteigt.

Betrachtet man die Regressionsgerade in Teilabbildung 14 b, so ist erkennbar, dass mit steigender Grundaktivität die Wirkung von 5 μM Diazepam etwas schwächer wird. Je mehr Aktionspotentiale also grundsätzlich von den kultivierten Zellen generiert werden, desto geringer fällt der Effekt aus, den die frequenzsenkende Wirkung von Diazepam hat.

In den Teilabbildungen 14 c und d, den Messungen nach LPS-Inkubation, ist wiederum eine Zunahme der Effektstärke bei steigender Grundaktivität zu sehen. Je höher also die Grundaktivität der LPS-inkubierten Zellkultur ist, desto stärker ist der aktivitätssenkende Effekt von Diazepam. Dieser augenscheinliche Unterschied im Vergleich zu den Kontrollkulturen wird nachfolgend näher betrachtet.

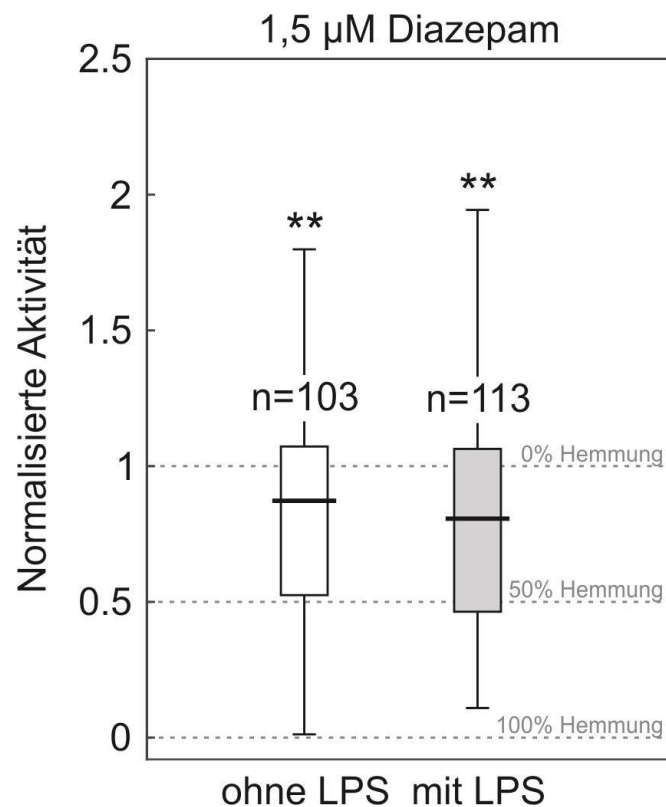


Abb. 15: Normalisierter Effekt von 1,5 μ M Diazepam ohne und mit LPS-Inkubation

Die Aktivität der Kulturen nach Zugabe von 1,5 μ M Diazepam wurde jeweils gegen die Grundaktivität normalisiert. Die normalisierte Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen. Dargestellt ist die Gruppe ohne LPS-Inkubation (weiß) und Messungen nach LPS-Inkubation (grau). Zur besseren Anschaulichkeit sind die Werte für 0 %, 50 % und 100 % Hemmung mit horizontalen Linien markiert. Der Querstrich in der Box stellt den Median dar. Die Whiskers markieren den 1,5 fachen Interquartilsabstand. n = Anzahl der Messungen. Signifikante Effekte sind gekennzeichnet (*).

Der Effekt von 1,5 μ M Diazepam auf die Aktivität der Zellkulturen wurde statistisch ausgewertet und in einem Boxplot-Diagramm dargestellt (Abb. 15).

In weiß ist die normalisierte Aktivität, das heißt die Aktionspotentialfrequenz nach Diazepamzugabe normalisiert gegen die Grundaktivität der Kulturen mit Zugabe von 1,5 μ M Diazepam ohne vorherige LPS-Inkubation dargestellt, in grau die Aktivität der Kulturen mit vorheriger LPS-Inkubation und Zugabe von 1,5 μ M Diazepam.

Erkennbar ist, dass in beiden Gruppen die Zugabe von 1,5 μ M Diazepam zu einer Senkung der Aktionspotentialfrequenz im neuronalen Netzwerk des Rückenmarks führt.

Wie schon zuvor in Abb. 12 zeigt ein Wert des Medians kleiner eins auf der y-Achse eine Verringerung der Aktionspotential-Frequenz durch Diazepam und ein Wert größer eins eine Erhöhung an. Der Median der Kulturen ohne LPS-Inkubation liegt bei 0,861, der Median der Kulturen mit LPS-Inkubation bei 0,795. In Kulturen mit vorheriger LPS-Inkubation führen 1,5 μ M Diazepam also zu einer Hemmung um 20,5 % und damit zu einer um 6,6 Prozentpunkte stärkeren Hemmung als Diazepam in Kulturen ohne induzierte Entzündung. Die Messungen wurden mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Dabei zeigt sich sowohl in den Kulturen ohne Entzündung ($p=0,0059$), als auch in den Kulturen mit Entzündung ($p=0,0098$) eine statistisch signifikante Senkung der Aktionspotential-Frequenz durch die Zugabe von Diazepam. Es zeigt sich jedoch im Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe ohne LPS-Inkubation und der Gruppe mit LPS-Inkubation.

Um eine mögliche Wirkung von LPS-Inkubation am GABA-Rezeptor tiefergehend zu untersuchen wurden weiterführende, intrazelluläre Experimente mit Diazepam vorgenommen. So lässt sich ein möglicher Effekt von LPS auf die postsynaptischen GABAergen Potentiale messen. Ausgewertet wurden die Veränderung der Abklingzeit, der Halbwertsbreite und der Ladung pro IPSC.

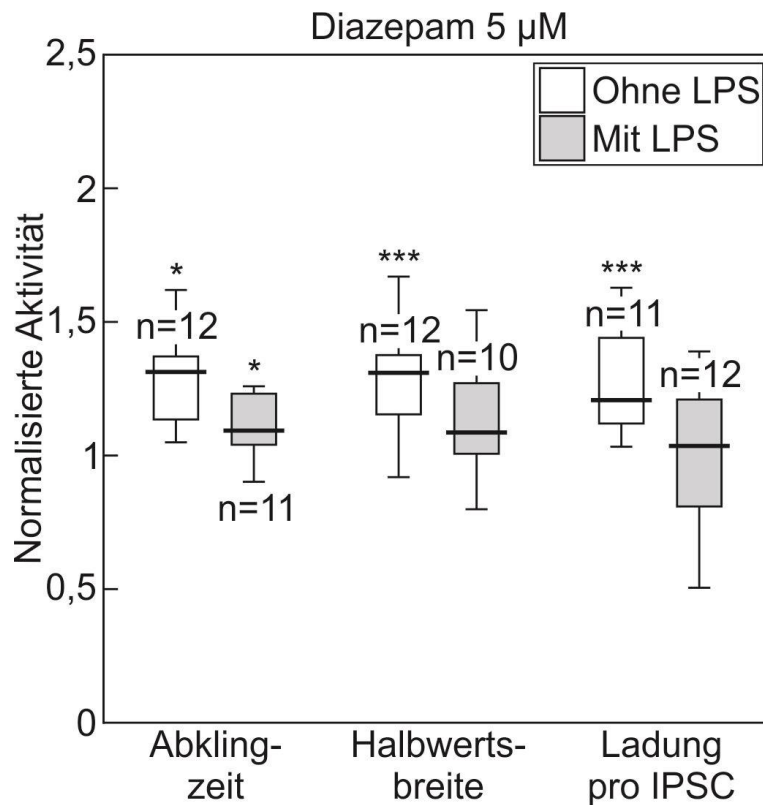


Abb. 16: Auswertung der intrazellulären Messungen mit 5 µM Diazepam
 Abgebildet sind die Parameter Abklingzeit, Halbwertsbreite und Ladung pro IPSC. In weiß sind die Messungen ohne, in grau die Messungen mit LPS-Inkubation dargestellt. Die schwarzen Querstriche stellen die Mediane dar, die Whiskers markieren den 1,5 fachen Interquartilsabstand. Auf der y-Achse sind die normalisierten Parameter der IPSCs aufgetragen. Signifikante Effekte von 5 µM Diazepam sind gekennzeichnet (*). n= Anzahl der Messungen

Die Ergebnisse sind in Abb. 16 als Boxplot dargestellt. Dabei wurden die Messungen mit Zugabe von 5 μM Diazepam gegen die jeweilige Kontrollmessung normalisiert. Ein Zahlenwert über eins entspricht dabei einer Vergrößerung der Werte des jeweiligen Parameters durch Zugabe von Diazepam, ein Zahlenwert unter eins einer Verkleinerung. Bei intrazellulärer Ableitung zeigte nur 5 μM Diazepam – die höhere der getesteten Konzentrationen – einen Unterschied zwischen den Ergebnissen ohne und mit LPS-Inkubation. Die Daten wurden mithilfe des Lilliefors-Tests auf Normalverteilung untersucht. Der Effekt von Diazepam wurde, je nach Verteilung der Datensätze vor Normalisierung, durch den t-Test oder den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf Signifikanz getestet. Unter Normalbedingungen führen 5 μM Diazepam zu einer statistisch signifikanten Vergrößerung aller betrachteten Parameter. Der p-Wert der Abklingzeit liegt bei 0,0453 im t-Test, bei der Halbwertsbreite ist $p=0,0004$ im t-Test und bei der Ladung pro IPSC ist $p=0,001$ im Vorzeichen-Rang-Test. In den Messungen nach LPS-Inkubation wird nur die Abklingzeit durch Diazepam signifikant verlängert ($p=0,0186$ im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Bei der Halbwertsbreite ist $p=0,0761$ im t-Test und damit nicht statistisch signifikant. Auch die Ladung pro PSC zeigt bei $p=0,966$ keine statistisch signifikante Veränderung durch die Diazepamzugabe. Getestet wurden jeweils die Parameter nach Diazepamzugabe gegen die Kontrollmessungen vor Diazepamzugabe.

Auch die Mediane der normalisierten Daten zeigen den Unterschied zwischen Messungen ohne und mit LPS-Inkubation: bei den Messungen ohne LPS liegt der Median der normalisierten Abklingzeit bei 1,313, bei den Messungen mit LPS bei 1,093. Auch bei der normalisierten Halbwertsbreite liegt der Median der Messungen mit LPS mit 1,086 tiefer als der Median der Kontrollmessungen mit 1,309. Das gleiche Ergebnis findet sich bei der normalisierten Ladung pro IPSC, auch hier liegt der Median ohne LPS-Inkubation bei 1,207 und mit LPS-Inkubation bei 1,036. Je weiter der Median von 1 entfernt liegt, desto größer der Effekt, den 5 μM Diazepam auf den jeweiligen Parameter hat. Um zu überprüfen, ob die Behandlung der Kulturen mit LPS zu einem signifikanten Unterschied innerhalb der einzelnen Parameter führt, wurden die normalisierten Daten ohne und mit LPS-Inkubation, welche im Boxplot aufgetragen sind, gegeneinander getestet.

Lediglich die Ladung pro IPSC zeigt im t-Test für unverbundene Stichproben einen signifikanten Unterschied zwischen Kulturen ohne bzw. mit LPS-Inkubation ($p=0,015$). Die Abklingzeit ist bei $p=0,06$ durch LPS-Inkubation nicht signifikant verändert, auch die Halbwertsbreite wird mit $p=0,098$ nicht signifikant beeinflusst. Alle drei Datensätze sind normalverteilt.

Zusammenfassend legen die extra- und intrazellulären Daten nahe, dass die Inkubation der Zellkulturen mit LPS zu keiner signifikanten Potenzierung der Diazepam-Wirkung im neuronalen Netzwerk führt. Entzündung scheint dabei den GABA-Rezeptor nicht signifikant zu beeinflussen, auch die Intrazellulärdaten lassen dies als wahrscheinlich erscheinen. Dort zeigt sich hauptsächlich eine nicht signifikante Wirkung von Diazepam bei Zellen mit LPS-Inkubation, die jedoch nicht durchweg signifikant schwächer als die Wirkung von Diazepam in Kontrollkulturen ausfällt.

3.4. Beeinflussung der Muskelaktivität durch Entzündung und NO711

In den verwendeten Co-Kulturen von Rückenmark und Muskelzellen werden durch die von Nervenzellen spontan generierten Aktionspotentiale auch Motoneurone erregt. Die Aktivität der Motoneurone führt zu Bewegung der Muskelzellen. Diese Bewegung lässt sich videomikroskopisch aufzeichnen (vgl. Kapitel 2.4).

Es stellt sich die Frage, ob nicht nur die neuronale Aktivität (vgl. Kapitel 3.2), sondern auch die motoneuronale Aktivität von LPS-Inkubation beeinflusst wird. Dabei werden die Muskelbewegungen, die in der Region of Interest (ROI) detektiert werden, gegen die Zeit aufgetragen (vgl. Kapitel 2.4). Die Frequenz wird aus den Messungen, die eine bestimmte Schwelle überschreiten errechnet (vgl. Kapitel 2.6.2). In Abb. 17 sind die Rohdaten einer solchen videomikroskopischen Messung exemplarisch abgebildet.

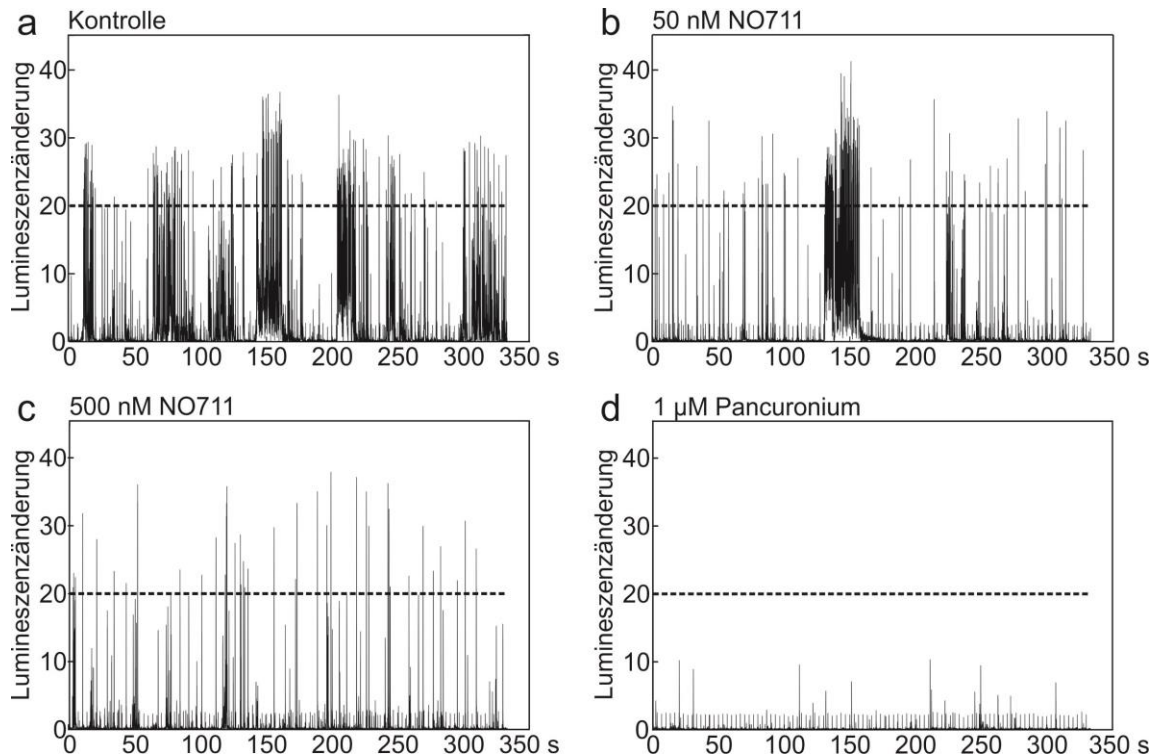


Abb. 17: Rohdatenspurten videomikroskopischer Messungen

Die Abbildung zeigt die Kontrollmessung ohne Zusatz, sowie die Messung mit 50 nM NO711, 500 nM NO711 bzw. 1 μ M Pancuronium. Je Bedingung ist eine 340 Sekunden lange Messung dargestellt (x-Achse). Die y-Achse zeigt die Höhe der Lumineszenzänderung als Maß für die Bewegung in der ROI. Jeder senkrechte Strich entspricht einer Lumineszenzänderung durch Bewegung. Die in dieser Messung verwendete, manuell über dem Grundrauschen festgelegte Schwelle ist als waagerechte Linie eingezeichnet.

In Teilabbildung 17 a zeigt die motoneuronale Aktivität in der Kontrollmessung. Teilabbildung 17 b zeigt die Muskelaktivität nach Zugabe von 50 nM NO711 und Teilabbildung 17 c die Aktivität unter Einfluss von 500 nM NO711. Die Applikation von 1 μ M Pancuronium führt erwartungsgemäß zu einer starken Unterdrückung der Muskelaktivität (Abb. 17 d). In der Messung mit Pancuronium muss die Frequenz der Bewegung deutlich niedriger sein als in den vorangegangenen Messungen. Ist dies der Fall, so kann man davon ausgehen, dass die Aktivität der Muskelzellen über Motoneurone vermittelt wird und keine autonome Aktivität ist.

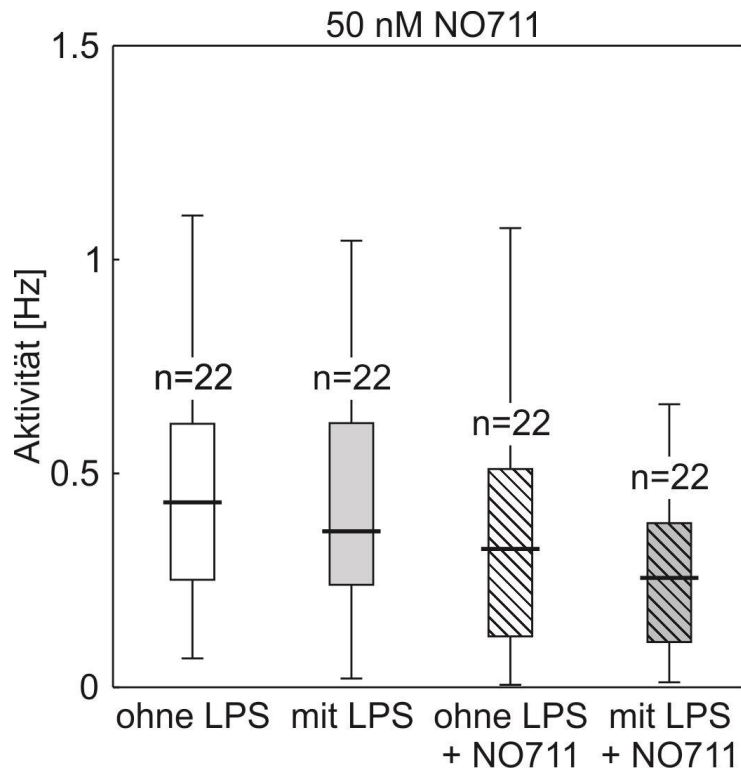


Abb. 18: Motoneuronale Aktivität unter verschiedenen Bedingungen
 Die y-Achse zeigt die Aktivität in Hertz für die Kontrollmessung (weiß), die Messung nach Inkubation mit LPS (grau), nach Zugabe von 50 nM NO711 (weiß schraffiert) und nach Inkubation mit LPS und Zugabe von 50 nM NO711 (grau schraffiert). Die Querstriche zeigen der Median, die Whiskers den 1,5 fachen Interquartilabstand. n = Anzahl der ausgewerteten Messungen

Die Aktivität der Motoneurone wurde unter den verschiedenen gemessenen Bedingungen aufgetragen (Abb. 18). Bei allen Bedingungen wurden 22 Messungen in die Auswertung mit aufgenommen.

Aufgetragen ist die Kontrollmessung ohne Zugabe jeglicher Substanzen, die Kontrollmessung nach Inkubation mit LPS und die Messungen mit 50 nM NO711 bei Zellkulturen ohne/mit induzierter Entzündung.

Der Median der Kontrollmessung ohne LPS und ohne NO711 zeigt den höchsten Wert (0,4382 Hz). Bei allen anderen Versuchsbedingungen liegt der Wert des Medians tiefer und zwar in folgender Reihenfolge kontinuierlich abfallend: Messung mit LPS-Inkubation (0,3794 Hz), Zugabe von 50 nM NO711 ohne vorherige LPS-Inkubation (0,3279 Hz) und Zugabe von 50 nM NO711 nach LPS-Inkubation (0,2603 Hz). Die Unterschiede zwischen den Messungen sind jedoch nicht statistisch signifikant.

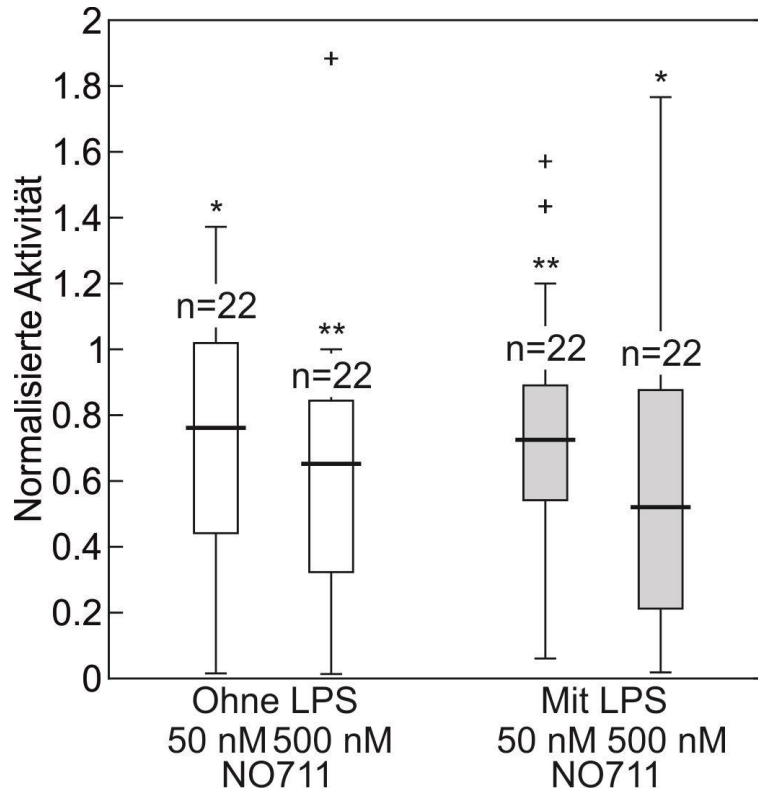


Abb. 19: Wirksamkeit von NO711 auf motoneuronale Aktivität
 Die Daten wurden gegenüber der Kontrollmessung normalisiert. Die normalisierte Aktivität ist auf der y-Achse aufgetragen: die Messungen ohne LPS-Inkubation (weiß) und mit vorheriger LPS-Inkubation (grau), jeweils mit Zugabe von 50 nM oder 500 nM NO711. Der Querstrich markiert den Median, die Whiskers den 1,5fachen Interquartilabstand. Statistisch signifikante Effekte sind über der jeweiligen Versuchsbedingung markiert (*). Ausreißer, die größer als der 1,5 fache Interquartilabstand sind, sind gekennzeichnet (+). n = Anzahl der ausgewerteten Messungen

Die Messungen wurden hinsichtlich des Effekts der GABA-Wiederaufnahmehemmung durch 50 nM und 500 nM NO711 jeweils ohne, bzw. mit LPS-Inkubation genauer ausgewertet und als Boxplot dargestellt (Abb. 19). Der Effekt von NO711 wurde dabei gegenüber der Grundaktivität der Motoneurone normalisiert.

Die Mediane der Messungen mit 50 nM NO711 liegen bei 0,761 ohne LPS-Inkubation und bei 0,652 mit LPS-Inkubation. Die Mediane der Messungen mit 500 nM NO711 liegen bei 0,725 ohne LPS-Inkubation und bei 0,521 mit LPS-Inkubation. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zeigt, dass sowohl der Effekt von 50 nM NO711 ($p=0,033$) als auch der Effekt von 500 nM ($p=0,005$) ohne die Inkubation mit LPS zu einer statistisch signifikanten Verringerung der

motoneuronalen Aktivität führt. Auch die Muskelaktivität in Zellkulturen nach LPS-Inkubation zeigt eine signifikante Frequenzsenkung, sowohl durch 50 nM NO711 ($p=0,003$) als auch durch 500 nM NO711 ($p=0,022$).

Testet man mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test auf einen Unterschied zwischen den Messungen ohne und mit LPS-Inkubation, so lässt sich jedoch sowohl bei den Messungen mit 50 nM NO711 als auch bei den Messungen mit 500 nM NO711 kein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,509$ bei 50 nM, $p=0,674$ bei 500 nM).

Aus diesen Ergebnissen kann folgende Schlussfolgerung abgeleitet werden: in den Zellkulturen wird die Muskelaktivität signifikant durch die Hemmung des GAT-1 GABA-Wiederaufnahme-Transporters verringert. Diese Verringerung wird durch die Induktion von Entzündung mittels LPS nicht statistisch signifikant beeinflusst.

3.5. Einfluss von Entzündung und NO711 auf inhibitorische postsynaptische Ströme

Bei der Messung intrazellulärer Ströme werden spezifisch inhibitorische Potentiale an der Postsynapse (IPSC), die von GABA ausgelöst werden, abgeleitet. In Abb. 20 sind exemplarisch die Rohdatenspuren von drei intrazellulären Messungen abgebildet: einer Kontrollmessung, sowie Messungen unter Zugabe von NO711. Aufgrund der sehr kurzen Dauer der IPSCs wurde für die Abbildung eine Intervalldauer von einer Sekunde gewählt. Dadurch wird die charakteristische Form der IPSCs sichtbar. Auffällig ist sowohl der steile Abfall als auch der unterschiedlich flache Wiederanstieg der einzelnen Potentiale. Trotz der kleinen Intervalldauer sind augenscheinlich keine wesentlichen Unterschiede in der Form der IPSCs zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen erkennbar, da sich die Veränderungen im Millisekunden-, bzw. Picoampere-Bereich bewegen.

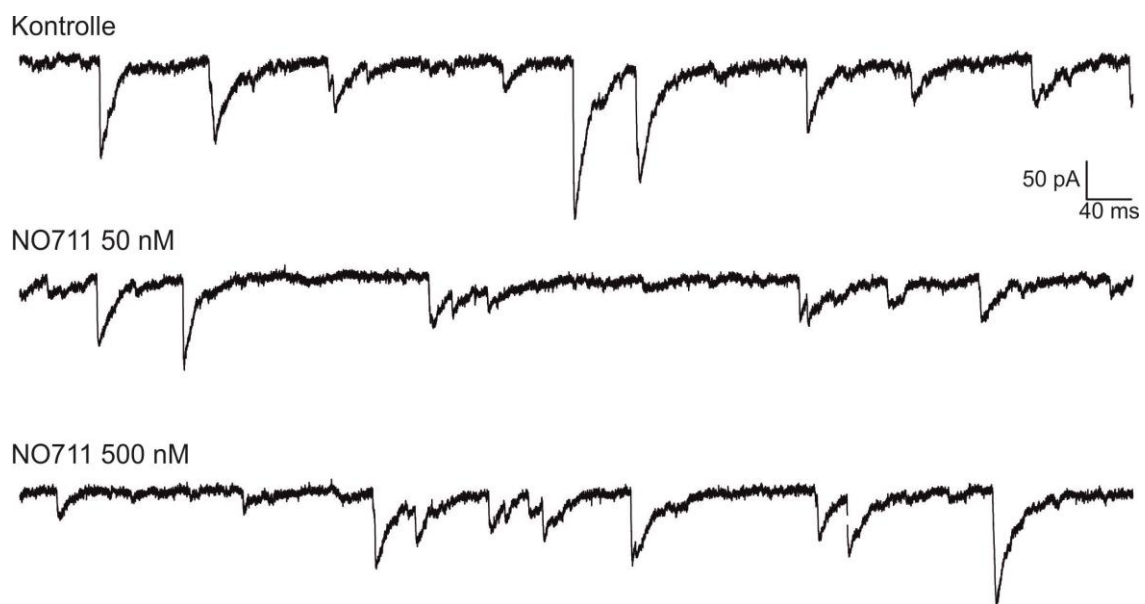


Abb. 20: Rohdatenspur einer intrazellulären Messung

Die Abbildung zeigt eine Kontrollmessung sowie Messungen mit 50 nM NO711 und 500 nM NO711. Die Größenverhältnisse sind angegeben. Je Bedingung ist 1 Sekunde Messdauer dargestellt. Die IPSCs sind durch ein senkrecht abfallendes und langsam wieder ansteigendes Potential erkennbar.

Die kinetischen Eigenschaften der IPSCs lassen sich anhand verschiedener Parameter quantitativ darstellen. Ausgewertet werden die Halbwertsbreite, die Abklingzeit, die Ladung pro postsynaptischen Strom, die Amplitude und die Frequenz der IPSCs als Mittelwert von mehreren Messungen. In Tab. 5 sind die Mittelwerte dieser Parameter der IPSCs tabellarisch unter verschiedenen Bedingungen aufgetragen: die Kontrollmessungen, sowie die Werte nach Zugabe von 50 nM NO711 bzw. 500 nM NO711, jeweils ohne und mit LPS-Inkubation.

Es wurde getestet, welche Parameter durch die Zugabe von NO711 eine statistisch signifikante Änderung aufweisen, diese wurden in Tab. 5 grau hinterlegt. Je nach Verteilung der Daten (getestet mit dem Lilliefors-Test) wurde der t-Test für normalverteilte Daten oder der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für nicht normalverteilte Daten angewandt. Demnach verändern sich ausschließlich die Parameter Halbwertsbreite und Abklingzeit nach Inkubation mit LPS signifikant. Bei Kulturen ohne LPS-Inkubation zeigt NO711 keinen signifikanten Effekt.

Tab. 5: Mittelwerte der IPSC-Parameter mit NO711

Bedingung	Parameter	Kontrolle	50 nM NO711	n	500 nM NO711	n
ohne LPS-Inkubation	Halbwertsbreite (ms)	11,428	11,889	27	11,263	20
	Abklingzeit (ms)	23,917	25,040	27	23,483	21
	Ladung pro IPSC (pA)	0,958	0,922	26	0,843	20
	Amplitude (mV)	34,559	32,912	24	27,810	17
	Frequenz (Hz)	4,678	4,904	22	3,746	17
mit LPS-Inkubation	Halbwertsbreite (ms)	12,113	13,086	17	13,067	13
	Abklingzeit (ms)	23,963	25,035	17	24,265	13
	Ladung pro IPSC (pA)	1,014	0,909	17	0,907	14
	Amplitude (mV)	38,648	33,152	15	35,356	11
	Frequenz (Hz)	9,303	8,130	15	9,356	12

Ausgewertet wurden intrazelluläre Messungen von Kontrollkulturen, Messungen nach Zugabe von 50 nM NO711 und 500 nM NO711, jeweils ohne und mit LPS-Inkubation. Gezeigt sind die Mittelwerte der Parameter. Bei den einzelnen Messungen wurden die angegebenen Parameter analysiert und aus den Ergebnissen der angegebenen Anzahl an Messungen (n) wurde ein Mittelwert errechnet. n ist bei den Kontrollen identisch mit den Messungen unter Zusatz von 50 nM NO711; die Anzahl an Messungen mit 500 nM ist jedoch geringer, da sich bei einigen Messungen die untersuchte Zelle von der Pipette löste. Statistisch signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollmessung sind grau hinterlegt.

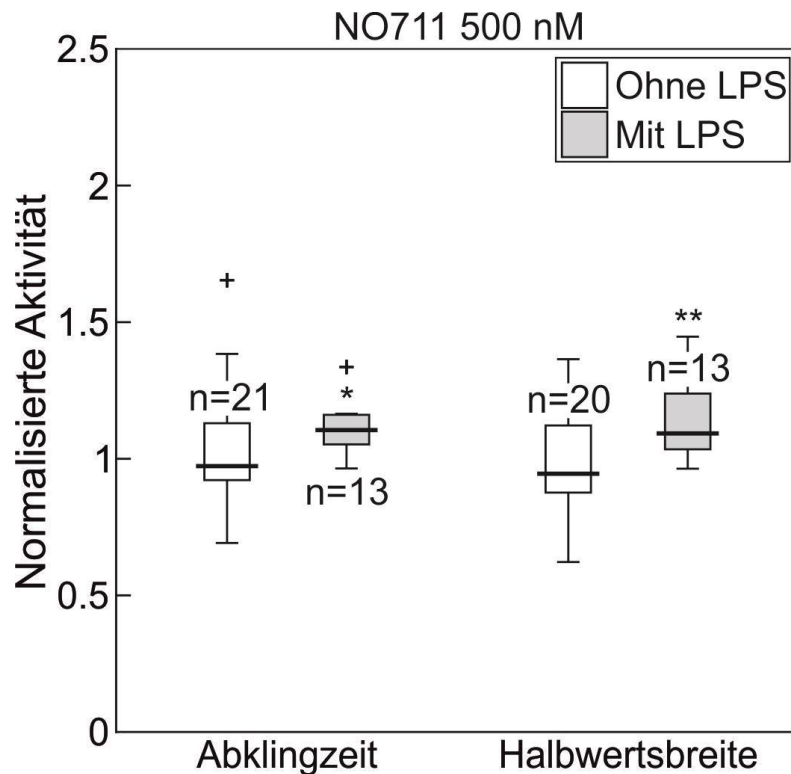


Abb. 21: Abklingzeit und Halbwertsbreite in intrazellulären Messungen mit 500 nM NO711

Dargestellt sind die gegen die Kontrollmessung normalisierten Effekte von 500 nM NO711 auf die Abklingzeit und die Halbwertsbreite ohne LPS-Inkubation (weiß) und mit LPS-Inkubation (grau). Der Querstrich kennzeichnet den Median, die Whiskers den 1,5 fachen Interquartilabstand. Signifikante Effekte (*) von 500 nM NO711 und Ausreißer, die größer als das 1,5fache des Interquartilbereichs sind (+), sind gekennzeichnet. n = Anzahl der Messungen

Die Parameter Abklingzeit und Halbwertsbreite werden in Abb. 21 näher betrachtet. Der Effekt von 500 nM NO711 wurde gegen die Grundaktivität normalisiert und als Boxplot dargestellt. Ein statistisch signifikanter Effekt von 500 nM NO711 lässt sich bei der Messung der Abklingzeit mit vorheriger LPS-Inkubation nachweisen (t-Test $p=0,021$). Auch die Halbwertsbreite wird durch 500 nM NO711 nach vorheriger Inkubation mit LPS signifikant verlängert (t-Test $p=0,003$). Nicht signifikant sind die Effekte auf die Abklingzeit und die Halbwertsbreite in den Messungen ohne vorherige LPS-Inkubation. Betrachtet man die Abklingzeit, so ist $p=0,385$ im t-Test. Bei der Halbwertsbreite ist $p=0,709$ im Vorzeichen-Rang-Test. Testet man die normalisierten Messungen je Parameter auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Messungen ohne und mit LPS-Inkubation, so lässt sich dieser nur bei der Halbwertsbreite feststellen. Hier führt induzierte

Entzündung zu einer signifikant stärkeren Verlängerung der Halbwertsbreite durch NO711 (Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test $p=0,013$). Die Abklingzeit zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messungen ohne und mit LPS.

Tab. 6: Mittelwert und Standardfehler der normalisierten IPSC-Daten mit 500 nM NO711

Bedingung	Parameter	n	MW	SEM
500 nM NO711 ohne LPS- Inkubation	Halbwertsbreite	20	0,992 ms	0,040
	Abklingzeit	21	1,041 ms	0,046
	Ladung pro PSC	20	0,973 pA	0,064
	Amplitude	17	0,971 mV	0,048
	Frequenz	17	0,795 Hz	0,094
500 nM NO711 mit LPS- Inkubation	Halbwertsbreite	13	1,154 ms	0,040
	Abklingzeit [°]	13	1,122 ms	0,044
	Ladung pro PSC	14	0,965 pA	0,077
	Amplitude	11	0,909 mV	0,058
	Frequenz	12	0,869 Hz	0,113

Die Daten, welche mit Zusatz von 500 nM NO711 erhoben wurden (vgl. Tab. 5) wurden gegen die Kontrollmessung normalisiert. Danach wurde sowohl die Mittelwerte (MW) als auch die Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für die analysierten Parameter errechnet. n = Anzahl der Messungen (vgl. Tab. 5). Nicht-normalverteilte Datensätze sind markiert (°).

In Tab. 6 sind die Mittelwerte aller ausgewerteten IPSC-Parameter (vgl. Tab. 5) aufgetragen. Zusätzlich wurde jeweils der Standardfehler des Mittelwerts errechnet. Je kleiner der Standardfehler, desto eher ist davon auszugehen, dass der erhobene Mittelwert sehr nah am wahren Mittelwert des jeweiligen Parameters liegt. Bei kleinen SEM kann von einer guten Qualität der Daten ausgegangen werden.

Zusammengefasst zeigen die intrazellulären Messungen mit NO711 einen signifikanten Effekt von LPS auf die Wirkung des GABA-Wiederaufnahmehemmers im Sinne einer verlängerten Wirkung von GABA, sichtbar gemacht durch den Parameter Halbwertsbreite. Kein Effekt zeigt sich bei der Ladung pro IPSC, der Frequenz und der Amplitude. Eine längere Verweildauer von GABA im Extrazellulärraum und auch am GABA-Rezeptor ist anzunehmen.

3.6. Einfluss von Entzündung und NO711 auf tonische Ströme

Um einen eventuellen Einfluss von Entzündung auf extrasynaptische GABA-Rezeptoren zu ermitteln, wurden bei den intrazellulären Messungen zusätzlich die tonischen Ströme betrachtet.

Dazu wurde die Höhe der Basislinie der intrazellulären Messungen ausgewertet, zunächst bei Zugabe von NO711 mit und ohne vorherige LPS-Inkubation und ein zweites Mal nach zusätzlicher Zugabe von 100 μM Bicucullin, einem selektiv kompetitiven GABA_A-Rezeptorantagonisten. Bicucullin unterdrückt die GABAergen Ströme intra- & extrasynaptisch. Die zusätzliche Unterdrückung der extrasynaptischen Ströme, im Vergleich zu den vorhergegangenen Messungen, lässt eine Differenzierung zwischen dem Einfluss phasischer und tonischer GABA-Rezeptoren zu. Eine Beteiligung tonischer GABA-Rezeptoren an der messbaren Wirkung von NO711 liegt vor, wenn die Zugabe von Bicucullin zu einer signifikanten Anhebung der Basislinie und einer Abnahme der IPSC-Frequenz führt. Der tonische GABAerge Einfluss hält das gemessene Potential über der Zellmembran dauerhaft niedrig. Fehlt er, kommt es zur beschriebenen Hebung des Potentials durch den Wegfall von Chloridionenströmen über der Membran. Die Blockade der phasischen, intrasynaptisch sitzenden GABA-Rezeptoren bedingt das Fehlen der IPSCs.

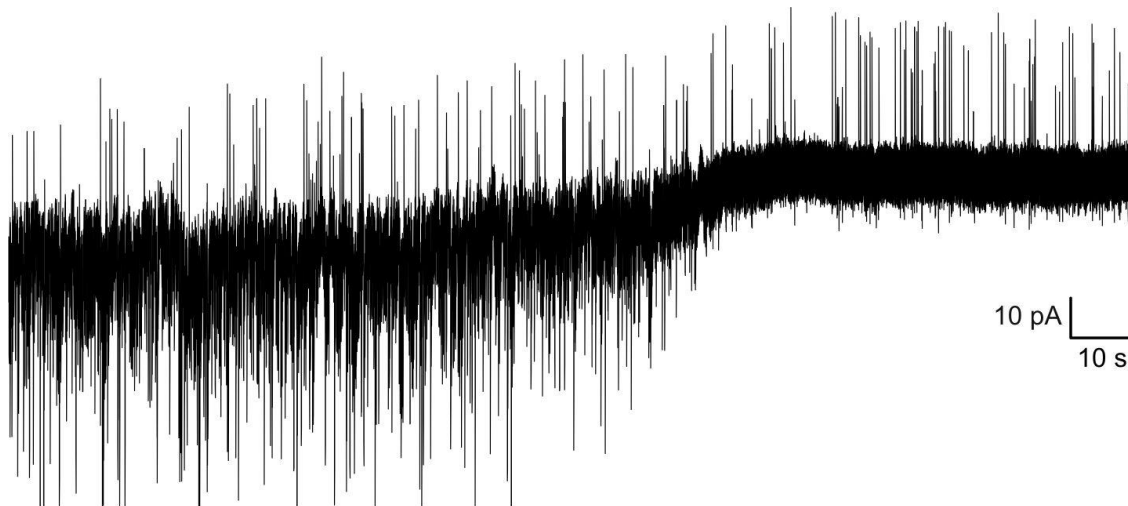


Abb. 22: Rohdatenspur einer intrazellulären Messung tonischer GABAerger Ströme

Dargestellt sind 3 Minuten einer intrazellulären Messung. Vor dem Start der Messung wurden 500 nM NO711 und 100 μ M Bicucullin zugegeben, entsprechend dem Messprotokoll (vgl. Abb. 6). Es kommt zu sichtbarer Hebung der Basislinie und Wegfall der IPSCs. Der Maßstab ist dargestellt.

Die Anhebung der Basislinie und der Wegfall der IPSCs ist in Abb. 22 durch eine Rohdatenspur exemplarisch dargestellt. Abgebildet ist eine komplette Messung über 3 Minuten. Der sigmoidale Anstieg der Basislinie ca. 100 Sekunden nach Zugabe von 100 μ M Bicucullin und das Wegfallen der negativen Potentiale werden deutlich erkennbar.

Um die Basislinienveränderung der intrazellulären Messung zu quantifizieren wurde die Höhe der Basislinie ausgewertet. Dazu wurde jeweils einmal vor und nach dem Anstieg der Basislinie durch Wirkungseintritt von Bicucullin die Höhe in pA ermittelt. Dazu wurde eine repräsentative, ca. 40 Sekunden langen Sequenz einmal vor (Zeitpunkt 1) und einmal nach (Zeitpunkt 2) dem Anstieg der Basislinie bewertet. Die Mittelung wurde vorgenommen, da die Basislinie grundsätzlich immer etwas in der Höhe schwankt, durch die Mittelung wurden diese diskreten Schwankungen ausgeglichen. Die verwendeten Sequenzen lagen jeweils 50-70 Sekunden auseinander, je nach Lokalisation der möglichst repräsentativen Sequenzen.

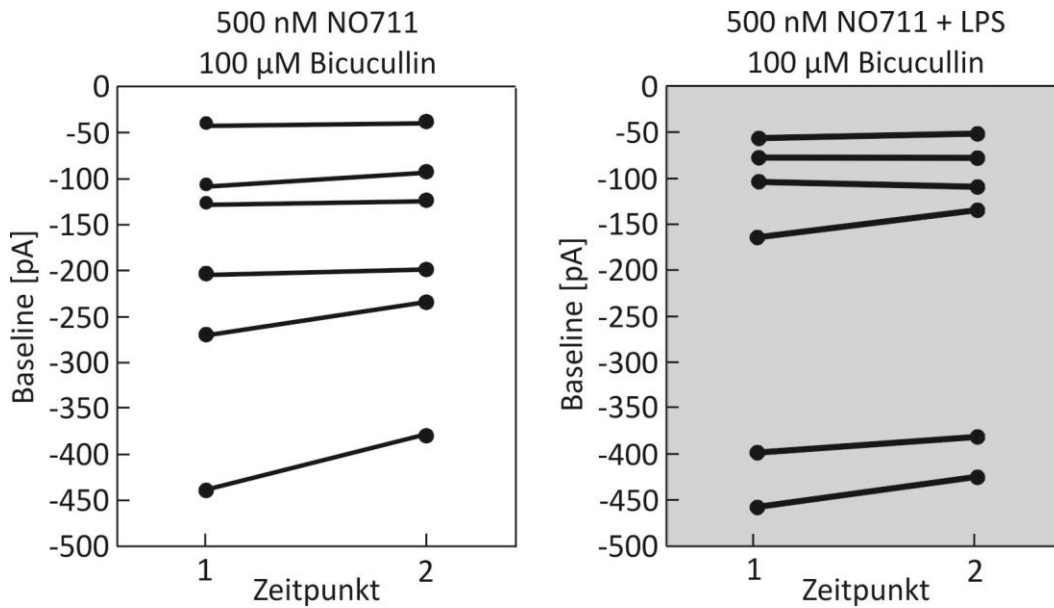


Abb. 23: Effekt von 500 nM NO711 und 100 µM Bicucullin auf die Basislinie intrazellulärer Ableitungen mit und ohne Induktion von Entzündung
 Ausgewertet wurden je 6 Messungen mit 500 nM NO711 und 100 µM Bicucullin ohne vorherige LPS-Inkubation (weiß) und mit vorheriger LPS-Inkubation (grau). Abgebildet ist die Höhe der Mittelwerte der Basislinie (in pA, y-Achse) zu Zeitpunkt 1 und 2, ermittelt jeweils vor (Zeitpunkt 1) und nach (Zeitpunkt 2) dem Wirkungseintritt von Bicucullin.

In Abb. 23 sind die Mittelwerte der Messungen zum Zeitpunkt eins und Zeitpunkt zwei aufgetragen. Es wurden je 6 Messungen unter Zugabe von 500 nM NO711 und 100 µM Bicucullin ohne (weiß) und mit LPS-Inkubation (grau) ausgewertet. Bei den Messungen ohne vorherige LPS-Inkubation zeigen die Mittelwerte der Basislinienerhöhung nur bei drei von sechs Messungen einen sichtbaren Anstieg der Basislinie. Auch bei den Messungen mit vorheriger LPS-Inkubation ist nur bei drei der 6 Messungen ein sichtbarer Anstieg erkennbar. Die restlichen Messungen zeigen entweder nur einen schwachen Anstieg oder sogar einen Abfall der Basislinie. Dabei ist, unabhängig von der LPS-Inkubation, augenscheinlich keine Regelmäßigkeit erkennbar, welche Messungen einen starken Anstieg der Basislinie zeigen und welche nicht. Es gibt sowohl Messungen mit einer sehr niedrigen Basislinie, als auch Messungen mit einer hohen Basislinie, welche einen Anstieg zeigen. Um die starken Unterschiede in der Höhe des Ausgangswertes der Basislinie auszugleichen und nur die durch Bicucullin ausgelöste Steigung zu betrachten wurden die Messungen weiter statistisch ausgewertet.

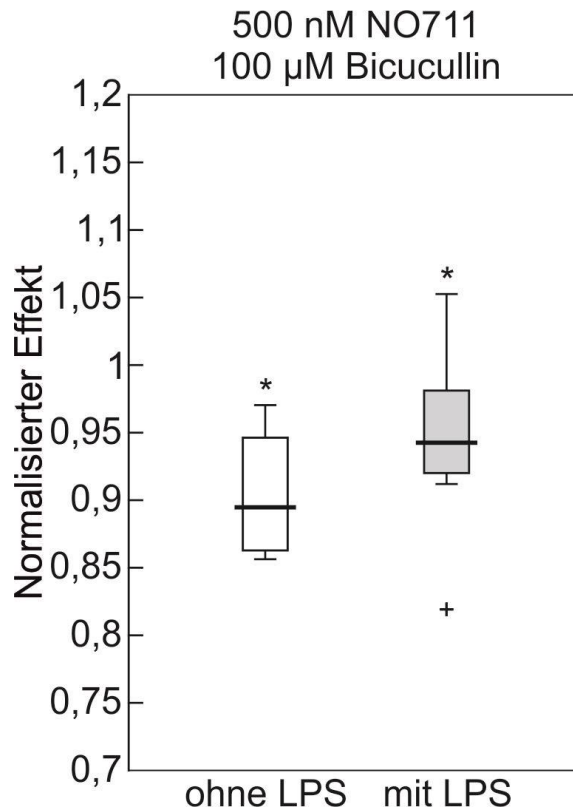


Abb. 24: Normalisierter Effekt von 500 nM NO711 und 100 μ M Bicucullin auf die Basislinie

Die Ergebnisse aus Abb. 23 nach Wirkungseintritt von Bicucullin und NO711 (Zeitpunkt 2) wurden gegen die Werte vor Wirkungseintritt (Zeitpunkt 1) normalisiert. Je Bedingung wurden 6 Messungen ausgewertet. Es sind die Messungen ohne LPS-Inkubation (weiß) und Messungen mit LPS-Inkubation (grau) dargestellt. Der Querstrich stellt jeweils den Median dar, die Whiskers den 1,5 fachen Interquartilabstand. Eine signifikante Hebung der Basislinie nach Bicucullin- und NO711-Zugabe ist markiert (*). Messungen, die größer als das 1,5 fache des Interquartilabstandes sind, sind gekennzeichnet (+).

In Abb. 24 sind die an Zeitpunkt zwei gegen den Mittelwert der Basislinie an Zeitpunkt eins normalisierten Daten (vgl. Abb. 23) als Boxplot dargestellt. So soll der Einfluss von Entzündung auf die tonischen GABA-Rezeptoren näher betrachtet werden. Aufgetragen sind die Versuchsreihen mit 500 nM NO711 und 100 μ M Bicucullin ohne LPS-Inkubation und mit LPS-Inkubation.

Mithilfe des Lilliefors-Tests wurden die Datensätze auf Normalverteilung untersucht, bei $p > 0,05$ sind beide Datensätze normalverteilt. Die statistische Signifikanz der Auswirkung von 500 nM NO711 und Bicucullin auf die Höhe der Basislinie wurde mithilfe des t-Tests für verbundene Stichproben errechnet. Bei

den Messungen ohne LPS-Inkubation ist $p=0,036$ und bei den Daten mit vorheriger Induktion von Entzündung ist $p=0,042$. Somit zeigt sich, dass in beiden Datensätzen die Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Bicucullin zu einer signifikanten Hebung der Basislinie führt.

Der Vergleich zwischen den Datensätzen mit und ohne LPS-Inkubation ist von Interesse, da durch diese Berechnung sichtbar wird, ob Entzündung einen signifikanten Einfluss auf extrasynaptische GABA-Rezeptoren hat. Da die Datensätze normalverteilt sind, lässt sich für den Vergleich der Messungen ohne und mit vorheriger LPS-Inkubation der t-Test für unverbundene Stichproben anwenden. Getestet wurde, ob sich in der Basisliniendifferenz bei Bicucullinzugabe ein signifikanter Unterschied zwischen Messungen ohne und mit vorheriger LPS-Inkubation feststellen lässt. Die Messungen zeigen bei $p=0,357$ keinen signifikanten Unterschied durch Entzündung in der Basisliniendifferenz nach Bicucullinzugabe.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass tonische GABA-Rezeptoren an der Wirkung von GABA-Wiederaufnahme-Hemmern beteiligt sind. Jedoch konnte kein signifikanter Einfluss von Entzündung auf die tonischen GABA-Rezeptoren gemessen werden.

4. Diskussion

4.1. Aussagekraft der organotypischen Kulturen des Rückenmarks

Seit vielen Jahrzehnten werden organotypische Kulturen unterschiedlicher Gewebearten von unterschiedlichen Spezies zur Testung von Medikamentenwirkungen verwendet. Auch in der vorliegenden Arbeit wird das Ziel, entzündungsinduzierte Veränderungen im Rückenmark nachzuweisen, mithilfe von organotypischen Kulturen verfolgt. Bereits 1947 wurde die hier gebrauchte Technik der sogenannten „Roller Tubes“ zur Kultivierung von Nervengewebe von Hogue beschrieben (Hogue 1947). 1981 kam es zu einer Weiterentwicklung der Technik durch Gähwiler. Methodisch wurde dabei außerdem die Ableitung von elektrophysiologischen Potentialen aus den Kulturen ergänzt (Gähwiler 1981). In der vorliegenden Arbeit wird speziell das Rückenmark in Co-Kultur mit Muskelgewebe betrachtet. In anderen Veröffentlichungen wird mit organotypischen Kulturen von Cortex oder Hippocampusgewebe gearbeitet (Drexler et al. 2010, Frahm et al. 2001).

Ein Vorteil von organotypischen Zellkulturen ist, dass durch die Kultivierung verschiedener Zelltypen besonders das Zusammenspiel verschiedener Zellen und die Aktivität eines neuronalen Netzwerks beobachtet werden kann (Drexler et al. 2010). Für die vorliegende Fragestellung sind organotypische Kulturen nicht nur den klassischen Zellkulturen mit nur einer verwendeten Zellreihe, sondern auch den akuten, dickeren Gewebeschnitten überlegen. Die organotypischen Kulturen weisen nur eine geringe Dicke auf (ca. 50 μm), im Gegensatz zu den akuten Zellschnitten, die oft eine Dicke von ca. 400 μm aufweisen. Die geringe Dicke der organotypischen Kulturen kommt durch die Roller-Tube-Technik zustande, durch die sich oft nur eine einlagige Schicht aus Zellen auf den Objektträgern ausbildet (Gähwiler 1981). Somit spielt die Gewebegängigkeit von Medikamenten eine geringere Rolle und die Wirkung tritt schneller ein als bei dickeren Schnitten (Drexler et al. 2010). Dies lässt auch eine effizientere Versuchsdurchführung zu. Durch die Kultivierung verschiedener Zelltypen lässt sich das neuronale Netzwerk gut darstellen, was bei der Kultivierung eines einzelnen Zelltypus nicht möglich ist. Doch nicht nur die Zelltypen und ihre Reaktion entsprechen in den

organotypischen Kulturen weitestgehend dem lebenden Vorbild im zentralen Nervensystem, auch die Ausprägung der Rezeptoren lässt sich in den Kulturen gut mit dem lebenden Tier vergleichen (Holopainen & Lauren 2003). Zudem gleichen die gemessenen Aktionspotentialfrequenzen in organotypischen Kulturen annähernd den Frequenzen in vivo (Hentschke et al. 2005). Es ist also davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Veränderungen durch Entzündung im neuronalen Netzwerk organotypischer Kulturen sich auch im in vivo Modell finden ließen. Die Ergebnisse lassen somit sehr genaue Rückschlüsse darauf zu, wie sich die GABA-Wiederaufnahme durch GAT-1 an der GABAergen Synapse unter Inflammation verändert.

Jedoch sind die Ergebnisse nicht ohne weiteres mit in vivo Experimenten oder an anderen Spezies vorgenommenen Messungen vergleichbar. In einer Studie von Zhang et al wurde an sensiblen Neuronen des Menschen gezeigt, dass Entzündung vor allen Dingen die Wirkung von GABA an hochaffinen, extrasynaptischen (tonischen) GABA-Rezeptoren potenziert. Dieser Effekt wurde in der Studie auch in sensiblen Neuronen der Ratte nachgewiesen. Bei niederaffinen Rezeptoren und den entstehenden tonischen Strömen hingegen differieren die Ergebnisse der Studie zwischen den Spezies. Die humanen Zellen werden durch ein Chlorid-Konzentrationsgefälle stärker hyperpolarisiert als die Neurone der Ratten, in denen vor allen Dingen Natrium- und Kaliumkanäle eine Veränderung des Membranpotentials hervorrufen. Außerdem sind beim Menschen die GABAergen Ströme durchschnittlich langsamer als bei der Ratte (Zhang et al. 2015). Einige Ergebnisse aus Kulturen von tierischen Zellen ähneln also denen menschlicher Neuronen, jedoch sind definitive Rückschlüsse nur bei direkter Gegenüberstellung vergleichender Experimente an tierischem und menschlichem Gewebe möglich. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen somit zwar keine direkten Rückschlüsse auf das menschliche ZNS zu, sie können aber Hinweise auf die Vorgänge bei Entzündungen im Nervensystem liefern und damit richtungsweisend für weitergehende Untersuchungen sein.

4.2. Induktion von Inflammation in Zellkulturen

In experimentellen Sepsismodellen wird häufig die Inkubation mit LPS zur Entzündungsinduktion genutzt. Sie führt in organotypischen Kulturen zu einer Aktivierung der Mikroglia und einer signifikanten Konzentrationserhöhung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β oder TNF- α (Gao et al. 2014). Auch in Rückenmarkkulturen lässt sich eine signifikante Konzentrationserhöhung proinflammatorischer Zytokine (INF- γ & IL-8) nach LPS-Inkubation nachweisen (Streißenberger 2018). Auch periphere Entzündung kann eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine im ZNS auslösen. Dies wurde anhand von Ratten gezeigt, bei denen durch 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure eine intestinale Entzündung verursacht wurde. Dadurch kam es in nachfolgend angefertigten Hippocampus-Kulturen zu erhöhten TNF- α -Konzentrationen und erhöhter Mikroglia-Aktivierung (Riazi et al. 2008). Bisher ist jedoch nur wenig über die Wirkung von Entzündung auf spinale Neurone bekannt.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, um in Zellkulturen eine Entzündung auszulösen. Eine 2019 erschienene Arbeit vergleicht die Wirkung von LPS mit der von Zytokinen auf die GABAergen Ströme in organotypischen Rückenmarkskulturen. Dabei führte die Inkubation mit LPS zu geringeren Effekten auf die Aktivität des neuronalen Netzwerks als die Zugabe einer Mischung aus proinflammatorischen Zytokinen (Giacco et al. 2019). Auch die Zugabe von einzelnen proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1 β (Avramescu 2016), TNF- α oder IL-6 (Kawasaki et al. 2008) wurde von einigen Arbeitsgruppen genutzt, um eine Entzündung in Zellkulturen hervorzurufen. Die verschiedenen Zytokine zeigen dabei unterschiedliche Auswirkungen auf die kultivierten Neurone und ihre Rezeptoren. So wirkt IL-6 eher auf GABAerge und glycinerge Ströme, während TNF- α eher AMPA- oder NMDA-induzierte Ströme beeinflusst. Lediglich IL-1 β scheint einen Einfluss auf alle vier betrachteten Signalwege zu haben (Kawasaki et al. 2008).

Die Ausprägung der Reaktion des kultivierten neuronalen Netzwerks auf die Inkubation mit LPS ähnelt, den Zytokinkonzentrationen nach zu urteilen, der Ausprägung der Reaktion im ZNS bei in vivo peripher induzierter Entzündung. Bei der Induktion von peripherer Entzündung im Gastrointestinaltrakt kommt es

zu einem signifikanten, 1,3 fachen Anstieg der TNF- α Konzentration im Hippocampus (Riazi et al. 2008). Auch bei Inkubation mit LPS kommt es in den Zellkulturen zu einem signifikanten Anstieg der TNF- α Konzentration, der sich jedoch in der Höhe zwischen verschiedenen Veröffentlichungen unterscheidet. Dabei kommen die Ergebnisse, die durch Inkubation von Rückenmarkskulturen mit LPS erzielt wurden mit einem TNF- α Konzentrationsanstieg um das 2,75 fache (Streißenberger 2018) und die Ergebnisse von Gao et al. in Hippocampuskulturen mit einem 2,14 fachen TNF- α Anstieg (Gao et al. 2014) dem von Riazi beschriebenen, 1,3 fachen TNF- α Konzentrationsanstieg am nächsten (Riazi et al. 2008). Andere Veröffentlichungen legen einen deutlich stärkeren, ca. 12 fachen Anstieg der Zytokinkonzentration in den Zellkulturen durch LPS-Inkubation nahe (Giacco et al. 2019). Beim Vergleich der Ergebnisse muss jedoch auch die Dauer der Inkubation, die gewählte LPS-Konzentration, sowie der Zeitpunkt der Messungen und der verwendete Gewebetyp beachtet werden. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Inkubationsdauer von 18 Stunden liegt zwischen den von Gao und Giacco gewählten Zeiten. Gao et al. verwendeten eine dreifach höhere LPS-Konzentration, jedoch lediglich 30 Minuten Inkubationszeit, um eine akute Entzündung im Hippocampus zu simulieren (Gao et al. 2014). Giacco et al. verwendeten eine dreifach niedrigere Konzentration und werteten sowohl die neuronale Aktivität im Rückenmark nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden aus. Dabei wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit jedoch kein größerer Effekt als nach 6 Stunden festgestellt (Giacco et al. 2019). Da die Ergebnisse der Studie von Giacco bezogen auf den TNF- α Konzentrationsanstieg deutlich von den von Streißenberger erhobenen Daten differieren, scheint eine höhere LPS-Konzentration nicht automatisch eine stärkere Entzündungsreaktion zu bedingen.

Eine weitere Möglichkeit Neuroinflammation auszulösen ist, wie schon von Riazi et al. durchgeführt, die periphere Induktion einer Entzündung am lebenden Versuchstier mit einer darauffolgenden Entnahme und Untersuchung von Nervengewebe (Riazi et al. 2008). Diese Methode führt zu einem natürlichen Ablauf der Entzündung in vivo und berücksichtigt auch den Aspekt der explizit peripher und nicht zentral ausgelösten Neuroinflammation. Jedoch ist sie für darauffolgende elektrophysiologische Messungen weniger praktikabel als die

Verwendung von Zellkulturen. Durch die Induktion der Entzündung direkt in den organotypischen Kulturen können die Messungen standardisierter und effizienter durchgeführt werden.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Inkubation mit LPS eine gute Möglichkeit darstellt, in organotypischen Kulturen eine Entzündung hervorzurufen, wenn auch die Stärke der Entzündungsreaktion nicht einheitlich auszufallen scheint. Die Zugabe von LPS gibt den Zellen in der Kultur die Möglichkeit, selbst Zytokine zu produzieren und bildet so einen wichtigen Teil der Entzündungskaskade in den Kulturen ab.

4.3. Entzündung vermittelt Veränderungen im neuronalen Netzwerk

Dass Entzündung in verschiedenster Weise das ZNS beeinflusst ist mittlerweile bekannt, so wird z.B. in der Alzheimer-Forschung, in der Forschung zu Multipler Sklerose oder auch zu Parkinson eine Beteiligung von Inflammation an den Erkrankungen angenommen und intensiv erforscht (Chitnis, 2017).

Auch welche Veränderungen sich im ZNS bei Entzündung zeigen ist Gegenstand aktueller Forschung. Erforscht wurden Veränderungen an verschiedenen Gewebetypen, von Cortex, über Hippocampus, als auch am hier verwendeten Rückenmark (siehe Kapitel 1.1). Relevant für die vorliegende Arbeit ist, dass Neuroinflammation zu einer Hypersensibilität gegenüber Anästhetika führt (Monk et al. 2005, Sessler et al. 2012).

Die meisten Anästhetika wirken hauptsächlich über Modulation der GABAergen Signalweiterleitung (Antkowiak & Rammes 2019). Eine Veränderung der Wirksamkeit bei Sepsis ist also mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Veränderung im GABAergen System durch die Entzündung zurückzuführen. Wie genau jedoch die Anästhetika-Hypersensibilität zustande kommt, ist bisher nicht erforscht. Es sind Veränderungen an mehreren Stellen im GABAergen System denkbar, beispielsweise eine Modulation am GABAergen Rezeptor, an der Synapse oder am Transmitterangebot. Zu keiner der Möglichkeiten gibt es bisher ausführliche Forschungsergebnisse, die eine eindeutige Ursache der Hypersensibilität darlegen würden.

Hier soll nun zunächst darauf eingegangen werden, wie sich die Aktivität des neuronalen Netzwerks im Rückenmark ändert, wenn eine Entzündung induziert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Inkubation mit LPS lediglich Kulturen mit niedriger Grundaktivität signifikant beeinflusst, indem die Aktionspotentialfrequenz im neuronalen Netzwerk reduziert wird (Abb. 10). Diese Frequenzreduktion kann durch eine Erhöhung GABAerger Ströme zustande kommen.

Die Beobachtung, dass LPS einen eher geringen Einfluss auf die Grundaktivität von neuronalen Netzwerken hat, deckt sich in Teilen mit veröffentlichten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Von Giacco et al. wurden ähnliche Experimente mit LPS-Inkubation an organotypischen Rückenmarkkulturen durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass bei alleiniger Zugabe von LPS zu den Kulturen kein Effekt auf die GABAergen Ströme auftritt (Giacco et al. 2019). Für die unterschiedlichen Ergebnisse gibt es jedoch eine mögliche Erklärung: in der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur eine dreifach höhere LPS-Dosierung verwendet, sondern es wurden zusätzlich aus den Kulturen Subgruppen mit niedriger und hoher Grundaktivität gebildet und eine Auswertung des Effekts von LPS-Inkubation auf die einzelnen Subgruppen vorgenommen.

Andere Veröffentlichungen legen nahe, dass LPS durchaus einen messbaren Einfluss auf die GABAerge Aktivität im ZNS hat. So stellten Hellstrom et al. fest, dass nach 7 Tagen LPS-Inkubation – ähnlich wie in den vorliegenden Ergebnissen – sowohl das Membranpotential als auch die Frequenz der in den Kulturen gemessenen Aktionspotentiale sank (Hellstrom et al. 2005). Gezeigt wurde der Effekt an Hippocampus-Zellkulturen, in der vorliegenden Arbeit wurden Rückenmarkkulturen verwendet. Aufgrund unterschiedlicher Rezeptor-Ausprägungen in den verschiedenen Nervengeweben sind die Ergebnisse deshalb nicht 1:1 vergleichbar. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass an unterschiedlichen Stellen des ZNS ähnliche Auswirkungen von induzierter Entzündung auftreten können.

Bedenkt man, dass LPS zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinkonzentration im ZNS führt, so kann man auch Ergebnisse, welche mit direkter Zugabe von Zytokinen erzielt wurden, bis zu einem gewissen Grad mit den durch LPS hervorgerufenen ZNS-Veränderungen vergleichen.

Die Zugabe von IL-1 β führt in Hippocampus-Kulturen zu einer erhöhten Oberflächenexpression des GABA_A-Rezeptors (Serantes et al. 2006).

TNF- α bewirkt in spinalen organotypischen Zellkulturen eine signifikante Frequenzabnahme der IPSCs, Amplitude und Abklingzeit blieben dabei jedoch – im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen – unbeeinflusst (Zhang et al. 2010). Der Unterschied in den Ergebnissen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch LPS eine komplexere Entzündungsantwort ausgelöst wird als durch ein einzelnes Zytokin.

Extrazelluläre Messungen zeigen in der vorliegenden Arbeit, dass durch Inkubation mit LPS die neuronale Grundaktivität herabgesetzt wird. Mit diesen Ergebnissen vereinbar ist die intrazellulär gemessene, vermehrte Inhibition der neuronalen Ströme. Entzündung erhöht dabei die Aktivität der hemmenden GABAergen Interneurone, dies wird an der bei LPS-Inkubation erhöhten Frequenz der IPSCs sichtbar (Tab. 5). Außerdem wird die Kinetik am GABA-Rezeptor verändert, indem die Abklingzeit eines einzelnen Potentials signifikant verlängert wird (Abb. 21). Die signifikant verlängerte Abklingzeit lässt auf eine langsamere Abdiffusion von GABA vom GABA-Rezeptor schließen. Die Beendigung des Signals am GABA-Rezeptor wird durch die Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse eingeleitet, deshalb können die GABA-Wiederaufnahmetransporter zu der verlängerten Abklingzeit beitragen.

Die Induktion einer Entzündung in organotypischen ZNS-Kulturen führt zusammengefasst zu einer Neuroinflammation mit daraus resultierender neuronaler Aktivitätsminderung durch gesteigerte Aktivität des GABAergen Systems. Die gesteigerte GABAerge Aktivität wird durch verschiedene Mechanismen ausgelöst. Näher betrachtet werden muss die Funktionsweise der GABA-Wiederaufnahmetransporter unter Inflammation.

4.4. GABA_A-Rezeptor und GAT-1 als mögliche Angriffspunkte für Inflammation

Um den Angriffspunkt von Entzündung näher einzugrenzen, wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen mit Diazepam durchgeführt, welches an den GABA_A-Rezeptor bindet und die hemmende Wirkung von GABA verstärkt. Die extrazellulären Messungen mit Diazepam zeigen eine leichte, statistisch jedoch

nicht signifikante Potenzierung der Medikamentenwirkung in Kulturen mit induzierter Entzündung (Abb. 14, Abb. 15). Dieser Effekt ist in den intrazellulären Messungen nicht nachzuweisen, hier führt die Inkubation mit LPS eher zu einer Abschwächung der Wirkung von Diazepam (Abb. 16).

Der Unterschied zwischen extra- und intrazellulärer Ableitung kann dadurch zustande kommen, dass in einer einzelnen Zelle der Effekt der Droge geringer messbar ist als im gesamten neuronalen Netzwerk.

Die intrazellulär gemessene, schwächere Diazepam-Wirkung ist zu erkennen anhand der Parameter Abklingzeit, Halbwertsbreite und Ladung pro IPSC. Diazepam führt zu einer Vergrößerung und Verlängerung der Parameter, dieser Effekt fällt in Kulturen mit LPS-Inkubation im Vergleich zu Kontrollkulturen deutlich schwächer aus. Die potenzierte Wirkung von Diazepam im neuronalen Netzwerk ist also nicht allein durch eine Wirkung von LPS-Inkubation auf den GABA-Rezeptor zu erklären. Es muss demnach einen anderen Mechanismus geben, der dazu führt, dass Diazepam eine veränderte Wirksamkeit in entzündeten Zellkulturen zeigt. Denkbar ist eine Veränderung der GABA-Wiederaufnahme in die Präsynapse. So stünde mehr GABA im synaptischen Spalt zur Verfügung und Diazepam könnte als positiv allosterischer Modulator durch die erhöhte Transmitterkonzentration eine erhöhte Wirksamkeit erreichen. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, stand in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung des GAT-1 im Vordergrund.

GAT-1 wird im gesamten Rückenmark exprimiert, vor allem im Hinterhorn und in den Astrozyten. Der Transporter ist hauptverantwortlich für die Terminierung der GABAergen tonischen Inhibition (Yadav et al. 2015). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete NO711 ist selektiv wirksam an GAT-1 (Borden et al. 1994).

Kommt es durch Blockade oder Modulation am Transporter zu einer geringeren Transportkapazität, verweilt GABA länger im synaptischen Spalt und die hemmende Wirkung des Transmitters bleibt länger bestehen. Medikamente, welche eine Verstärkung der GABAergen Wirkung als Wirkmechanismus aufweisen, können so eine höhere Wirksamkeit erreichen. Eine Veränderung des GAT-1 durch Entzündung könnte so die in der Literatur beschriebene Anästhetika-Hypersensibilität erklären (Monk et al. 2005, Sessler et al. 2012).

Bei extrazellulären Messungen führt NO711 in Kulturen mit induzierter Entzündung zu einer geringeren Reduktion der Netzwerkaktivität als in Kontrollkulturen (Abb. 12). Diese unter Entzündungsbedingungen veränderten NO711-Wirksamkeit lässt auf eine Veränderung des GAT-1 Transporters schließen.

Intrazelluläre Messungen unter Zugabe von NO711 geben Aufschluss über die Kinetik der inhibitorischen postsynaptischen Potentiale am GABA-Rezeptor. Es kommt bei den spontanen IPSCs zu einer signifikant erhöhten Abklingzeit und Halbwertsbreite durch NO711 bei Kulturen mit vorheriger LPS-Inkubation (Abb. 21). Ohne die Inkubation mit LPS führt NO711 zu keiner signifikanten Veränderung der Parameter. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen fallen in diesem Punkt anders aus, bei Zugabe von 20 μ M NO711 zu Hippocampus-Kulturen ohne induzierte Entzündung kommt es zu einer Verlängerung der Abklingzeit der IPSCs (Keros & Hablitz 2005). Die Differenz der Ergebnisse kann sowohl durch den unterschiedlichen verwendeten Gewebetyp und die höhere NO711 Konzentration zustande kommen als auch durch die starke Streuung der vorliegenden Daten (Abb. 21).

Die Parameter Amplitude und Frequenz der IPSCs erfahren keine signifikante Veränderung durch NO711 oder LPS-Inkubation. Es ist also davon auszugehen, dass die beobachtete vermehrte GABAerge Wirkung nicht durch eine erhöhte Produktion und Ausschüttung des Transmitters an der Präsynapse zustande kommt, denn dies hätte sich durch eine Erhöhung der IPSC-Amplitude bei LPS-Inkubation gezeigt.

Die Ergebnisse sind durch eine Wirkung von LPS am GAT-1 zu erklären: wenn die Funktion des GAT-1 durch Entzündung eingeschränkt wird, kann es zu einer erhöhten Konzentration von GABA im synaptischen Spalt kommen. Die erhöhte Konzentration führt allein noch zu keiner deutlichen Veränderung der neuronalen Netzwerkaktivität, dies ist zu erkennen, wenn man die extrazellulär gemessenen Grundaktivitäten ohne und mit LPS-Inkubation vergleicht (Abb. 9). Erst die Zugabe des GAT-1 Blockers NO711 macht die Wirkung von Entzündung auf den Transporter sichtbar. Die zusätzliche Beeinflussung des Transporters durch LPS-Inkubation führt dazu, dass die Zugabe von NO711 in diesen Kulturen – im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit NO711 – ein langsames Abklingen und eine

Verbreiterung der IPSCs hervorruft (Abb. 21). GABA verweilt also länger im synaptischen Spalt und diffundiert langsamer vom GABA-Rezeptor ab. Auch die bei Inflammation abgeschwächte Wirkung von NO711 im neuronalen Netzwerk (Abb. 12) ist mit dieser Hypothese erklärbar. In den Messungen ohne LPS-Inkubation kann NO711 seine volle Wirkung entfalten. Die Inkubation mit LPS führt allein schon zu einer diskreten Blockade des GAT-1, die zusätzliche Wirkung von NO711 verursacht dadurch keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrollmessung. Durch die milde Beeinflussung des GAT-1 durch LPS wird die Wirksamkeit von NO711 direkt an der Synapse verstärkt, im neuronalen Netzwerk jedoch abgeschwächt.

Die verminderte Wirkung von NO711 kann jedoch auch durch eine verminderte Expression oder eine veränderte Transportfähigkeit von GAT-1 ausgelöst werden, auch eine Veränderung der Bindungsstelle von NO711 ist denkbar. Inflammation könnte auch zu einer verminderten Ausschüttung von GABA führen. Dies wäre bei der Zugabe von LPS zu den Kulturen jedoch durch eine höhere Grundaktivität in den Zellkulturen mit Inflammation im Vergleich zu den Kontrollkulturen und einer verminderten Amplitude der IPSCs aufgefallen. Die Zellkulturen zeigen nach Induktion einer Entzündung jedoch eine niedrigere Grundaktivität und die Amplitude bleibt unverändert (Tab. 5).

Es gibt Hinweise darauf, dass Neuroinflammation zu einer Hochregulation der Expression von GAT-1 im ZNS von Ratten führt (Su et al. 2015). Andere Veröffentlichungen weisen auf eine verminderte Expression von GAT-1 bei Ratten mit induzierter Neuroinflammation hin (Agusti et al. 2017). In den vorliegenden Ergebnissen zeigt der selektive GAT-1-Blocker NO711 bei Entzündung eine schwächere Wirksamkeit auch in hohen Konzentrationen, eine verminderte Expression des Transporters könnte dies erklären. Bei vermehrter Expression von GAT-1 wäre eine stärkere Wirksamkeit des GABA-Wiederaufnahmeblockers zu erwarten gewesen. Eine verminderte Expression hingegen würde dafür sorgen, dass die hohe NO711-Konzentration weniger stark wirken kann. Wenn weniger Transporter gehemmt werden, fällt die Wirkung der GAT-1 Blockade im Vergleich zu den Kontrollkulturen geringer aus.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass Entzündung die Funktion des GAT-1 im Rückenmark einschränkt. Diese Funktionseinschränkung ist allein jedoch nicht als signifikanter Unterschied in der Signalweiterleitung messbar. Erst bei zusätzlicher Einflussnahme auf das GABAergen Systems führt die eingeschränkte Funktion des Transporters zu veränderter Wirkstärke der zugegebenen Substanzen.

4.5. Die Veränderung motoneuronaler Aktivität durch Inflammation

Um neben den Veränderungen des neuronalen Netzwerks, auch etwaige Veränderungen der aus dem Netzwerk weitergeleiteten Signale zu untersuchen, wurde die motoneuronale Aktivität betrachtet. Die Aktivität der Motoneurone wird von der Aktivität des neuronalen Netzwerks beeinflusst. Wenn man davon ausgeht, dass sich die motoneuronale Aktivität proportional zur neuronalen Netzwerkaktivität verhält, so müsste die aufgezeichnete Muskelaktivität eine ähnliche Veränderung durch LPS-Inkubation zeigen, wie die Veränderung, die die Aktivität des neuronalen Netzwerks erfährt.

Wie erwartet wird die neuronal gesteuerte Muskelaktivität durch Blockade des GAT-1 durch NO711 signifikant reduziert (Abb. 19). Dies gilt für Experimente ohne und mit LPS-Inkubation. Um auszuschließen, dass auch die Aktivität autonom beweglicher Muskelfasern aufgezeichnet wird, wurde in jeder Kultur eine Kontrollmessung mit Pancuronium, einem nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans durchgeführt.

Betrachtet man die Wirkung von Entzündung auf die motoneuronale Aktivität, so ist der Effekt von LPS-Inkubation – wie auch in der Grundgesamtheit der extrazellulären Messungen – nicht statistisch signifikant (Abb. 18).

Während in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss von Entzündung auf Motoneurone nachweisbar ist, zeigen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen deutliche Effekte von Neuroinflammation auf die motoneuronale Signalweiterleitung. So zeigen Ratten, bei denen im Gastrointestinaltrakt eine Sepsis ausgelöst wurde, eine motoneuronale Aktivitätsminderung und Degeneration. Dazu wurde eine Zökumligatur und Punktion durchgeführt und nachfolgend Motoneurone einem repetitiven Reizimpuls ausgesetzt. Es zeigt sich

im Vergleich zur Kontrollgruppe eine herabgesetzte Erregbarkeit der Motoneurone, die auch nach Rückgang der Sepsis noch wochenlang nachweisbar war (Nardelli et al. 2013, Nardelli et al. 2016).

Auch großflächige Verbrennungen können zu einer systemischen Entzündung führen, unter diesen Bedingungen scheint es bei der Maus zur Proliferation und Aktivierung von Mikroglia mit Zytokinfreisetzung zu kommen. Dies führt zur Degeneration von motoneuronalen Synapsen im Rückenmark (Ma et al. 2019). Im Zellkulturmodell konnte zudem gezeigt werden, dass Kulturmedium, in welches von Mikroglia Zytokine freigesetzt wurden, bei Zugabe zu Motoneuronen die kultivierten Motoneurone absterben lässt (Yang et al. 2016).

In den hier verwendeten Co-Kulturen des Rückenmarks fehlen vergleichbare signifikante Effekte von LPS-Inkubation auf die Muskelaktivität. Dies kann mehrere Gründe haben: zum einen ist die Anzahl an Versuchswiederholungen vergleichsweise klein und die Streuung der Ergebnisse relativ groß, zum anderen differieren die Methoden um eine Entzündung auszulösen zwischen den Veröffentlichungen und der hier verwendeten Inkubation mit LPS. Bei differenzierter Auswertung einer größeren Anzahl an Versuchswiederholungen könnte die statistisch nicht signifikante Beobachtung, dass LPS hemmend auf die Grundaktivität der Motoneurone wirkt vielleicht Signifikanzniveau erreichen. Auch wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich spontane Muskelaktivität gemessen und nicht die Auswirkung repetitiv ausgelöster Reize (Nardelli et al. 2013, Nardelli et al. 2016). Auch die Art der Aufzeichnung der Muskelaktivität kann zu den Unterschieden in den Ergebnissen beigetragen haben. So lassen die durchgeführten Messungen lediglich eine Aussage über die Aktivität einiger Muskelfasern im aufgezeichneten Fenster zu, nicht jedoch über die durchschnittliche motoneuronale Aktivität in der gesamten Co-Kultur. Nimmt man an, dass bei Entzündung die Gesamtzahl funktionierender Motoneurone abnimmt, kann es auch bei gleichbleibender Aktivität je Motoneuron innerhalb einer Messung insgesamt zur beschriebenen Muskelschwäche bei Sepsis kommen (Nardelli et al. 2016). Dabei kann die Auswahl sichtlich beweglicher, gut darzustellender Muskelfasern zu einem Selektionsbias geführt haben, durch welches eine mögliche Reduktion der Anzahl beweglicher Muskelfasern in Kulturen nach LPS-Inkubation verdeckt wurde.

Zusammengefasst wird die Frequenz des motoneuronalen Outputs durch Blockade des GAT-1 vermindert. Dies wird durch die Induktion von Entzündung nicht signifikant beeinflusst.

4.6. Der Einfluss von Inflammation auf GABAerge tonische Inhibition

Allgemeinanästhetika vermitteln ihre Wirkung hauptsächlich über Erhöhung der tonischen Inhibition im ZNS (Chiara et al. 2016). Für die Regulierung der tonischen Inhibition sind neben der GABA-Synthese (Fatemi et al. 2005) hauptsächlich GAT-1 und GAT-3 verantwortlich (Yadav et al. 2015). GAT-3 wird vor allem auf Gliazellen exprimiert (Galvan et al. 2006), während GAT-1 sowohl präsynaptisch auf GABAergen Neuronen im Rückenmark (Daemen et al. 2008) als auch auf nicht-GABAergen Neuronen zu finden ist (Zhuo et al. 2011). Es ist davon auszugehen, dass GAT-1 sowohl durch die größere Verbreitung, als auch durch die höhere Effizienz hauptverantwortlich für die Elimination von GABA im Extrazellulärraum ist. Diese Annahme wird durch eine Studie an Rückenmarkskulturen von Ratten bestätigt: die tonische Inhibition wird durch alleinige GAT-1, nicht jedoch durch alleinige GAT-3 Blockade erhöht (Yadav et al. 2015). Eine Funktionseinschränkung am GAT-1 durch Inflammation kann also auch durch eine veränderte tonische Inhibition sichtbar werden. Publierte Ergebnisse zeigen eine verminderte Expression des GAT-1 bei Ratten mit induzierter Neuroinflammation (Agusti et al. 2017). Wenn durch Inflammation die Expression von GAT-1 herabgesetzt wird, wäre zu erwarten, dass NO711 weniger stark wirkt und eine erhöhte tonische Inhibition in den Zellkulturen messbar ist. Bereits in Kapitel 4.4 wurde eine abgeschwächte Wirksamkeit von NO711 bei induzierter Entzündung beschrieben. NO711 zeigt sowohl ohne als auch mit vorheriger LPS-Inkubation einen signifikanten Einfluss auf die tonische Inhibition (Abb. 23). Jedoch zeigt sich in den Messungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen mit Inflammation und den Kontrollkulturen. Dies kann an der niedrigen Anzahl an Experimenten und an der hohen Variabilität der Zellaktivität liegen. In der Literatur sind unterschiedliche Effekte von NO711 auf die tonische Inhibition beschrieben: in Hippocampus-Kulturen hat NO711 eine verstärkende Wirkung auf die tonische Inhibition (Nusser & Mody 2002), im Neocortex war

dagegen keine statistisch signifikante Wirkung auf die tonische Ströme messbar (Keros & Hablitz 2005). Es scheint also Unterschiede zwischen verschiedenen Gewebetypen des ZNS zu geben, was die Relevanz des GAT-1 für die tonische Inhibition angeht.

Im Neokortex führt erst die gleichzeitige Blockade von GAT-2 und GAT-3 zusätzlich zu GAT-1 zu einer signifikanten Erhöhung der tonischen Inhibition (Keros & Hablitz 2005). Ein synergistischer Effekt der Transporter ist im Neokortex also nicht auszuschließen. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Transporter im ZNS kann keine allgemeingültige Aussage über die Rolle des GAT-1 im zentralen Nervensystem unter Neuroinflammation getroffen werden. Die Datenlage bezüglich der Rolle von GAT-1 bei der tonischen Inhibition im Rückenmark ist bisher nur unzureichend. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auch tonische Ströme gemessen.

Derzeit ist davon auszugehen, dass GAT-1 nicht allein für die Regulierung der tonischen Inhibition verantwortlich ist. Das bestätigen auch die vorliegenden Ergebnisse, in denen eine entzündliche Wirkung am GAT-1 keine signifikante Veränderung der tonischen Inhibition hervorruft. Aufgrund der erwähnten niedrigen Anzahl an Experimenten und der großen Variabilität der Ergebnisse ist ein Effekt von Entzündung auf die tonische Inhibition jedoch nicht ausgeschlossen. Einige Veröffentlichungen zeigen einen Einfluss von Entzündung auf die tonische GABAerge Inhibition, untersuchen dabei jedoch nicht direkt den GAT-1. So führt systemische Entzündung beispielsweise zu einer Aktivitätssteigerung und vermehrten Expression von GABA-Rezeptoren mit einer $\alpha 5$ -Untereinheit (Wang et al. 2012), also tonischen GABA-Rezeptoren (Brickley & Mody 2012). Auch andere Arbeiten beschreiben eine erhöhte Expression extrasynaptischer GABA_A-Rezeptoren nach Entzündung (Avramescu 2016). Die erhöhte Anzahl extrasynaptischer GABA-Rezeptoren in Kombination mit der verminderten Expression von GAT-1 (Agusti et al. 2017) kann im Zusammenspiel zu einer deutlich erhöhten tonischen Inhibition bei Entzündung führen. Die erhöhte tonische Inhibition, welche durch Verminderung der GABA-Wiederaufnahme durch den GAT-1 und der erhöhten GABA-Wirkung an extrasynaptischen Rezeptoren zustande käme,

könnte eine der Ursachen für die beschriebene Anästhetika-Hypersensibilität sein (Monk et al. 2005, Sessler et al. 2012).

Die Datenlage spricht demnach dafür, dass Entzündung einen Einfluss auf den GAT-1 und die tonische Inhibition hat. Dieser Einfluss konnte jedoch durch die vorliegenden Experimente aufgrund der großen Streuung der Daten und der geringen Anzahl an Experimenten nicht nachgewiesen werden.

4.7. Ausblick

Die in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen eine Wirkung von Neuroinflammation am GAT-1 im Rückenmark: die GAT-1 vermittelte Wiederaufnahme von GABA in die Präsynapse wird vermindert. Jedoch bleibt der Mechanismus, über welchen diese Veränderung zustande kommt, unklar. Außerdem bleibt offen, inwiefern weitere Veränderungen durch Neuroinflammation für die vorgestellten Ergebnisse zusätzlich verantwortlich sein könnten. Auch werden einige Teilaspekte der anfangs aufgestellten Hypothese durch die durchgeführten Experimente nicht abschließend beantwortet.

Beispielsweise könnte auch eine verringerte Anzahl an Transportern die Ursache für eine eingeschränkte GABA-Wiederaufnahme bei Inflammation und die gezeigte veränderte NO711-Wirksamkeit sein. Mittels RT-PCR könnte untersucht werden, ob nach LPS-Inkubation eine Veränderung der GAT-1 Expression zu beobachten ist. Experimente an Cerebellum-Kulturen zeigen eine verminderte Oberflächenexpression von GAT-1 bei Entzündung, vergleichbare Untersuchungen am Rückenmark könnten die Hypothese unterstützen (Agusti et al. 2017).

Zudem ist die Rolle der Motoneurone nicht abschließend geklärt. Weiterführende Experimente könnten prüfen, ob sich im Rückenmark sowohl eine Modulation der motoneuronalen Signalweiterleitung als auch eine Degeneration von Motoneuronen unter Entzündungsbedingungen nachweisen lässt. Dazu könnten einerseits die vorgestellten Experimente in größerer Anzahl durchgeführt werden, andererseits könnte die Gesamtaktivität der kultivierten Muskelzellen z.B. über mehrere betrachtete Muskelfasern pro Kultur genauer bestimmt werden. Auch könnte die Erregbarkeit der Muskelfasern getestet werden, indem man eine Spannung an

das Motoneuron anlegt und die Reaktionsstärke des Muskels darauf testet, ähnlich wie schon von Nardelli et al. durchgeführt (Nardelli et al. 2013).

Die tonische Inhibition im GABAergen System ist für die Untersuchung der Wirkung von Anästhetika von besonderer Bedeutung. Die Experimente der vorliegenden Arbeit haben sich dabei auf den GAT-1 konzentriert. Zusätzlich sind Untersuchungen des GAT-3 im Rückenmark wünschenswert, da zur Rolle dieses Transporters im Rückenmark bisher wenig bekannt ist und aus den Daten anderer Gewebetypen nicht auf das Rückenmark geschlossen werden kann. Eine synergistische Wirkung von GAT-1 und GAT-3 ist ebenso denkbar wie eine alleinige GABA-Elimination durch GAT-1 im Rückenmark. Dazu könnten, zusätzlich zu den mit NO711 durchgeführten Experimenten, Experimente mit einem für GAT-3 spezifischen Blocker durchgeführt werden. Zusätzlich gibt es Daten, die eine Hochregulation der Expression des GAT-3 im Cerebellum bei Entzündung zeigen (Agusti et al. 2017, Hernandez-Rabaza et al. 2016). Auch die Oberflächenexpression von GAT-3 wäre für das Rückenmark, zum Beispiel mithilfe von Western Blot Experimenten, unter Kontroll- und Entzündungsbedingungen zu prüfen.

Für die Inhibition im neuronalen Netzwerk ist nicht nur GABA als Transmitter zuständig. Deshalb wäre es sinnvoll, auch andere inhibitorische Transmittersysteme, wie beispielsweise das glycinerge System, zu untersuchen. Es gibt Hinweise darauf, dass Mikroglia, die für die physiologische Entzündungsreaktion maßgeblich verantwortlich sind, im Rückenmark über Prostaglandin E2 vor allem das glycinerge und nicht das GABAerge System beeinflussen (Cantaut-Belarif et al. 2017). Allerdings ist bekannt, dass Anästhetika vor allem über das GABAerge System wirken, sucht man also nach dem Grund für die Anästhetikahypersensibilität bei Entzündung, so ist das GABAerge System vermutlich relevanter als das glycinerge System (Eckle et al. 2009).

Die wesentliche Schlussfolgerung aus der vorliegenden Arbeit, dass Entzündung die Funktion des GAT-1 Transporters im Rückenmark vermindert, wirft demnach neue Fragen auf, die zu weiteren wissenschaftlichen Erkenntnissen über die Wirkung von Entzündung auf das zentrale Nervensystem führen können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese untersucht, dass Neuroinflammation einen Einfluss auf den GAT-1 GABA-Wiederaufnahmetransporter hat. Die Grundlage für diese Annahme ist, dass bei Patienten mit Sepsis eine Hypersensibilität gegenüber Anästhetika nachgewiesen wurde und in einigen Veröffentlichungen verschiedene Veränderungen am GABAergen System durch Inflammation gezeigt werden konnten. Nicht hinreichend untersucht wurde dabei die Rolle der GABA-Wiederaufnahmetransporter, insbesondere des GAT-1, dem im Rückenmark hauptverantwortlichen Transporter. Das Rückenmark wurde als Gewebeart ausgewählt, da es bisher nur wenige Studien zu neuroinflammatorischen Veränderungen darin gibt. Außerdem ist das Rückenmark maßgeblich für die Schmerzweiterleitung verantwortlich und Veränderungen in diesem System können eine für PatientInnen relevante Rolle im Hinblick auf chronische Schmerzen und Hyperalgesie spielen.

Für die experimentelle Prüfung der aufgestellten Hypothese wurden verschiedene Messungen an organotypischen Co-Kulturen des murinen Rückenmarks vorgenommen. Zum einen wurde die Aktivität des neuronalen Netzwerks mithilfe extrazellulärer Messungen unter verschiedenen Bedingungen untersucht, zum anderen die Aktivität an der GABAergen Synapse mittels intrazellulärer Messungen unter Blockade aller Ströme bis auf die GABAergen. Außerdem wurde die motoneuronale Aktivität mithilfe von Videomikroskopie gemessen, um mögliche Auswirkungen von Entzündung auf die Signalweiterleitung aus dem spinalen neuronalen Netzwerk zu beobachten. Verwendet wurden verschiedene Substanzen: der selektive GAT-1-Blocker NO711, der positiv allosterische Modulator Diazepam sowie Substanzen, um u.a. AMPA und NMDA-Rezeptoren zu blockieren, sodass explizit das GABAerge System betrachtet werden konnte. Die Entzündung wurde in den organotypischen Kulturen durch Inkubation mit LPS herbeigeführt.

Die Ergebnisse der Messungen zeigen eine Funktionseinschränkung am GAT-1 durch Entzündung. Dies stellt sich zum einen durch Abschwächung der NO711-Wirkung nach induzierter Entzündung dar, zum anderen durch eine Veränderung

der Diazepamwirksamkeit. Diese Veränderung ist aufgrund der intrazellulär gemessenen Daten mit Diazepam nicht allein durch eine LPS-Wirkung am GABA-Rezeptor erklärbar. Durch die intrazellulären Messungen mit NO711 wird einer Wirkung von Inflammation am GAT-1 nachgegangen. Sichtbar sind dort eine bei Entzündung signifikant verlängerte Abklingzeit und Halbwertsbreite der Signale. Dies spricht für ein längeres Verweilen von GABA im synaptischen Spalt und damit für eine Funktionseinschränkung des GAT-1 durch Entzündung. Durch die erhöhte Konzentration ist eine Abdiffusion des Transmitters an extrasynaptische Rezeptoren denkbar. Deshalb wurden in den intrazellulären Messungen tonische Ströme betrachtet und die Wirkung von LPS darauf. Hier kann jedoch aufgrund der geringen Datenmenge kein Effekt nachgewiesen werden, lediglich eine Beteiligung von tonischer Inhibition an der Wirkung von NO711. Auch bei der Betrachtung der motoneuronalen Aktivität zeigt sich keine signifikante Veränderung der NO711-induzierten Aktivitätssenkung durch Entzündung.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine inflammationsvermittelte Funktionseinschränkung am GAT-1, was zu veränderter Wirksamkeit von Substanzen auf die spinale Reizweiterleitung führen könnte. Diese Funktionseinschränkung kann, im Zusammenspiel mit anderen durch Entzündung ausgelösten Veränderungen im GABAergen System, zu einer Hochregulation der GABAergen Aktivität im ZNS führen. Da ein Großteil der Anästhetika über das GABAerge System im ZNS wirkt, kann die bei Entzündung verstärkte GABAerge Aktivität Ursache für die Anästhetika-Hypersensibilität bei Entzündung sein.

So führt die vorliegende Arbeit zu einem besseren Verständnis der Vorgänge, die bei Inflammation im Rückenmark ablaufen und zeigt eine bisher nicht beschriebene, entzündungsvermittelte Funktionseinschränkung des GAT-1.

I. Veröffentlichung von Teilergebnissen

Teile der Arbeit wurden auf dem 21. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Berlin (HAI 2019) im Rahmen des Vortragswettbewerbs für experimentelle Arbeiten sowie im Rahmen des Arbeitskreistreffens Neurowoodstock von mir, Wiebke Paul, präsentiert. Auch die Erstellung der Vorträge erfolgte durch mich persönlich.

Im Rahmen des Vortragswettbewerbs wurde der Vortrag mit dem 2. Preis für freie Vorträge experimenteller Studien ausgezeichnet.

Das eingereichte Abstract ist in der Abstract-Datenbank des HAI unter dem Titel „Inflammatorische Prozesse vermindern die Wiederaufnahme von GABA im Rückenmark“ zu finden. Zusätzlich ist es auf der nachfolgenden Seite eingefügt.

Teile der Arbeit wurden als Publikation beim British Journal of Anaesthesia eingereicht. Das Manuskript der Publikation ist der Promotionsarbeit beigelegt.

Inflammatorische Prozesse vermindern die Wiederaufnahme von GABA im Rückenmark

W. Paul · A. Streißenberger · T. Granja · B. Antkowiak

Universitätsklinikum Tübingen

Zielsetzung

Durch operative Eingriffe bedingte periphere Entzündungen verstärken die durch die gamma-Aminobuttersäure (GABA) bewirkte Aktivierung von GABA(A) Rezeptoren im Gehirn [1]. Nicht bekannt jedoch ist, ob neuroinflammatorische Prozesse eine vergleichbare Wirkung im Rückenmark entfalten.

Methodik

Organotypische Ko-Kulturen wurden aus dem Rückenmark und dem Muskelgewebe von embryonalen Mäusen hergestellt und mit Lipopolysaccharid (LPS, 3µmol/l, 5–18 h) behandelt. Die Expression proinflammatorischer Zytokine wurde durch RT-PCR und deren Konzentrationen im Medium der Zellkulturen mittels Cytometric Bead Array (CBA) untersucht. Mit Hilfe von extrazellulären Mikroelektroden wurde die Aktionspotentialaktivität der spinalen Interneurone erfasst. Für die Analyse der GABAergen synaptischen Transmission wurden Patch Clamp – Einzelzelleableitungen durchgeführt. Die Aktivität der spinalen Motoneurone wurde über eine videomikroskopische Analyse der neurogen induzierten Muskelkontraktionen bestimmt.

Ergebnisse

Die LPS-Exposition der Zellkulturen bewirkte eine statistisch signifikante (t-Test, $p < 0.05$) Steigerung der Expression von IL-6 und TNF-alpha ($n=50$ Kulturen) sowie einen signifikanten Anstieg (t-test, $p < 0.001$) der Konzentrationen dieser Zytokine ($n=10$) im Kulturmedium. Gleichzeitig wurde durch die LPS-Behandlung die spontane Aktionspotential-Aktivität jener Interneurone signifikant reduziert (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, $p < 0.002$, $n=71$) deren Grundaktivität niedriger als der Median der Gesamtpopulation war. Eine Blockade von GABA-Reuptake Transportern durch den spezifischen Hemmer NO711 (500 nM) führte zu einer Verminderung der Aktionspotentialaktivität der spinalen Inter- und Motoneurone

um ca. 50% (n=114). Diese hemmende Wirkung von NO711 war jedoch in LPS-behandelten Kulturen schwächer ausgeprägt (ca. 25%, n=120). Zudem wurde die Abklingzeit GABA(A) Rezeptor-abhängiger synaptischer Ströme in LPS- (n=17), nicht aber in sham-behandelten Kulturen (n=27) konzentrationsabhängig verlängert (t-test, $p < 0.05$).

Schlussfolgerung

Akute inflammatorische Prozesse vermindern die Aktivität von spinalen GABA-Wiederaufnahmetransportern und verstärken somit die Aktivierung von GABA-Rezeptoren. Dies trägt zu einer Verminderung des Muskeltonus bei und potenziert möglicherweise die Wirksamkeit gebräuchlicher Anästhetika, die ihre Wirkungen hauptsächlich über GABA(A)-Rezeptoren entfalten.

Literatur

1. Avramescu S, Wang DS, Lecker I, To WT, Penna A, Whissell PD, et al: Inflammation Increases Neuronal Sensitivity to General Anesthetics. *Anesthesiology* 2016;124:417–427

© Anästh Intensivmed 2019;60:S493–S498 Aktiv Druck & Verlag GmbH

II. Literaturverzeichnis

- Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Balzano T, Taoro-Gonzalez L, Ibanez-Grau A, et al. 2017. Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS Neurosci Ther* 23: 386-94
- Antkowiak B. 2015. Chapter Nine - Closing the Gap between the Molecular and Systemic Actions of Anesthetic Agents. *Advances in Pharmacology* 72: 229-62
- Antkowiak B, Rammes G. 2019. GABA(A) receptor-targeted drug development - New perspectives in perioperative anesthesia. *Expert Opin Drug Discov* 14: 683-99
- Attwell D, Barbour B, Szatkowski M. 1993. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401-7
- Avramescu SW, Dian-Shi; Lecker, Irene; William, T.H.; Penna, Antonello; Whissell, Paul; Mesbah-Oskui, Lia; Horner, Richard L., Orser, Beverley A. 2016. Inflammation Increases Neuronal Sensitivity to General Anesthetics. *Anesthesiology* 5
- Banks MI, Pearce RA. 2000. Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 20: 937-48
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW. 2009. Extrasynaptic GABA(A) receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29: 12757-63
- Borden LA. 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* 29: 335-56
- Borden LA, Murali Dhar TG, Smith KE, Weinshank RL, Branchek TA, Gluchowski C. 1994. Tiagabine, SK&F 89976-A, CI-966, and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *Eur J Pharmacol* 269: 219-24
- Borden LA, Smith KE, Vaysse PJ, Gustafson EL, Weinshank RL, Branchek TA. 1995. Re-evaluation of GABA transport in neuronal and glial cell cultures: correlation of pharmacology and mRNA localization. *Recept Channels* 3: 129-46
- Brickley SG, Mody I. 2012. Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73: 23-34
- Cantaut-Belarif Y, Antri M, Pizzarelli R, Colasse S, Vaccari I, et al. 2017. Microglia control the glycinergic but not the GABAergic synapses via prostaglandin E2 in the spinal cord. *J Cell Biol* 216: 2979-89
- Carver CM, Reddy DS. 2013. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl)* 230: 151-88

- Chiara DC, Jounaidi Y, Zhou X, Savechenkov PY, Bruzik KS, et al. 2016. General Anesthetic Binding Sites in Human $\alpha 4\beta 3\delta$ gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors (GABAARs). *J Biol Chem* 291: 26529-39
- Chitnis T, Weiner HL. 2017. CNS inflammation and neurodegeneration. *J Clin Invest* 127: 3577-87
- Conti F, Minelli A, Melone M. 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 45: 196-212
- Daemen MA, Hoogland G, Cijntje JM, Spincemaille GH. 2008. Upregulation of the GABA-transporter GAT-1 in the spinal cord contributes to pain behaviour in experimental neuropathy. *Neurosci Lett* 444: 112-5
- Dellas C. 2014. Benzodiazepine und Hypnotika In *Kurzlehrbuch Pharmakologie*, pp. 255-58. München: Elsevier Urban&Fischer
- Drexler B, Hentschke H, Antkowiak B, Grasshoff C. 2010. Organotypic cultures as tools for testing neuroactive drugs - link between in-vitro and in-vivo experiments. *Curr Med Chem* 17: 4538-50
- Drexler BG, C.; Rudolph, U.; Unertl, K.; Antkowiak, B. 2006. Die GABA(A)-Rezeptorfamilie Möglichkeiten für die Entwicklung besserer Anästhetika. *Der Anaesthetist* 3: 55: 287-95
- Drexler BZ, Stefan; Hentschke, Harald; Antkowiak, Bernd. 2010. Diazepam Decreases Action Potential Firing of Neocortical Neurons via Two Distinct Mechanisms. *Anesthesia & Analgesia* 111(6): 1394-99
- Eckle VS, Hucklenbruch C, Todorovic SM. 2009. [What do we know about anesthetic mechanisms?: hypnosis, unresponsiveness to surgical incision and amnesia]. *Anaesthetist* 58: 1144-9
- Estler C-JS, Harald. 2007. *Pharmakologie und Toxikologie Für Studium und Praxis*. pp. 201-206. Schattauer.
- Fatemi SH, Stary JM, Earle JA, Araghi-Niknam M, Eagan E. 2005. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum. *Schizophr Res* 72: 109-22
- Fattorini G, Melone M, Sanchez-Gomez MV, Arellano RO, Bassi S, et al. 2017. GAT-1 mediated GABA uptake in rat oligodendrocytes. *Glia* 65: 514-22
- Frahm C, Engel D, Draguhn A. 2001. Efficacy of background GABA uptake in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 12: 1593-6
- Freudenberg MA. 2005. Die Rolle von Lipopolysaccharid im Wechselspiel zwischen Bakterien und Immunsystem.
- Froestl W. 2011. An historical perspective on GABAergic drugs. *Future Med Chem* 3: 163-75

- Gähwiler B. 1981. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neuroscience Methods* 4: 329-42
- Galvan A, Kuwajima M, Smith Y. 2006. Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience* 143: 351-75
- Gao F, Liu Z, Ren W, Jiang W. 2014. Acute lipopolysaccharide exposure facilitates epileptiform activity via enhanced excitatory synaptic transmission and neuronal excitability in vitro. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10: 1489-95
- Giacco V, Panattoni G, Medelin M, Bonechi E, Aldinucci A, et al. 2019. Cytokine inflammatory threat, but not LPS one, shortens GABAergic synaptic currents in the mouse spinal cord organotypic cultures. *J Neuroinflammation* 16: 127
- Gonzalez-Burgos G, Rotaru DC, Zaitsev AV, Povysheva NV, Lewis DA. 2009. GABA transporter GAT1 prevents spillover at proximal and distal GABA synapses onto primate prefrontal cortex neurons. *J Neurophysiol* 101: 533-47
- Hellstrom IC, Danik M, Luheshi GN, Williams S. 2005. Chronic LPS exposure produces changes in intrinsic membrane properties and a sustained IL-beta-dependent increase in GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 15: 656-64
- Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B. 2005. Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* 21: 93-102
- Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, Gonzalez-Usano A, Agusti A, et al. 2016. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *J Neuroinflammation* 13: 83
- Hogue MJ. 1947. Human fetal brain cells in tissue cultures; their identification and motility. *J Exp Zool* 106: 85-107
- Holopainen IE, Lauren HB. 2003. Neuronal activity regulates GABA receptor subunit expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 118: 967-74
- Jin XT, Galvan A, Wichmann T, Smith Y. 2011. Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Front Syst Neurosci* 5: 63
- Karow TL-R, Ruth. 2015. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. pp. 988-989. Thomas Karow.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. 2008. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-

- 6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 28: 5189-94
- Keros S, Hablitz JJ. 2005. Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABA conductances in rat neocortex. *J Neurophysiol* 94: 2073-85
- Kim J, Kosaka Y, Shimizu-Okabe C, Niizaki A, Takayama C. 2014. Characteristic development of the GABA-removal system in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 262: 129-42
- Lopez-Corcuera B, Liu QR, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. 1992. Expression of a mouse brain cDNA encoding novel gamma-aminobutyric acid transporter. *J Biol Chem* 267: 17491-3
- Ma L, Zhou Y, Khan MAS, Yasuhara S, Martyn JAJ. 2019. Burn-Induced Microglia Activation is Associated With Motor Neuron Degeneration and Muscle Wasting in Mice. *Shock* 51: 569-79
- Madsen KK, White HS, Schousboe A. 2010. Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther* 125: 394-401
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, et al. 2000. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* 3: 587-92
- Mody I, Pearce RA. 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27: 569-75
- Mohler H, Fritschy JM, Rudolph U. 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 2-8
- Monk TG, Saini V, Weldon BC, Sigl JC. 2005. Anesthetic management and one-year mortality after noncardiac surgery. *Anesth Analg* 100: 4-10
- Mozrzymas JW. 2004. Dynamism of GABA(A) receptor activation shapes the "personality" of inhibitory synapses. *Neuropharmacology* 47: 945-60
- Mutschler EG, Gerd; Kroemer, Heyo K.; Menzel, Sabine; Ruth, Peter. 2013. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. pp. 173. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Nardelli P, Khan J, Powers R, Cope TC, Rich MM. 2013. Reduced motoneuron excitability in a rat model of sepsis. *J Neurophysiol* 109: 1775-81
- Nardelli P, Vincent JA, Powers R, Cope TC, Rich MM. 2016. Reduced motor neuron excitability is an important contributor to weakness in a rat model of sepsis. *Exp Neurol* 282: 1-8
- Numberger MD, Andreas. 1996. *Patch-Clamp-Technik*. pp. 67-88. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Nusser Z, Mody I. 2002. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 87: 2624-8

- Olsen RW, Hanchar HJ, Meera P, Wallner M. 2007. GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol* 41: 201-9
- Olsen RWS, Werner. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Funktion. Update. *Pharmacological Reviews* 60: 243-60
- Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ. 2008. Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17151-6
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM. 2003. GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* 6: 484-90
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA. 2004. Tonicly active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27: 262-9
- Serantes R, Arnalich F, Figueroa M, Salinas M, Andres-Mateos E, et al. 2006. Interleukin-1beta enhances GABAA receptor cell-surface expression by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: relevance to sepsis-associated encephalopathy. *J Biol Chem* 281: 14632-43
- Sessler DI, Sigl JC, Kelley SD, Chamoun NG, Manberg PJ, et al. 2012. Hospital stay and mortality are increased in patients having a "triple low" of low blood pressure, low bispectral index, and low minimum alveolar concentration of volatile anesthesia. *Anesthesiology* 116: 1195-203
- Sigel E, Schaerer MT, Buhr A, Baur R. 1998. The benzodiazepine binding pocket of recombinant alpha1beta2gamma2 gamma-aminobutyric acidA receptors: relative orientation of ligands and amino acid side chains. *Mol Pharmacol* 54: 1097-105
- Skovstrup S, Taboureau O, Brauner-Osborne H, Jorgensen FS. 2010. Homology modelling of the GABA transporter and analysis of tiagabine binding. *ChemMedChem* 5: 986-1000
- Smith CG, Bowery NG, Whitehead KJ. 2007. GABA transporter type 1 (GAT-1) uptake inhibition reduces stimulated aspartate and glutamate release in the dorsal spinal cord in vivo via different GABAergic mechanisms. *Neuropharmacology* 53: 975-81
- Spenger C, Braschler UF, Streit J, Luscher HR. 1991. An Organotypic Spinal Cord - Dorsal Root Ganglion - Skeletal Muscle Coculture of Embryonic Rat. I. The Morphological Correlates of the Spinal Reflex Arc. *Eur J Neurosci* 3: 1037-53
- Streißenberger A. 2018. Neuronale GABA(A)-Rezeptoren als Zielstrukturen inflammatorischer Prozesse. Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Su J, Yin J, Qin W, Sha S, Xu J, Jiang C. 2015. Role for pro-inflammatory cytokines in regulating expression of GABA transporter type 1 and 3 in

specific brain regions of kainic acid-induced status epilepticus. *Neurochem Res* 40: 621-7

- Suzdak PD, Frederiksen K, Andersen KE, Sorensen PO, Knutsen LJ, Nielsen EB. 1992. NNC-711, a novel potent and selective gamma-aminobutyric acid uptake inhibitor: pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol* 224: 189-98
- Thomson CA, McColl A, Cavanagh J, Graham GJ. 2014. Peripheral inflammation is associated with remote global gene expression changes in the brain. *J Neuroinflammation* 11: 73
- Wang DS, Zurek AA, Lecker I, Yu J, Abramian AM, et al. 2012. Memory deficits induced by inflammation are regulated by alpha5-subunit-containing GABAA receptors. *Cell Rep* 2: 488-96
- Whiting PJ. 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* 8: 445-50
- Wisden W, Herb A, Wieland H, Keinänen K, Luddens H, Seeburg PH. 1991. Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABAA receptor alpha 4 subunit. *FEBS Lett* 289: 227-30
- Yadav R, Yan X, Maixner DW, Gao M, Weng HR. 2015. Blocking the GABA transporter GAT-1 ameliorates spinal GABAergic disinhibition and neuropathic pain induced by paclitaxel. *J Neurochem* 133: 857-69
- Yang S, Liu J, Zhang X, Tian J, Zuo Z, et al. 2016. Anesthetic isoflurane attenuates activated microglial cytokine-induced VSC4.1 motoneuronal apoptosis. *Am J Transl Res* 8: 1437-46
- Zhang H, Nei H, Dougherty PM. 2010. A p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of disinhibition in spinal synaptic transmission induced by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 30: 12844-55
- Zhang XL, Lee KY, Priest BT, Belfer I, Gold MS. 2015. Inflammatory mediator-induced modulation of GABAA currents in human sensory neurons. *Neuroscience* 310: 401-9
- Zhou X, Desai R, Zhang Y, Stec WJ, Miller KW, Jounaidi Y. 2018. High-level production and purification in a functional state of an extrasynaptic gamma-aminobutyric acid type A receptor containing alpha4beta3delta subunits. *PLoS One* 13: e0191583
- Zhou Y, Danbolt NC. 2013. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 165
- Zhuo M, Wu G, Wu LJ. 2011. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain* 4: 31

III. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik Tübingen im Institut für experimentelle Anästhesiologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Bernd Antkowiak durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Bernd Antkowiak, Sektionsleiter Experimentelle Anästhesiologie.

Die extrazellulären Messungen mit NO711 wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitarbeiterinnen Claudia Holt und Ina Pappe) zu 72% von mir selbst und zu 28% von Ina Pappe und Claudia Holt durchgeführt.

Die extrazellulären Messungen mit Diazepam wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitarbeiterinnen Claudia Holt und Ina Pappe) zu 51% von mir selbst und zu 49% durch Ina Pappe und Claudia Holt durchgeführt.

Die videomikroskopischen Messungen wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitarbeiterinnen Claudia Holt und Ina Pappe) von mir selbst durchgeführt.

Die intrazellulären Messungen wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitarbeiterinnen Claudia Holt und Ina Pappe) von mir selbst durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte (eigenständig nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Bernd Antkowiak und Dr. rer. nat. Harald Hentschke) durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Bezüglich Rechtschreibung und Grammatik haben Claudia Holt und Ina Pappe das Manuskript Korrektur gelesen.

Tübingen, den 21.09.2022

Wiebke Paul

IV. Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Bernd Antkowiak. Er hat mich sowohl bei der Themenauswahl als auch beim Gelingen der Arbeit mit Anregungen und Kritik unterstützt.

Auch meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Harald Hentschke möchte ich für die fachliche Unterstützung insbesondere in Bezug auf die verwendeten Methoden danken.

Großer Dank gilt den Mitarbeiterinnen der Sektion Experimentelle Anästhesiologie, Dipl.-Biol. Claudia Holt und Dipl.-Biol. Ina Pappe. Nicht nur für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gute Einarbeitung in die Methoden, sondern auch für die tatkräftige Unterstützung bei der Datenerhebung und dem Korrekturlesen meine Dissertationsschrift.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern für die aufmerksame und umfassende Unterstützung während meiner Promotion, wie auch während meines gesamten Studiums danken.