

**Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Peter Rosenberger
Sektion für Experimentelle Anästhesiologie
Leiter: Professor Dr. Bernd Antkowiak**

**Das Neurosteroid Allopregnanolone hemmt die
Aktivität spinaler Neurone durch eine Steigerung der
tonischen GABA_A-Rezeptor vermittelten Inhibition**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

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

vorgelegt von

Grenz, Julia Theresa

2022

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Bernd Antkowiak
2. Berichterstatter: Professor Dr. Holger Lerche

Tag der Disputation: 02.05.2022

*Für meine Mutter Frieda Grenz
und meine Großeltern
Frieda und Xaver Zucker*

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungsverzeichnis	7
III Abbildungsverzeichnis	10
IV Tabellenverzeichnis	12
1 Einleitung	13
1.1 Neurosteroide.....	13
1.1.1 Das Neurosteroid Allopregnanolone.....	15
1.1.2 Allopregnanolone als positiv allosterischer Modulator des GABA _A - Rezeptors	17
1.1.3 Modulation von synaptischen GABA _A -Rezeptoren durch Allopregnanolone	19
1.1.4 Modulation von extrasynaptischen GABA _A -Rezeptoren durch Allopregnanolone	22
1.1.5 Heterogenität der neuronalen Inhibition durch Allopregnanolone...	24
1.2 Wirkung von Allopregnanolone im Rückenmark	25
1.3 Propofol als gebräuchlichstes Allgemeinanästhetikum	26
1.3.1 Wirkung von Propofol im Rückenmark	27
1.3.2 Wirkung von Propofol am GABA _A -Rezeptor	28
1.4 Interaktion zwischen zwei allosterischen Modulatoren	28
1.5 Fragestellung	29
2 Material und Methoden	32
2.1 Präparationsysteme	32
2.1.1 Organotypische Gewebeschnitte des Rückenmarks.....	32
2.1.2 Organotypische Rückenmarks-Zellkulturen mit Muskel-Co- Kulturen... ..	37

2.2	Herstellung der Testlösungen	37
2.3	Extrazellulärmessungen	39
2.3.1	Durchführung	40
2.3.2	Versuchsprotokolle	41
2.3.3	Auswertung	43
2.4	Intrazellulärmessungen	44
2.4.1	Durchführung	44
2.4.2	Versuchsprotokoll	45
2.4.3	Auswertung	46
2.5	Videomikroskopie	48
2.5.1	Durchführung und Versuchsprotokoll	48
2.5.2	Auswertung	49
2.6	Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Wirkung von Allopregnanolone auf die tonische GABAerge Inhibition	53
3.2	Wirkung von Allopregnanolone auf die phasische GABAerge Inhibition	56
3.3	Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Aktionspotentialaktivität	61
3.4	Wirkung von Allopregnanolone unter Koapplikation von Propofol auf die spontane Aktionspotentialaktivität	65
3.5	Wirkung von Allopregnanolone unter Koapplikation von Propofol auf den motorischen Output	70
4	Diskussion	75
4.1	Organotypische Kulturen	75
4.2	Konzentration von Allopregnanolone und verwendete Dosierungen	76
4.3	selektive Modulation der GABA _A -Rezeptor-abhängigen tonischen Inhibition	77

4.4	untergeordnete Rolle der phasischen GABAergen Inhibition.....	80
4.5	Auswirkung von Allopregnanolone auf die spontane Netzwerkaktivität	81
4.6	Wirkung von Allopregnanolone und Propofol auf Muskel- Kontraktionen.....	83
4.7	Wirkung von Allopregnanolone mit Propofol auf die Netzwerkaktivität spinaler Interneurone.....	85
4.8	Limitationen der Studie	86
4.9	weitere Studien und klinischer Ausblick.....	87
5	Zusammenfassung.....	89
6	Literaturverzeichnis	91
7	Erklärung zum Eigenanteil	105
8	Veröffentlichungen.....	107
9	Danksagung.....	108

II Abkürzungsverzeichnis

A

5 α -DHP	5 α -Dihydroprogesteron
Abb.	Abbildung
ACSF	artificial cerebrospinal fluid; künstlicher Liquor
Allo	Allopregnanolone
AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure

B

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
----------------	-----------------------------------------

C

CA	Cornu Amonis
ca.	circa
CI	Konfidenzintervall
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

D

DMSO	Dimethylsulfoxid
------	------------------

E

EPSC	erregender postsynaptischer Strom
------	-----------------------------------

G

GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -Rezeptor	γ -Aminobuttersäure-Rezeptors Typ A

GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
I	
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom
IQR	interquartile range, Interquartilenabstand
N	
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NGF	neuronaler Wachstumsfaktor
P	
P 450 _{scc}	Cytochrom P450 side chain cleavage
PR	Progesteronrezeptor
R	
ROI	region of interest
rt-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S	
SDR	Kurzketten-Dehydrogenasen
Sham	Scheinapplikation
sog.	sogenannt
STD	Standardabweichung
T	
TM	Transmembrandomäne

Z

ZNS

zentrales Nervensystem

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die Bildung von Neurosteroiden aus Cholesterol.	14
Abbildung 2 Das Neurosteroid Allopregnanolone.	16
Abbildung 3 Zusammensetzung eines GABA _A -Rezeptors.....	17
Abbildung 4 Darstellung eines GABA _A -Rezeptors mit der Anordnung der einzelnen Untereinheiten.	19
Abbildung 5 Die GABAerge Synapse.	21
Abbildung 6 Darstellung der Entstehung eines Schmerzreizes.....	26
Abbildung 7 Herstellung von organotypischen Kulturen des Rückenmarks. ...	36
Abbildung 8 Lokalisation der Spitze einer schematisch dargestellten Messelektrode innerhalb einer organotypischen Gewebekultur des Rückenmarks.....	41
Abbildung 9 Darstellung des Versuchsablaufs der Extrazellulärmessungen...	42
Abbildung 10 Beispiel einer Originalspur der Extrazellulärmessung.. ..	43
Abbildung 11 Darstellung des Versuchsablaufs für Intrazellulärmessungen. ...	46
Abbildung 12 Darstellung des Versuchsablaufs der Videomikroskopie.....	49
Abbildung 13 Darstellung einer Muskelfaser in spinalen Nerv-Muskel-Co- Kulturen.	51
Abbildung 14 Wirkung von Allopregnanolone (100 nM) auf extrasynaptische GABA _A -Rezeptoren im ventralen Horn des Rückenmarks.	54
Abbildung 15 Darstellung der induzierten tonischen Ströme durch unterschiedliche Konzentrationen (50, 100, 250 nM) von Allopregnanolone sowie die Änderung der Membranleitfähigkeit.....	56
Abbildung 16 Originalspur einer Whole-cell Voltage-clamp Ableitung nach Applikation von Allopregnanolone (100 nM).....	57

Abbildung 17 Wirkung von Allopregnanolone (100 nM) auf die durch GABA _A -Rezeptoren vermittelte synaptische Inhibition..	58
Abbildung 18 Wirkung von Allopregnanolone (250 nM) auf die durch GABA _A -Rezeptoren vermittelte synaptische Inhibition..	60
Abbildung 19 Darstellung eines Ausschnitts einer Originalaufzeichnung zur Untersuchung der Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Netzwerkaktivität.....	62
Abbildung 20 Normalisierte Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone..	63
Abbildung 21 Wirkung von Allopregnanolone auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone in Prozent mit zugehöriger Hill-Ausgleichskurve.	64
Abbildung 22 Abbildung einer Originalspur: Wirkung Allopregnanolone (100 nM) bzw. DMSO unter Koapplikation von Propofol (1 und 5 µM).....	66
Abbildung 23 Wirkung von Propofol (1 und 5 µM) auf die spontane Aktionspotentialfrequenz mit und ohne Allopregnanolone (100 nM).	67
Abbildung 24 Darstellung der Änderung der Aktionspotentialfrequenz durch Propofol in An- und Abwesenheit von Allopregnanolone.....	68
Abbildung 25 Darstellung der prozentualen Hemmung der Aktionspotentialaktivität durch Propofol mit und ohne Allopregnanolone.	69
Abbildung 26 Registrierung von Muskelkontraktionen und der Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone in Rückenmarkskulturen mit Muskelzell-Co-Kulturen.....	71
Abbildung 27 Wirkung von Allopregnanolone (100 nM) auf die Muskelkontraktionen in An- und Abwesenheit von Propofol (1 µM).	73
Abbildung 28 Wirkung von Propofol (1 und 5 µM) auf die Muskelaktivität unter Koapplikation von Allopregnanolone (100 nM).....	74

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung der GBSS.....	33
Tabelle 2 Zusammensetzung des Nährmediums.....	35
Tabelle 3 Zusammensetzung ACSF	38

1 Einleitung

1.1 Neurosteroid

Der Begriff Neurosteroid wurde durch den Physiologen Baulieu Éntienne-Émil definiert als Steroide, die im Nervensystem synthetisiert werden und autokrin, parakrin oder intrakrin wirken können (Baulieu 1981, Baulieu, Robel et al. 2001). Oft wird der Begriff neuroaktive Steroide verwendet, der nach Paul and Purdy (1992) Steroide beschreibt, die die Erregbarkeit von Neuronen verändern, indem sie an membrangebundene Rezeptoren binden und die Erregbarkeit hemmen oder steigern.

Der Ausgangspunkt für die Bildung von Neurosteroiden ist Cholesterol. Im Mitochondrium, in der inneren mitochondrialen Membran, wird Cholesterol durch das Enzym „Cytochrom P 450 side chain cleavage“ (P 450scc) zu Pregnanolone umgewandelt (Hall 1985). Allerdings stellt die Aktivität der P 450scc nicht den limitierenden Faktor dar, sondern der Transport von Cholesterol zur inneren mitochondrialen Membran (Simpson and Waterman 1983, Jefcoate 2002). Durch die hydrophoben Eigenschaften kann Cholesterol mittels Diffusion nur sehr langsam von der äußeren mitochondrialen Membran dorthin gelangen. Mit Hilfe eines Proteinkomplexes, der „Transduceosom“ genannt wird, gelingt dieser Schritt deutlich schneller (Rone, Fan et al. 2009, Midzak, Rone et al. 2011). Im Anschluss erfolgt die Umwandlung zu Progesteron durch die 3- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) (The, Lachance et al. 1989, Cherradi, Chambaz et al. 1995). Progesteron wiederum kann durch zwei Isoformen der 5 α -Reductase in 5 α -Dihydroprogesteron (5 α -DHP) reduziert werden. Sowohl Progesteron als auch 5 α -DHP sind Liganden des intrazellulären Progesteron-Rezeptors (PR) und Regulatoren der Gen-Transkription. 5 α -DHP wird durch die Aldo-Keto-Reduktase Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) - abhängig in Allopregnanolone umgewandelt. Dieser Schritt kann durch eine Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)- abhängige Kurzketten-Dehydrogenase (SDR) wieder rückgängig gemacht werden. Das hat zur Folge, dass

Allopregnanolone über die Umwandlung in 5 α -DHP ebenfalls den Progesteron-Rezeptor aktivieren und die Gen-Transkription beeinflussen kann (Rupprecht, Reul et al. 1993).

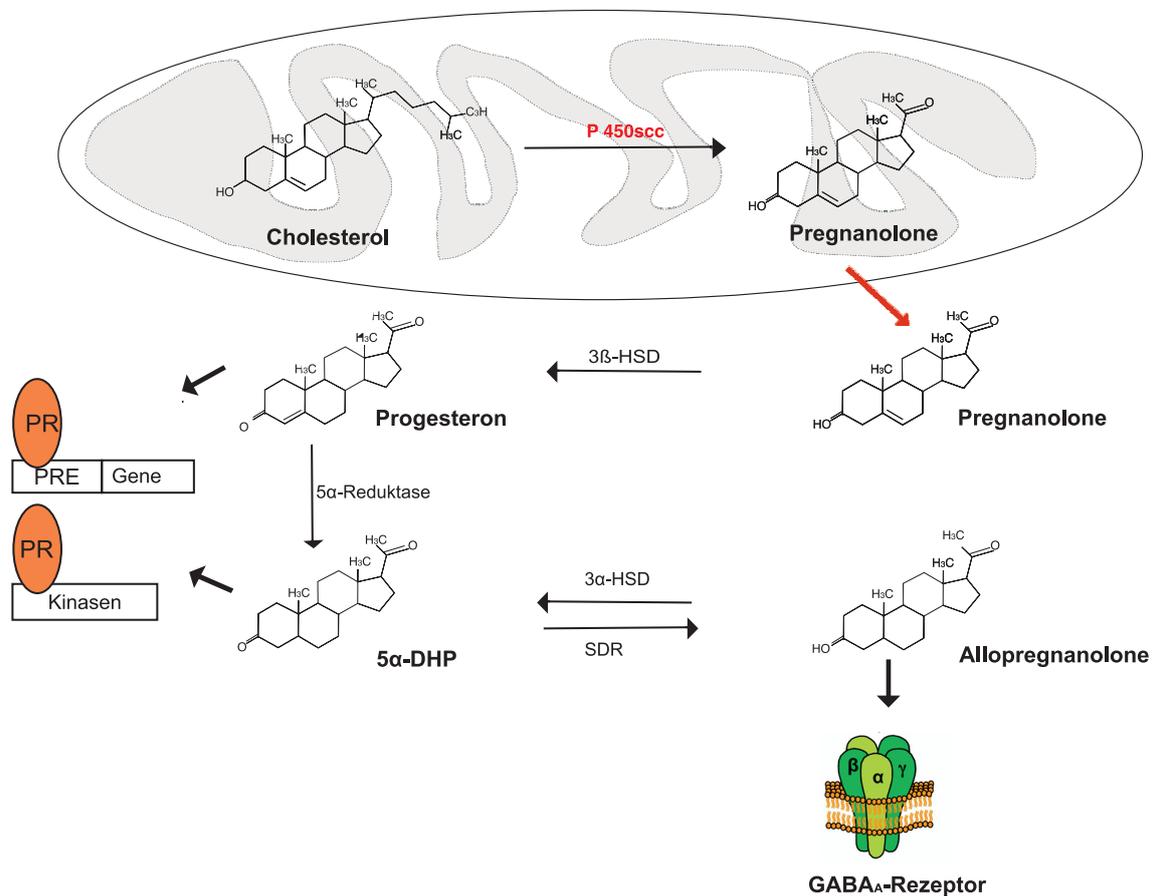


Abbildung 1 Die Bildung von Neurosteroiden aus Cholesterin. Während die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnanolon im Mitochondrium erfolgt, finden die nächsten Schritte im Zytosol statt. Sowohl Progesteron als auch 5 α -DHP binden an die intrazellulären PR, welche die Gentranskription regulieren oder mit Kinasen interagieren. Allopregnanolon wirkt nur am GABA_A-Rezeptor. Durch die Umwandlung in 5 α -DHP über die SDR kann Allopregnanolon über den PR die Gentranskription aktivieren.

Bereits im Jahr 1941 konnte Selye zeigen, dass Progesteronmetaboliten, wie Allopregnanolon, in Ratten Sedation und Anästhesie bewirken können (Selye 1941). Die Erkenntnis, dass Neurosteroiden die Erregbarkeit von Neuronen im Gehirn beeinflussen, führte zur Entwicklung von synthetischen steroidal Anästhetika (Gyermek and Soyka 1975). Unter dem Handelsnamen Althesin war vorübergehend ein Anästhetikum im klinischen Gebrauch, das aus Alphaxolone,

einem synthetischen Derivat des Progesteronmetaboliten Allopregnanolone, dessen Acetoxy-Ester und dem Lösungsmittel Cremopher bestand (Child, Currie et al. 1971). Wegen unerwünschter Nebenwirkungen, vor allem anaphylaktischen Reaktionen, wahrscheinlich durch das Lösungsmittel verursacht, wurde Althesin bald wieder vom Markt genommen (Clarke, Dundee et al. 1973).

Der genaue Wirkmechanismus der Neurosteroiden blieb unbekannt, bis Harrison and Simmonds (1984) zeigten, dass Alphaxolone die Transmission von γ -Aminobuttersäure (GABA) erhöhte. Da die zentral sedierenden Effekte schon nach kurzer Zeit eintraten, konnte ein genomischer Wirkungsort ausgeschlossen werden (McEwen, Coirini et al. 1990). Schon bald wurde klar, dass bestimmte Steroide, wie der Progesteronmetabolit Allopregnanolone, als potente stereoselektive positive allosterische Modulatoren des γ -Aminobuttersäure-Rezeptors Typ A (GABA_A-Rezeptor) fungieren (Belelli and Lambert 2005).

1.1.1 Das Neurosteroid Allopregnanolone

Zunächst wurde angenommen, dass Allopregnanolone, wie Progesteron, nur peripher im Ovar, Hoden und Nebenniere produziert wird und die Blut-Hirn-Schranke überqueren muss (Ficher and Steinberger 1971). Erst einige Jahre später wurden im zentralen Nervensystem (ZNS) sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen spezifische Enzyme identifiziert, die für die Synthese von Neurosteroiden verantwortlich sind, die entweder de novo oder ausgehend von Progesteronmetaboliten gebildet werden (Pelletier 2010).

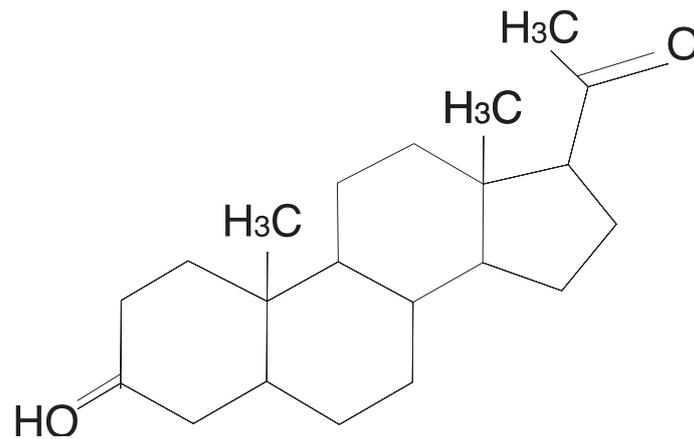


Abbildung 2 Das Neurosteroid Allopregnanolone.

Bei Stress, Schwangerschaft und in der neuronalen Entwicklung werden im peripheren Blut erhöhte Werte von Neurosteroiden gemessen (Purdy, Morrow et al. 1991, Lambert, Belelli et al. 1995). Neben der schnell eintretenden sedativen und betäubenden Wirkung scheint Allopregnanolone auch eine antikonvulsive, antidepressive und anxiolytische Wirkung zu haben (Purdy, Morrow et al. 1991). Anormale Werte von Neurosteroiden werden mit Depression, postpartum Depression, prämenstrueller Spannung, Panikattacken, Schizophrenie und Epilepsie in Verbindung gebracht (Purdy, Morrow et al. 1991, Marx, Trost et al. 2006). Allopregnanolone scheint eine positive Wirkung auf die Behandlung bei traumatischen Gehirnverletzungen zu haben (Djebaili, Hoffman et al. 2004). Außerdem hat es eine protektive Wirkung bei Rückenmarksverletzungen (Labombarda, Ghoumari et al. 2013), Gehirnschämien (Sayeed, Guo et al. 2006) und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Wang, Singh et al. 2010), Morbus Parkinson (Adeosun, Hou et al. 2012), Multipler Sklerose (Noorbakhsh, Baker et al. 2014) und peripherer diabetischer Neuropathie (Afrazi, Esmaeili-Mahani et al. 2014).

1.1.2 Allopregnanolone als positiv allosterischer Modulator des GABA_A-Rezeptors

Der GABA_A-Rezeptor ist der wichtigste inhibitorische Rezeptor im ZNS, der durch seinen natürlichen Liganden GABA aktiviert wird (Olsen and Sieghart 2008). Der Liganden-gesteuerte Ionenkanal setzt sich aus fünf Proteinuntereinheiten zusammen, wie in Abbildung (Abb.) 3 dargestellt. Diese bilden eine zentrale Kanalpore. Die beiden hydrophilen extrazellulär gelegenen Enden jeder Untereinheit bestehen je aus einem langen N-Terminus und einem kurzen C-Terminus. Dazwischen liegen vier Transmembrandomänen in Form von α -Helices mit einer relativ langen intrazellulären Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne. Diese lange Schleife beeinflusst die Ionenleitfähigkeit (Peters, Hales et al. 2005) und ist Ort für Protein-Interaktionen und für post-translationale Modifikationen der Rezeptoraktivität (Jacob, Moss et al. 2008). Die zweite Transmembrandomäne jeder Untereinheit bildet den Ionenkanal (Sine and Engel 2006).

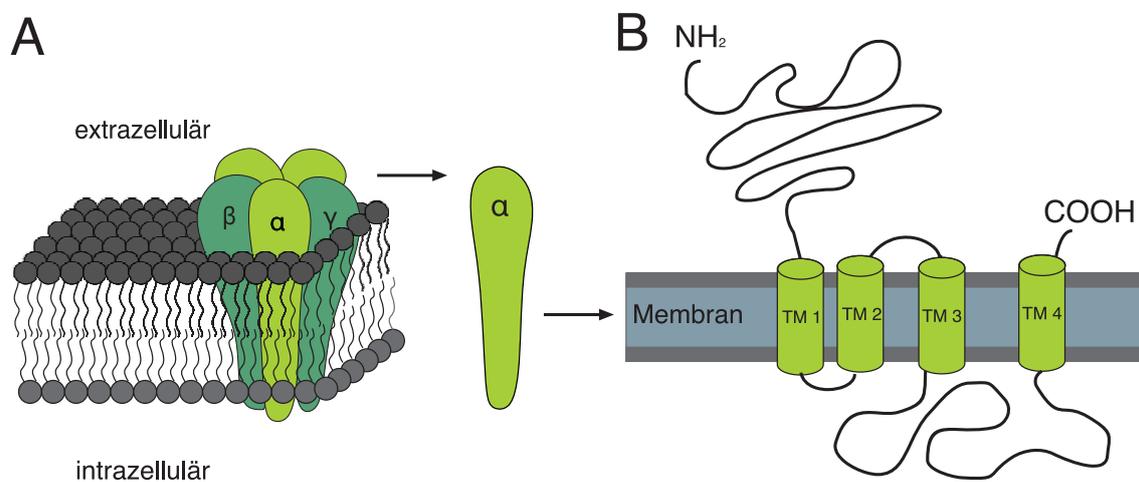


Abbildung 3 Zusammensetzung eines GABA_A-Rezeptors. (A) zeigt die Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors aus fünf Proteinuntereinheiten, (B) stellt die Zusammensetzung dieser Untereinheiten aus vier Transmembrandomänen (TM) dar.

Da GABA_A-Rezeptoren in verschiedenen Subtypen vorkommen, unterscheiden sich die fünf Proteinuntereinheiten in ihrer Zusammensetzung. Wie Simon, Wakimoto et al. (2004) zeigten, existieren 19 unterschiedliche Gene für die GABA_A-Rezeptor-Subtypen: α 1 – 6, β 1 – 3, γ 1 – 3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1 – 3. Damit gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Kombinationen von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, welche unterschiedliche pharmakologische und physiologische Eigenschaften vermitteln, wie von Pirker, Schwarzer et al. (2000) beschrieben. Zudem bestimmt die Zusammensetzung der Untereinheiten deren Verteilung auf der Zelloberfläche sowie deren dynamische Regulation (Michels and Moss 2007, Jacob, Moss et al. 2008). Im Gehirn bestehen die meisten GABA_A-Rezeptoren aus zwei α - und zwei β - Untereinheiten sowie einer γ - Untereinheit (Simon, Wakimoto et al. 2004). Die am häufigsten verbreiteten Zusammensetzungen der Subtypen sind die $\alpha_1 \beta_2 \gamma_2$ - Isoform (ca. 60 %), die $\alpha_2 \beta_3 \gamma_2$ - (ca. 15-20 %) und die $\alpha_3 \beta_x \gamma_2$ - Isoform (ca. 10-15 %) (Mohler, Fritschy et al. 2004). Die γ - Untereinheit kann durch die δ - oder ϵ - Untereinheit ersetzt werden (Olsen and Sieghart 2008). Während GABA_A-Rezeptoren, bestehend aus einer α_1 -, α_2 -, α_3 - Untereinheit, einer Variante der β - Untereinheit und der γ_2 - Untereinheit vor allem postsynaptisch lokalisiert sind, kommen in extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren oft die δ - Untereinheit zusammen mit einer α_4 - oder α_6 - Untereinheit vor (Fritschy and Panzanelli 2014).

Unterschiedliche Klassen von Substanzen können den GABA_A-Rezeptor aktivieren. Die natürliche Bindungsstelle von GABA liegt zwischen der α - und β - Untereinheit der extrazellulären Domäne des Rezeptors und ist gleichzeitig Bindungsort von orthosterischen Liganden wie Bicuculline oder Muscimol (Miller and Smart 2010). Bindet GABA oder ein orthosterischer Agonist, wird der GABA_A-Rezeptor direkt aktiviert. Anders verhält es sich mit der Klasse der allosterischen Liganden, welche die Funktion des GABA_A-Rezeptors indirekt modulieren, indem sie an ihrer individuellen Bindungsstelle binden, die sich von der natürlichen unterscheidet (Hosie, Wilkins et al. 2006). Zu dieser Klasse gehören neben Neurosteroiden (Belelli and Lambert 2005) auch Barbiturate und andere intravenöse Anästhetika, wie Propofol oder Etomidat (Olsen 2018).

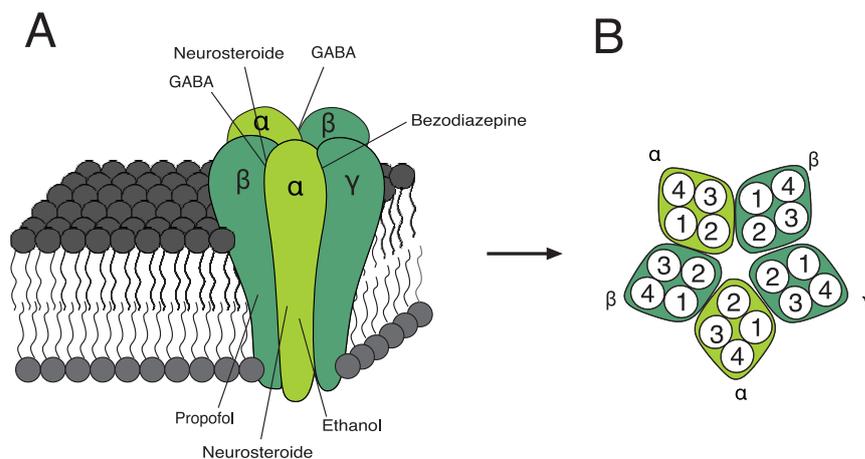


Abbildung 4 Darstellung eines GABA_A-Rezeptors mit der Anordnung der einzelnen Untereinheiten. (A) zeigt den GABA_A-Rezeptor mit den Bindungsstellen von GABA und von ausgewählten allosterischen Liganden. **(B)** stellt den Querschnitt durch den Rezeptor mit den vier Transmembrandomänen (1-4) dar. Die Transmembrandomäne 2 bildet die Kanalpore.

Wie Hosie, Wilkins et al. (2006) zeigten, existieren am GABA_A-Rezeptor zwei Bindungsstellen für Allopregnanolone, die diesen auf unterschiedliche Weise modulieren. In niedrigeren nanomolaren Konzentrationen werden GABAerge Ströme potenziert, indem Allopregnanolone an die α-Untereinheit bindet. In hohen Konzentrationen im submikromolaren bis mikromolaren Bereich bindet Allopregnanolone zusätzlich zwischen der α- und β-Untereinheit, was zu einer direkten Aktivierung des GABA_A-Rezeptors führt.

1.1.3 Modulation von synaptischen GABA_A-Rezeptoren durch Allopregnanolone

Wird an einem Nervenende ein Aktionspotential generiert, erfolgt durch den lokalen Einstrom von Kalziumionen in der Präsynapse die Verschmelzung eines mit GABA gefüllten Vesikels mit der präsynaptischen Membran. Jeder Vesikel enthält Tausende von GABA-Molekülen (Mody, De Koninck et al. 1994). Unmittelbar nach deren Freisetzung erreicht die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt kurzzeitig den millimolaren Bereich. Werden die

postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren durch die gleichzeitige Bindung zweier Agonisten aktiviert, kommt es durch den Einstrom von Anionen zu einer Hyperpolarisation und damit zur Erzeugung eines inhibitorischen postsynaptischen Stroms (inhibitory postsynaptic current, IPSC) (Baumann, Baur et al. 2003). Der erzeugte Strom wird auch „phasischer Strom“ genannt. Durch die hohe Konzentration von GABA im Vergleich zu den verfügbaren postsynaptischen Rezeptoren, werden die Ionenkanäle fast synchron geöffnet (Farrant and Nusser 2005). Auf diese Weise können präsynaptische Signale schnell und präzise in postsynaptische Signale umgewandelt werden.

Die Effektivität der durch GABA_A-Rezeptoren vermittelten Hemmung des postsynaptischen Neurons hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Hierzu zählen der Zeitverlauf der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt, die Zusammensetzung ebenso wie die Anzahl, Dichte und Lokalisation der GABA_A-Rezeptoren, sowie die GABA-Wiederaufnahmetransporter (Moss and Smart 2001, Jacob, Moss et al. 2008, Luscher, Fuchs et al. 2011).

Um Wirkung von Neurosteroiden auf GABA_A-Rezeptoren zu erforschen, wird häufig die Whole-cell Voltage-clamp-Technik angewendet, wie in 2.4 beschrieben. Im Gegensatz zu Benzodiazepinen, welche die Häufigkeit der Kanalöffnung steigern, oder Barbituraten, welche die Dauer der Chloridkanalöffnung verlängern, erhöhen Neurosteroiden durch Bindung an den GABA_A-Rezeptor sowohl die Häufigkeit als auch die Dauer der Chloridkanalöffnung (Twyman and Macdonald 1992, Hosie, Wilkins et al. 2007, Hosie, Clarke et al. 2009, Lambert, Cooper et al. 2009, Ramakrishnan and Hess 2010). Abbildung 5 stellt eine GABAerge Synapse mit der Wirkung von GABA auf synaptische und extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren, sowie die mögliche Modulation der GABAergen Inhibition durch Neurosteroiden dar.

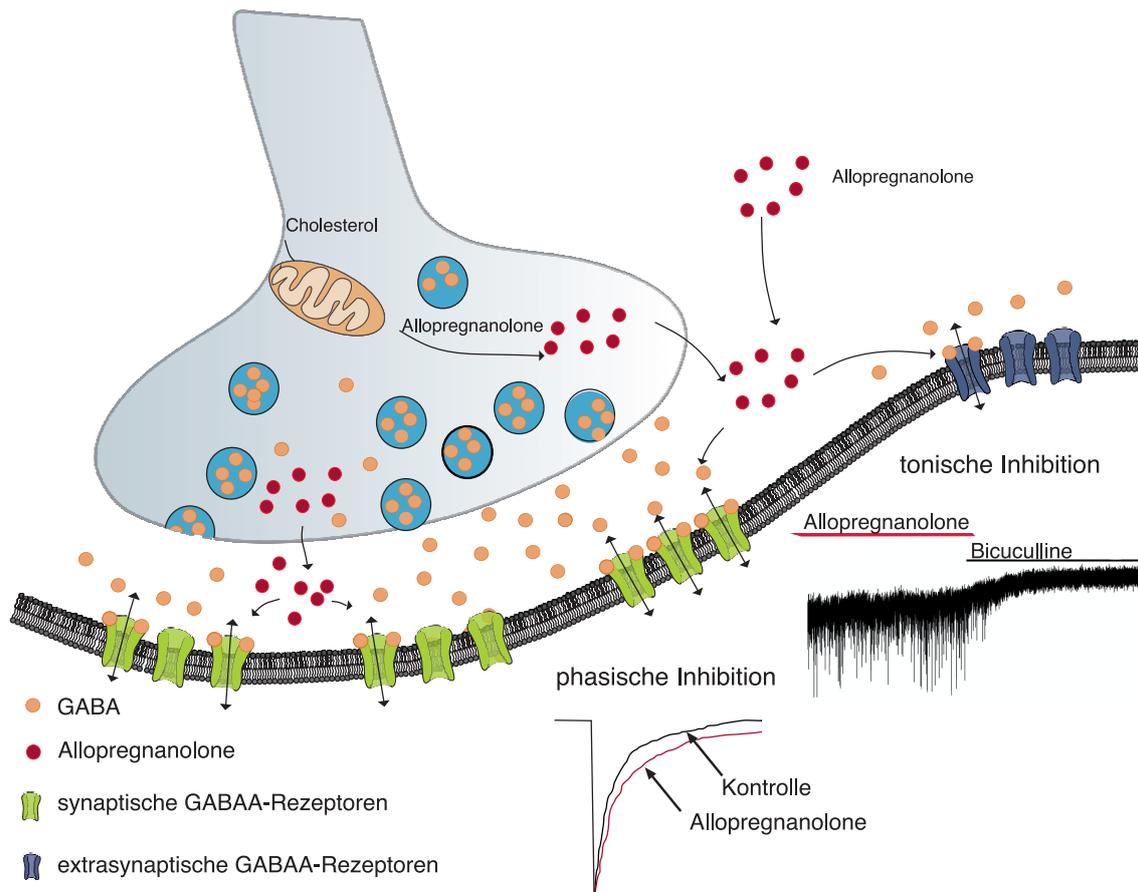


Abbildung 5 Die GABAerge Synapse. Die Abbildung stellt eine GABAerge Synapse sowie die Modulation der neuronalen Hemmung durch Neurosteroid dar. GABA wird durch Vesikel freigesetzt und aktiviert postsynaptische GABA_A-Rezeptoren. Dies führt zur Erzeugung eines vorübergehenden hemmenden postsynaptischen Stroms, der sogenannte phasische Strom. Durch die Bindung von Neurosteroiden am GABA_A-Rezeptor kann das Abklingen dieses Stroms verlängert und die phasische Inhibition verstärkt werden (rote Kurve). Extrasynaptisch lokalisierte Rezeptoren werden durch niedrige GABA-Spiegel aktiviert und erzeugen eine tonische Inhibition. Unter Whole-cell Voltage-clamp-Bedingungen spiegelt sich dieser als Verschiebung der Baseline wider und kann durch Applikation von Bicculline detektiert werden. Dieser GABA_A-Rezeptor Antagonist bewirkt eine Schließung der extrasynaptischen Rezeptoren. Neurosteroid können die tonische Inhibition verstärken.

Verschiedene Neurone reagieren in unterschiedlicher Weise auf Neurosteroid. Während für die Hemmung der Cornu Amonis (CA) 1-Neurone des Hippocampus und der zerebellären Körner- und Purkinje-Zellen kleine nanomolare Konzentrationen ausreichen, sind im Hypothalamus Konzentrationen im mikromolaren Bereich nötig (Lambert, Belelli et al. 2003). Auch in der gleichen Hirnregion sind Zelltyp-spezifische Unterschiede dokumentiert. Als Beispiel wäre

zu nennen, dass die Körnerzellen des Gyrus dentatus eine 30-fach höhere Dosis von Allopregnanolone benötigen als die CA 1-Neurone des Hippocampus (Harney, Frenguelli et al. 2003). Im Neocortex konnten Drexler, Balk et al. (2016) zeigen, dass die Applikation von 100 nM Allopregnanolone ebenfalls zu einer deutlich signifikanten Verlängerung der Abklingzeit der IPSCs führt. Entsprechende Studien an spinalen Neuronen fehlen fast vollständig.

Neben den beschriebenen postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren existieren zudem präsynaptische GABA_A-Rezeptoren, die zusätzlich durch eine Regulierung der Frequenz der postsynaptischen Ströme die Freisetzung von GABA steuern (Vautrin, Schaffner et al. 1994, Axmacher and Draguhn 2004, Kullmann, Ruiz et al. 2005). Auch sie zählen zu den wahrscheinlichen molekularen Zielstrukturen von Allopregnanolone

1.1.4 Modulation von extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren durch Allopregnanolone

In kleinen Konzentrationen von circa (ca.) 0,2 - 2,5 μ M ist GABA auch extrazellulär zu finden (Glykys and Mody 2007). Unterschiedliche Ursprungsorte des extrazellulär vorkommenden GABA werden diskutiert. Glykys and Mody (2007) konnten zeigen, dass extrazelluläres GABA vor allem durch „Spillover“ von synaptischer vesikulärer GABA-Freisetzung entsteht. Zudem wird vermutet, dass GABA durch Astrozyten (Liu, Schaffner et al. 2000, Kozlov, Angulo et al. 2006, Christensen, Delgado-Lezama et al. 2018), durch umgekehrt arbeitende GABA-Transporter (Richerson and Wu 2003) oder durch nicht-vesikuläre und Aktionspotential-unabhängige Mechanismen freigesetzt wird (Brickley, Cull-Candy et al. 1996, Bright, Aller et al. 2007).

Extra- und perisynaptisch lokalisierte GABA_A-Rezeptoren besitzen eine vergleichsweise hohe Affinität für GABA und weisen eine geringere Desensibilisierungsrate auf. Sie werden deshalb bereits durch niedrige Konzentrationen von GABA aktiviert (Farrant and Nusser 2005). Im Gegensatz

zur schnellen phasischen Inhibition, werden durch die repetitive langsame Aktivierung dieser Rezeptoren sogenannte (sog.) „tonische Ströme“ erzeugt (Lambert, Belelli et al. 2003). Diese hemmen die neuronale Erregbarkeit langanhaltend. Durch die tonische Inhibition kann bis zur vierfachen Ladung übertragen werden (Nusser and Mody 2002, Mody and Pearce 2004, Semyanov, Walker et al. 2004). Bei einem gegebenen erregenden Input (excitatory postsynaptic current; EPSC) wird die Größe und Dauer des EPSCs durch die tonische GABAerge Inhibition verringert und das zeitliche und räumliche Fenster, über das die Signalintegration erfolgen kann, verengt. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass ein Aktionspotential erzeugt wird (Glykys and Mody 2007).

Die Aktivierung des GABA_A-Rezeptors durch tonische Ströme wurde elektrophysiologisch erstmalig in Whole-cell Voltage-clamp-Ableitungen von Körnerzellen im Kleinhirn von Ratten beschrieben (Kaneda, Farrant et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass GABA_A-Rezeptor-Antagonisten wie Bicuculline, nicht nur die IPSCs, sondern auch den Haltestrom unter Voltage-clamp-Bedingungen verringerten. Dies resultierte aus der Blockade von anhaltend geöffneten extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren durch Bicuculline. Zudem wurde das Hintergrundrauschen reduziert, was die Blockade von stochastisch vorkommenden GABA_A-Rezeptoren widerspiegelt. Seither konnte in Studien in unterschiedlichen Neuronen GABA-vermittelte tonische Inhibition nachgewiesen werden, wie in Körnerzellen des Gyrus dentatus (Nusser and Mody 2002), Neuronen des Thalamus (Porcello, Huntsman et al. 2003), Neuronen der CA 1-Region des Hippocampus (Bai, Zhu et al. 2001) und Pyramidenzellen des somatosensorischen Cortex (Drasbek and Jensen 2006).

Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren unterscheiden sich von den synaptischen GABA_A-Rezeptoren in ihren pharmakologischen Eigenschaften sowie in der Zusammensetzung der Untereinheiten (Belelli and Lambert 2005, Herd, Belelli et al. 2007). GABA_A-Rezeptoren, welche die δ - Untereinheit enthalten, kommen ausschließlich extrasynaptisch vor und weisen eine besonders hohe Affinität

gegenüber Neurosteroiden wie Allopregnanolone vor (Stell, Brickley et al. 2003, Luscher, Fuchs et al. 2011), während einige Benzodiazepine keine Wirkung auf sie haben (Farrant and Nusser 2005). Die δ - Untereinheit kommt meist mit der $\beta_{2/3}$ - Untereinheit sowie der α_4 - oder α_6 - Untereinheit vor, abhängig von dem jeweiligen Gewebe und der Region (Carver and Reddy 2013). Ihre Verbreitung ist innerhalb des Kleinhirns, des Thalamus und des Hippocampus sehr häufig (Pirker, Schwarzer et al. 2000). Neben der δ - Untereinheit kommen auch andere Untereinheiten extrasynaptisch vor. Der $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ - GABA_A-Rezeptor ist in Pyramidenzellen der CA 1- und CA 3-Region des Hippocampus stark exprimiert und erzeugt hier einen tonischen Strom (Caraiscos, Elliott et al. 2004, Semyanov, Walker et al. 2004, Glykys and Mody 2006, Prenosil, Schneider Gasser et al. 2006, Glykys and Mody 2007).

1.1.5 Heterogenität der neuronalen Inhibition durch Allopregnanolone

Zentrale Neurone reagieren sehr unterschiedlich auf Neurosteroiden wie Allopregnanolone. Eine wichtige Ursache sind die zelltyp-spezifischen Expressionsmuster der unterschiedlichen synaptischen und extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren sowie endokrine Faktoren. Bei Frauen steigt beispielsweise mit der Konzentration des Steroidhormons Progesteron im Verlauf des Menstruationszyklus die Expression von sowohl δ - als auch γ_2 - Untereinheiten, was zu einer Zunahme der tonischen Inhibition führt. Die Folgen sind die reduzierte neuronale Erregbarkeit mit erniedrigter Krampfschwelle und Angstgefühl (Maguire, Stell et al. 2005). Die chronische Exposition von Progesteron oder Allopregnanolone, wie bei der Geburt, führt außerdem zu einer verstärkten Expression der α_4 - Untereinheit, was eine vermehrte Unempfindlichkeit gegenüber Benzodiazepinen zur Folge hat (Smith, Shen et al. 2007). Dies kann eine Erklärung für post-partum Symptome sein, wie gesteigertes Angstgefühl, erniedrigte Krampfschwelle, Depression und Wirkungslosigkeit von Benzodiazepinen (Smith, Gong et al. 1998).

Auch kann die Konzentration von Allopregnanolone in verschiedenen Hirnarealen sehr unterschiedlich sein. Dies resultiert aus Veränderungen im Metabolismus oder in der Synthese, die unter anderem auch durch die heterogene Verteilung der Enzyme bedingt sind (Bradley, Biggio et al. 2001, Mellon, Griffin et al. 2001, Mellon and Griffin 2002).

1.2 Wirkung von Allopregnanolone im Rückenmark

Viele Studien konzentrieren sich auf die Wirkung von Neurosteroiden auf GABA_A-Rezeptoren im Gehirn. Über die Wirkung auf spinale GABA_A-Rezeptoren ist kaum etwas bekannt. Unstrittig ist hingegen, dass die durch Anästhetika induzierte Muskelrelaxation und Unterdrückung von Bewegungen auf einen bestimmten Schmerzreiz vor allem durch spinale Neurone erzeugt wird (Rampil, Mason et al. 1993, Antognini, Wang et al. 2000).

Ein Schmerzreiz wird durch das Verletzen freier Nervenenden in der Haut ausgelöst, beispielsweise durch den Hautschnitt einer Operation. Über die afferenten Axone der Nozizeptoren werden Aktionspotentiale in das Hinterhorn des Rückenmarks weitergeleitet. Dort erfolgt die Umschaltung auf Interneurone oder Strangzellen. Letztere leiten die Signale an andere Rückenmarkssegmente und Gehirnabschnitte weiter. Die inhibitorischen oder exzitatorischen Interneurone sind direkt oder indirekt mit den Motoneuronen des Vorderhorns verschaltet. Die Axone der Motoneurone enden an bestimmten Muskeln, welche durch die Freisetzung von Acetylcholin an der neuromuskulären Synapse aktiviert werden. Daraus resultiert die motorische Reflexantwort, wie beispielsweise das Wegziehen der Extremität. Abbildung 6 zeigt die Entstehung der motorischen Reflexantwort auf einen Schmerzreiz.

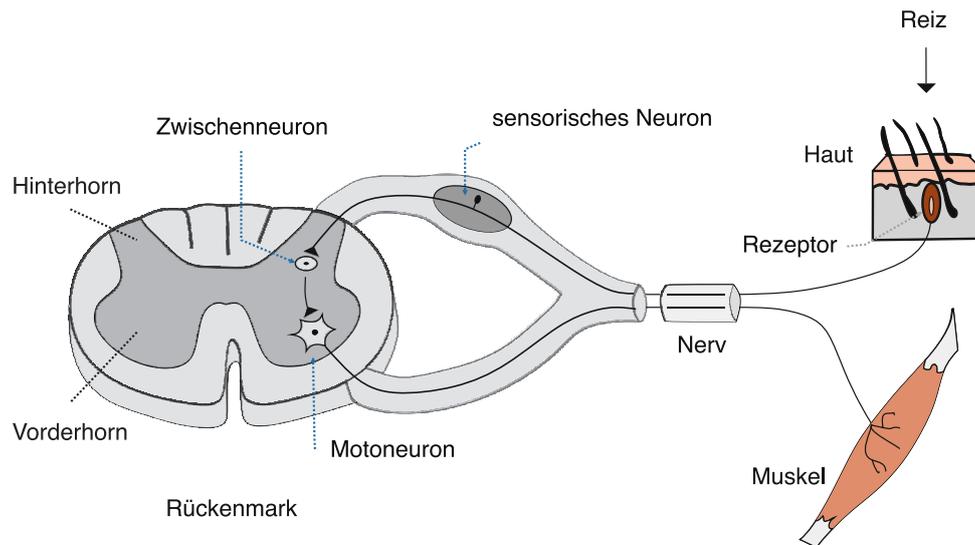


Abbildung 6 Darstellung der Entstehung eines Schmerzreizes. Durch einen erzeugten Schmerzreiz erfolgt die Weiterleitung des Signals in Form von Aktionspotentialen in das spinale Hinterhorn, wo die Umschaltung auf spinale Interneurone erfolgt. Diese leiten die Signale auf α -Motoneurone im Vorderhorn weiter, welche eine Kontraktion des Muskels bewirken.

Die Verschaltung von spinalen Reflexen verläuft mit Ausnahme von monosynaptischen Reflexen über spinale Interneurone. Die Ergebnisse von Grasshoff, Netzhammer et al. (2008) legen die Vermutung nahe, dass Anästhetika-induzierte Immobilität unter anderem durch tonische Inhibition von spinalen Interneuronen des Vorderhorns entsteht. Wie genau Neurosteroiden in die motorischen Schaltkreise eingreifen, ist weitgehend ungeklärt.

1.3 Propofol als gebräuchlichstes Allgemeinanästhetikum

Die Allgemeinanästhesie beinhaltet neben der Immobilität und Muskelrelaxation die Komponenten Amnesie, Hypnose, Analgesie und Anxiolyse. Allgemeinanästhetika entfalten ihre Wirkung, indem sie entweder inhibitorische Signale verstärken oder exzitatorische Signale vermindern (Garcia, Kolesky et al. 2010). Bei keinem der klinischen Allgemeinanästhetika ist eine selektive Wirkung

auf einen einzelnen Ionenkanal bekannt. Jedes Anästhetikum moduliert zwei oder mehr Ionenkanäle im ZNS (Grasshoff, Rudolph et al. 2005).

Propofol wird als intravenös verabreichtes Anästhetikum sehr häufig zur Einleitung oder Aufrechterhaltung der Allgemeinanästhesie oder als Sedativum verwendet. Da es sehr schnell an- und abflutet, ist es gut steuerbar. Durch die hohe Lipidlöslichkeit kann es sehr schnell die Blut-Hirn-Schranke passieren und ins ZNS gelangen. Dort wirkt es vor allem über GABA_A-Rezeptoren (Bai, Pennefather et al. 1999). Die unterschiedlichen klinischen Wirkungskomponenten werden durch unterschiedliche Regionen des ZNS vermittelt. Wie verschiedene Studien vermuten lassen, werden die sedierenden Eigenschaften von Propofol durch subcorticale (Fiset, Paus et al. 1999, Nelson, Guo et al. 2002) wie auch cortikale (Alkire, Haier et al. 1995) Strukturen vermittelt. Amnesie entsteht vor allem durch die Hemmung hippocampaler Neurone (Grasshoff, Rudolph et al. 2005). Eine weitere Wirkungskomponente ist die Immobilität, welche vorwiegend im Rückenmark erzeugt wird (Antognini and Schwartz 1993, Rampil, Mason et al. 1993).

1.3.1 Wirkung von Propofol im Rückenmark

Experimente an Ratten konnten zeigen, dass die immobilisierende Wirkung von volatilen Anästhetika nach Durchtrennung des oberen thorakalen Rückenmarks oder Entfernung des Gehirns nur minimal vermindert wurde. Dies ließ darauf schließen, dass Immobilität vorwiegend durch das Rückenmark vermittelt wird (Antognini, Wang et al. 2000).

Wo genau Propofol im Rückenmark die Bewegung nach einem schmerzhaften Reiz unterdrückt, ist weitgehend ungeklärt. Frühere Studien ließen vermuten, dass Propofol Immobilität vor allem durch Hemmung von Neuronen im dorsalen Horn erzeugt (Uchida, Kishikawa et al. 1995, Antognini, Wang et al. 2000). Neuere Studien gehen eher davon aus, dass spinale Vorderhornneurone empfindlicher auf Propofol reagieren und das Vorderhorn eine wichtige

Zielstruktur zur Erzeugung von Anästhetika-induzierter Immobilität darstellt (Kim, Yao et al. 2007, Kungys, Kim et al. 2009, Eckle, Rudolph et al. 2014). Im ventralen Horn des Rückenmarks sind neben spinalen Interneuronen auch die Motoneurone lokalisiert. In vivo Studien zeigten, dass durch die Applikation eines GABA_A-Rezeptor-Antagonisten die immobilisierende Wirkung von Propofol deutlich verringert wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass Propofol den motorischen Output im Rückenmark vor allem über die Modulation von GABA_A-Rezeptoren hemmt (Kungys, Kim et al. 2009).

1.3.2 Wirkung von Propofol am GABA_A-Rezeptor

Bei einer Plasmakonzentration von 0,5 µM Propofol entsteht Hypnose, Immobilität wird bei 50 % der Patienten bei 1-1,5 µM erzeugt (Franks and Lieb 1998, Rehberg and Duch 1999). Wie Eckle, Rudolph et al. (2014) zeigten, moduliert Propofol sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch gelegene GABA_A-Rezeptoren. In der klinisch relevanten Dosierung von 1 µM beeinflusst Propofol im Vorderhorn des Rückenmarks phasische GABAerge Ströme, während erst ab einer Konzentration von 5 µM ein tonischer Strom zu messen war. Dies impliziert eine unterschiedliche Sensitivität von synaptischen und extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren auf Propofol, was wahrscheinlich durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten zustande kommt (Eckle, Rudolph et al. 2014). Dieselbe Studie bestätigte die Ergebnisse von Jurd, Arras et al. (2003), die zeigten, dass Propofol ebenso wie Etomidat im Rückenmark seine synaptische Wirkung vor allem über die GABA_A-Rezeptoren mit der β₃- Untereinheit vermittelt.

1.4 Interaktion zwischen zwei allosterischen Modulatoren

Sowohl das Neurosteroid Allopregnanolone als auch das intravenöse Anästhetikum Propofol wirken als positiv allosterische Modulatoren am GABA_A-Rezeptor. Da diese allosterische Modulatoren verschiedene individuelle

Bindungsstellen am gleichen Rezeptor aufweisen, können sie gleichzeitig binden und die GABAerge Inhibition beeinflussen (Hosie, Buckingham et al. 2006, Chiara, Jayakar et al. 2013, Yip, Chen et al. 2013, Li, Bracamontes et al. 2014, Sieghart 2015). Dabei können Neurosteroiden an alle Isoformen des GABA_A-Rezeptors mit unterschiedlicher Affinität und maximaler Wirkung binden, abhängig von der jeweiligen Zusammensetzung der Untereinheiten (Puia, Ducić et al. 1993, Belelli, Casula et al. 2002, Wohlfarth, Bianchi et al. 2002, Bianchi and Macdonald 2003, Spigelman, Li et al. 2003). Ob die gleichzeitige Bindung von Allopregnanolone und Propofol zu einer additiven Überlagerung der Einzeleffekte führt, oder ob synergistische oder antagonistische Interaktionen auftreten, ist nicht bekannt.

Frühe Studien zeigten, dass Neurosteroiden die Affinität von GABA_A-Rezeptoren für Muscimol (Harrison and Simmonds 1984) und Flunitrazepam (Harris, Mihic et al. 1997) erhöhen können. Li, Bracamontes et al. (2014) untersuchten die Interaktion zwischen dem Neurosteroid Pregnanolone und Etomidat, ebenfalls ein intravenöses Anästhetikum und positiv allosterischer Modulator am GABA_A-Rezeptor. Dabei zeigte sich, dass der Effekt einer gleichzeitigen Verabreichung beider Substanzen die Summe der Einzeleffekte übertraf, was auf einen Synergismus hindeutete. Drexler et al (2016) stellten darauf die Hypothese einer synergistischen Interaktion zwischen Neurosteroiden und Anästhetika auf und konnten anhand von elektrophysiologischen Messungen an organotypischen Gewebeschnitten des Neokortex weitere Befunde publizieren, die für die Richtigkeit dieser Hypothese sprechen.

1.5 Fragestellung

Bereits früh wurde gezeigt, dass Allopregnanolone über Wirkung am GABA_A-Rezeptor Bewusstlosigkeit verursacht. Das Rückenmark dient als Zielort einer muskelrelaxierenden und immobilisierenden Wirkung. Nach neueren Studien reagieren vor allem die spinalen Interneurone des Vorderhorns empfindlicher auf

Anästhetika, die als allosterische Modulatoren am GABA_A-Rezeptor wirken. Grasshoff, Netzhammer et al. (2008) zeigten, dass die durch Propofol induzierte Immobilität unter anderem durch tonische Inhibition von spinalen Interneuronen des Vorderhorns entsteht. Von diesem Befund leitet sich die erste Hypothese ab, dass auch Allopregnanolone die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone und Motoneurone reduziert. Hierzu wurden Whole-cell Voltage-clamp-Ableitungen durchgeführt, um die Effekte von Allopregnanolone auf die phasische und tonische GABAerge Inhibition spinaler Neurone zu quantifizieren. Aufgrund der in der Literatur dokumentierten unterschiedlichen Empfindlichkeit, mit der zentrale Neurone auf Neurosteroiden reagieren, mussten die Effekte von Allopregnanolone in einem breiten Konzentrationsbereich untersucht werden.

Der Synergismus der beiden allosterischen Modulatoren Allopregnanolone und Propofol konnte bereits im Neokortex nachgewiesen werden. Daraus ergab sich die Frage, ob die in spinalen Neuronen zu beobachtenden pharmakologischen Interaktionen zwischen Allopregnanolone und Propofol mit jenen in neokortikalen Neuronen vergleichbar oder unterschiedlich sind.

Organotypische Gewebeschnitte des Rückenmarks wurden als Modellsystem verwendet, um diese Untersuchungen durchzuführen. Die Kulturen, die von Embryonen oder postnatalen Tieren präpariert werden, behalten nicht nur die anatomischen Merkmale bei, sondern durchlaufen einen Reifungsprozess und entwickeln morphologische und zytoarchitektonische Merkmale, welche dem Ursprungsgewebe sehr ähnlich sind (Drexler, Hentschke et al. 2010). Dadurch bilden sie ein intaktes Netzwerk spinaler Neurone aus, wodurch sich dieses Modellsystem sehr gut zum Testen neuroaktiver Substanzen eignet. Durch den Reifungsprozess zum Monolayer sind organotypische Kulturen dünner als akute Schnitte und weisen dadurch eine geringere Diffusionszeit des Pharmakons an die molekulare Zielstruktur auf (Gredell, Turnquist et al. 2004).

Zur Beurteilung der Wirkung von Allopregnanolone und Propofol auf den motorischen Output von spinalen Muskelzellen wurden organotypische

Rückenmarkskulturen mit Muskel-Co-Kulturen verwendet. Spenger, Braschler et al. (1991) zeigten, dass spinale Interneurone und Motoneurone mit den neuromuskulären Synapsen in vivo sehr ähnlich sind. Die Motoneurone konnten durch intrazelluläre Füllung und retrograde axonale Färbung identifiziert werden. Neuromuskuläre Synapsen wurden durch Färbung der Acetylcholinesterase auf Muskelfasern sichtbar gemacht. Streit, Spenger et al. (1991) konnten zeigen, dass organotypische Muskelzell-Co-Kulturen ein geeignetes ex-vivo Modell zur Untersuchung der Muskelinnervation sowie der spinalen Netzwerkaktivität darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Präparationsysteme

Da organotypische Zellkulturen nach Braschler die Original-Zytoarchitektur beibehalten, können Zellinteraktionen ähnlich wie in vivo ablaufen (Braschler, Iannone et al. 1989). Alle Verfahren wurden von der lokalen Tierschutzkommission (Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Deutschland, 1. März 2017) genehmigt und nach dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt.

2.1.1 Organotypische Gewebeschnitte des Rückenmarks

Für die Experimente wurden weibliche Tiere der Linie C57/BL6J (E 13–15) verwendet, die ca. 15 Tage trächtig waren. Die Instrumente, die für die Präparation erforderlich waren, entstammen den Firmen A. Dumont & Fils, Schweiz und Fine Science Toll GmbH, Heidelberg, Deutschland. Nachdem die Tiere mit Isofluran (Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) bis zum Einsetzen der Schnappatmung anästhesiert wurden, erfolgte die Dekapitation mittels einer Guillotine (Harvard apparatus, Edinbridge, Kent, England). Im Anschluss wurde das Fell des Bauches mit einer Schere unter Zuhilfenahme von einer chirurgischen Pinzette entfernt und mit Alkohol (Ethanol, Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) desinfiziert. Nach Eröffnung des Peritoneums und des Uterus, wurden die Mäuseembryonen an der Nabelschnur steril entnommen und sofort in eine Petrischale mit eiskalter Gey's Balanced Salt Solution (GBBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), zu welcher Glucose und Magnesiumchlorid zugefügt wurde, überführt.

Die folgenden Präparationsschritte erfolgten unter einer Sterilbank (BDK Luft & Reinraumtechnik GmbH, Reutlingen, Deutschland), um eine mögliche Kontamination durch Pilzsporen oder Bakterien vorzubeugen. Neben sterilen Instrumenten wurde auf eine ausreichende Kühlung mittels Kühlplatten geachtet.

Mit Hilfe eines Binokulars (Leitz, Wetzlar) mit externer Kaltlichtbeleuchtung (Intralux 150 H, Volpi, Denzlingen, Deutschland) wurden Amnionsack und Uterusreste von den Mäuseembryonen entfernt. Im Anschluss konnte das embryonale Rückenmark vom umliegenden Gewebe freigelegt und von der Dura mater befreit werden. Pro Präparation wurden Rückenmarkstränge aus vier bis sechs Mäuseembryonen isoliert. Diese wurden im nächsten Präparationsschritt in einen vorgefertigten Agarblock eingebettet.

Tabelle 1 Zusammensetzung der GBSS

Verbindung	mM
NaCl	137,931
KCl	4,963
Na ₂ HPO ₄	0,843
KH ₂ PO ₄	0,22
MgCl ₂	10
MgSO ₄	0,284
NaHCO ₃	2,702
CaCl ₂	0,5
D-Glucose	60

Für die Herstellung des 1,5-prozentigen Agars wurde 750 µg reiner Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgewogen und mit 50 ml GBSS unter Verwendung einer Heizplatte mit integriertem Rührer (Heidolph MR 3001, Deutschland) vermischt. Nach Aufkochen wurde der flüssige Agar in eine sterile Glaspetrischale bis zu einer Höhe von ca. 5-7 mm gefüllt. Der restliche Agar wurde in einem Wärmeschrank (Certomat, B. Braun, Deutschland) aufbewahrt. Nach Erhärtung des Agars in der Glaspetrischale wurde ein Quader in den Maßen von 2 x 0,7 x 1 cm gefertigt und entsprechend der Anzahl der Rückenmarkstränge U-förmige Vertiefungen hineingeschnitten. Ein zweiprozentiger Agarblock diente als Stütze. Dieser wurde einige Tage im Voraus aus 100 ml isotonischer Kochsalzlösung und 2 g Agar erstellt und ebenfalls in eine sterile Glaspetrischale gegossen. Nach Herausschneiden eines Stützquaders wurde dieser mit Sekundenkleber (Tesa, Norderstedt,

Deutschland) an einer Seite eines Teflonstützblockes (Lee, Frankfurt, Deutschland) befestigt.

Die Rückenmarkstränge wurden in die Vertiefungen eingebettet. Abhängig von der Anzahl und Größe wurden maximal vier Rückenmarkstränge neben- und zwei hintereinandergelegt. Nach vorsichtigem Trockentupfen wurden die Rückenmarkstränge unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette mit flüssigem Agar beträufelt und dadurch in den Rillen fixiert. Unmittelbar danach wurde der Agarblock mit eiskalter GBSS vollständig bedeckt, um den flüssigen Agar möglichst rasch zu erhärten. Der Agarblock mit den nunmehr eingebetteten Rückenmarksträngen wurde zugeschnitten und dann vor dem Stützblock mit Sekundenkleber angebracht. Zur optimalen Fixierung wurde wiederum flüssiger Agar zwischen die beiden Agarblöcke geträufelt.

Der Teflonstützblock wurde in die gekühlte Badkammer (Kältetechnik Fryka, Esslingen, Deutschland) eines Vibratoms (Campden Instruments LTD Vibroslice U.K) eingespannt und mit eiskalter GBSS gefüllt. Im Anschluss wurden 300 µm dicke transversale Schnitte angefertigt, die wiederum sofort in Petrischalen mit gekühlter GBSS überführt wurden. Unter dem Binokular wurden Agar- und übrige Gewebereste entfernt.

Die spinalen Schnitte wurden einzeln auf sterile Deckgläser (Kindler, Mikroskopische Gläser, Freiburg, Deutschland) in einen Tropfen von 13 µl heparinisiertem Hühnerplasma P 3266 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) aufgebracht. Dieses wurde daraufhin mit 13 µl Thrombin T 4648 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) vermengt. Die Deckgläser waren wenige Tage vorher durch Kochen und anschließendes Abflammen mit 99-prozentigem Ethanol (Ethanol, Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland) desinfiziert worden. Im Anschluss wurden 0,5 ml einer Stammlösung von 500 µg/ml Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit 9,5 ml Aqua Destillata (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) vermengt. Daraus wurden 230 µl

auf dem Deckglas verteilt und nach drei Stunden Einwirkzeit mit Aqua destillata abgewaschen und im Anschluss getrocknet.

Nach ca. 5 – 10 min waren die Rückenmarksschnitte ausreichend in dem entstandenen Plasmakoagulat fixiert und konnten in sterile Plastikkulturröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) eingebracht werden. Nach Zugabe von 15 µl des neuronalen Wachstumsfaktors (NGF) N2513 (0,5 µg/ml) (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 750 µl Kulturmedium, wurden die Schnitte bei 36°C in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) mit 5 %-iger CO₂-Konzentration für mindestens 60 min begast. Durch lockeres Zuschrauben des Deckels wurde der pH des Kulturmediums stabilisiert und einer Alkalisierung entgegengewirkt (Braschler, Iannone et al. 1989).

Tabelle 2 Zusammensetzung des Nährmediums

Lösung	Menge in [ml]
Pferdeserum ¹	100
Hanks Salzlösung mit Phenolrot ¹	100
50% D-Glucose ²	4
Glutamin 200 mM ²	2
Eagle Basalmedium ohne Glutamin ²	200

¹beide von Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

²von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Nach der Begasung wurde der Deckel der Kulturöhrchen fest verschlossen und weiterhin im Brutschrank bei 36°C aufbewahrt. Bei dem Medienwechsel am folgenden Tag erfolgte einmalig zur Hemmung des glialen Wachstums die zusätzliche Gabe von 10 µl einer Zytostatika-Lösung (10 µM 5 – Flouro – 2 – Deoxyuridin, 10 µM Cytosen – B – D – Furanosid und 10 µM Uridin, alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland).

Das Nährmedium wurde alle drei bis vier Tage ausgetauscht. Nach jedem Medienwechsel wurden die Kulturen wie oben beschrieben mit CO₂ begast. In dem Brutschrank wurden die Kulturöhrchen mit der Roller-Tube-Technik nach

Gähwiler (1981) in einer um ca. fünf Grad horizontal geneigten Trommel mit ca. zehn Umdrehungen pro Stunde gedreht. Die wechselnde Flüssigkeits-Gas-Verteilung bewirkte eine ausreichende Oxygenierung und Versorgung der Schnittkulturen. Nach 14 Kultivierungstagen können die Schnitte für elektrophysiologische Messungen verwendet werden.

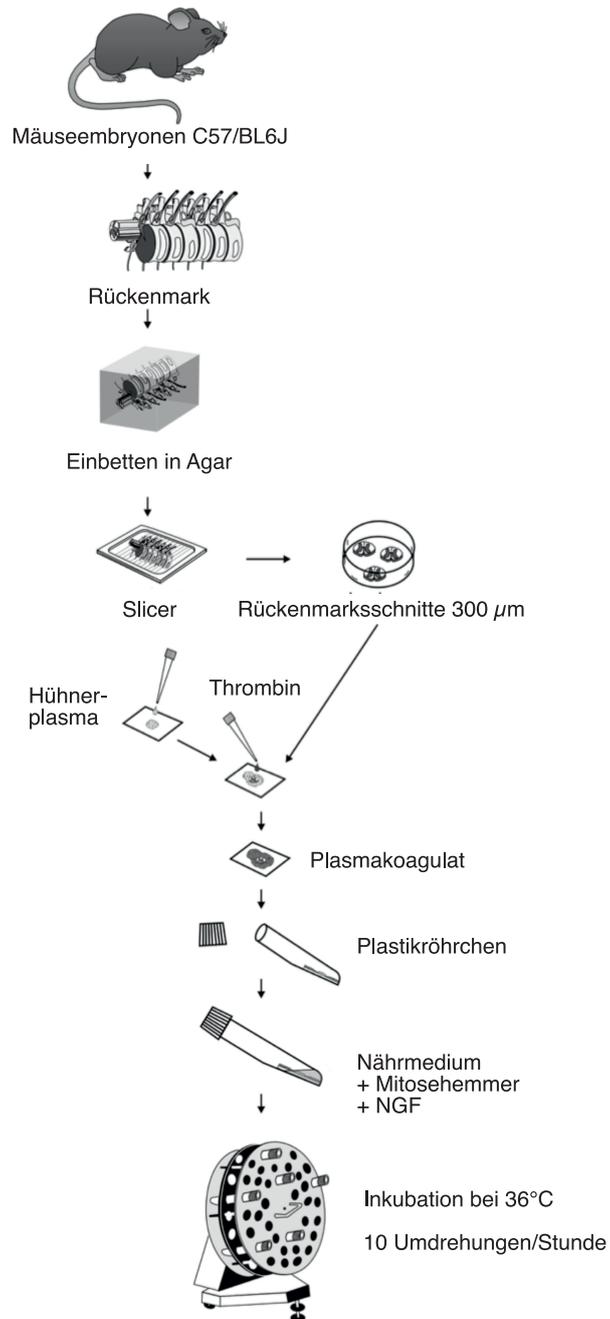


Abbildung 7 Herstellung von organotypischen Kulturen des Rückenmarks. Modifiziert nach Gähwiler (Gähwiler, Capogna et al. 1997).

2.1.2 Organotypische Rückenmarks-Zellkulturen mit Muskel-Co-Kulturen

Die Präparation organotypischer Rückenmarks-Zellkulturen mit Muskel-Co-Kulturen erfolgte analog der Herstellung von organotypischen Kulturen ohne Entfernen der skelettalen Muskelanteile und der Dorsalganglien, wie bei Drexler, Seeger et al. (2011) beschrieben. Beim Auftragen der Schnitte in Plasmakoagulat (13 μ l Hühnerplasma und 13 μ l Thrombin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde darauf geachtet, dass die Muskelzellen nahe beim Rückenmarksschnitt lagen.

Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie oben genannt nach Braschler, Iannone et al. (1989). Nach einer Woche Kultivierungszeit konnten bei 60 – 80 % der Kulturen Kontraktionen der Muskelfasern festgestellt werden. Die Messung erfolgte nach 14 Tagen. Bis zu diesem Zeitpunkt haben die Kulturen den Reifungsprozess durchlaufen (Spenger, Braschler et al. 1991, Streit, Spenger et al. 1991, Avossa, Rosato-Siri et al. 2003, Zoccolan, FURLAN et al. 2004).

2.2 Herstellung der Testlösungen

Für die Herstellung der Testsubstanzen wurde als Trägersubstanz mit 95 %-igen O_2 und 5 %-igem CO_2 begaster künstlichen Liquor (artificial cerebrospinal fluid; ACSF) verwendet.

Durch Lösen von 1,59 μ g reinem Allopregnanolone (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in Pulverform in 5 ml des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde eine einmolare Stammlösung von Allopregnanolone hergestellt. Damit wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von Allopregnanolone erzeugt: 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M und 2 μ M.

Tabelle 3 Zusammensetzung ACSF

Verbindung	Menge in nM
NaCl	120
KCl	3,3
NaH ₂ PO ₄	1,13
NaHCO ₃	26
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,0
Glucose	11

Alle Chemikalien von Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Das intravenöse Allgemeinanästhetikum Propofol (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) wurde in den Konzentrationen von 1 μM und 5 μM verwendet. Dabei lag Propofol in Form einer Lipuro-Suspension vor, welche bei Raumtemperatur gelagert wurde. Für eine zweimolare Lösung wurden 7,43 μl der Suspension und 200 ml begaste ACSF benötigt.

Das nicht depolarisierende Muskelrelaxans Pancuronium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) ist ein kompetitiver Agonist am Acetylcholin-Rezeptor der motorischen Endplatte und führt zu einer schlaffen Lähmung der willkürlich bewegbaren Muskulatur. Es wurde in Aqua destillata gelöst und in der Konzentration von 1 μM verwendet.

Für die Whole-cell Voltage-clamp-Experimente wurden zur Blockade von glutamatergen Strömen 40 μM des NMDA-Rezeptor-Antagonisten 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (AP5) und 15 μM des AMPA-Rezeptor-Antagonisten 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) (beide Tocris, Minneapolis, MN, USA) verwendet. Zur Blockade von glycinergen Strömen erfolgte zusätzlich die Applikation von 1 μM Strychnin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), welches neben GABA zu den wichtigsten hemmenden Neurotransmittern des Rückenmarks gehört.

Zur Untersuchung der tonischen Inhibition wurde Bicuculline (20 μM , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verwendet, ein kompetitiver GABA_A-Rezeptor-Antagonist, welcher die extrasynaptischen Wirkungen der Testsubstanzen am GABA_A-Rezeptor antagonisiert.

Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Netzwerkaktivität auszuschließen, wurden analog der Messungen mit Allopregnanolone Scheinapplikationen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO durchgeführt.

Die Substanzen wurden mit Ausnahme von Propofol und DMSO in Kryoröhrchen umgefüllt und im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt und vor Verwendung aufgetaut.

2.3 Extrazellulärmessungen

Extrazellulärmessungen wurden zur Registrierung der Multi-Unit-Aktivität der Neurone des Rückenmarks angewendet. Hierbei wurde mit einer Messelektrode in der Regel die Aktionspotentialaktivität von drei bis zehn einzelnen Neuronen erfasst, worauf aufgrund der in einer Ableitung erfassten unterschiedlichen Signalformen der Aktionspotentiale geschlossen werden konnte. Die Elektroden wurden im Vorderhorn des Rückenmarkes in Lamina VIII positioniert (siehe Abb. 8). Sie haben somit die Aktivität von spinalen Interneurone erfasst, die in dieser Region lokalisiert sind. Hierbei konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich um exzitatorische oder inhibitorische Interneurone handelte (Zeilhofer, Wildner et al. 2012). Die untersuchten Interneurone unterscheiden sich morphologisch von α -Motoneuronen, da sie deutlich kleinere Zellkörper besitzen. Die größeren Motoneurone waren zudem ausschließlich am äußeren Rand der Gewebekultur zu finden. Verwendet wurden die organotypischen Kulturen ab dem 14. bis maximal zum 40. Kultivierungstag.

2.3.1 Durchführung

Es wurde an zwei unterschiedlichen Apparaturen gemessen, die mit jeweils einem inversen (Axiovert 135 M; Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland) oder einem aufrechten Mikroskop (Axioskop 2; Carl Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland) ausgestattet waren. Die Messapparaturen bestanden aus einer Badkammer mit einem Metallrahmen und Glasboden. Über ein Digitalthermometer (Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland) wurde die Temperatur konstant zwischen 34 bis 36 °C gehalten. Eine Referenzelektrode Ag/AgCl 2 x 4 mm (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) wurde in die Flüssigkeit der Badkammer getaucht.

Die Messelektroden wurden aus Borosilikatkapillaren (OD 1,0 mm, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) hergestellt, die mit einem Horizontalpuller (DMZ-Universal, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Deutschland) zu einem Spitzendurchmesser von 1 – 2 µm gezogen wurden. Die Elektroden wurden mit Hilfe einer auf einer Einmalspritze gesteckten Microfile-Kanüle (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit ACSF gefüllt. Die eingespannten Elektroden wiesen einen ohmschen Widerstand von 2 – 5 µΩ auf.

Die spinalen Schnitte wurden mit Deckglas in die Badkammer gelegt und fixiert. Während des gesamten Experiments wurde die Kultur mit ACSF umspült, die vorher für mindestens 30 min mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast wurde. Für den Zu- und Abfluss sorgten zwei IPC-Peristaltikpumpen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit einer Durchflussrate von 1 ml/min. Mit dem Mikroskop wurden zunächst in fünffacher Vergrößerung die Vorderhörner des Rückenmarks aufgesucht. Zur Orientierung diente neben dem Zentralkanal, die Form und die Pigmentierung.

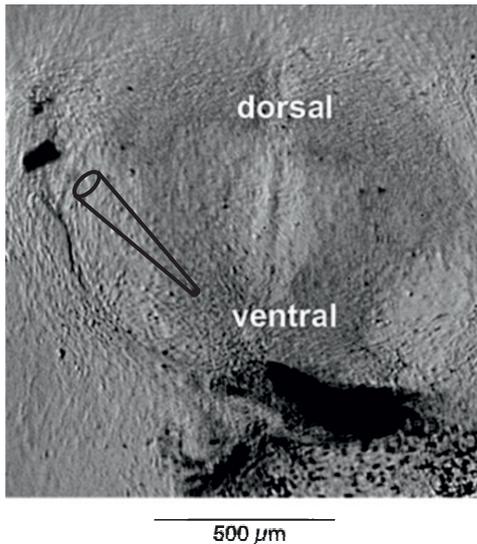


Abbildung 8 Lokalisation der Spitze einer schematisch dargestellten Messelektrode innerhalb einer organotypischen Gewebekultur des Rückenmarks. Die Signale wurden im Bereich des ventralen Horns auf Höhe der Lamina VIII registriert. Dies gilt sowohl für die extrazellulären wie auch die intrazellulären Ableitungen.

Zwei Elektroden wurden vorsichtig jeweils in Höhe des Vorderhorns platziert und in das Gewebe vorgeschoben, bis sich deutliche Spikes mit einer Mindestamplitude von 0,1 mV optisch und akustisch vom Grundrauschen abgrenzen ließen. Die Signale wurden mit einer analog-digitalen Wandlerkarte Digidata 1200 AD/DA digitalisiert und mit AxoScope 9.0.1 (beide Molecular Devices, San Jose, USA) aufgezeichnet und auf der Festplatte des Messrechners gesichert.

2.3.2 Versuchsprotokolle

Extrazellulärableitungen wurden sowohl zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Netzwerkaktivität als auch zur Untersuchung der Wirkung von Allopregnanolone unter Koapplikation von Propofol untersucht. Daneben wurden Scheinapplikationen (Sham) mit dem Lösungsmittel DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen analog der Allopregnanolone-Konzentrationen durchgeführt.

Nach einer Einwasch-Zeit mit ACSF von mindestens 30 min, die zur Adaption der Kulturen an die ACSF diente, konnte die erste Kontrollmessung über 6 min gestartet werden. Vorher musste darauf geachtet werden, dass die Amplitude der Aktionspotentiale für mindestens 5 min stabil war. Im Anschluss erfolgte die Applikation der Testsubstanzen durch das Umhängen der Teflon-Schläuche der IPC-Persiltikpumpe. Pro Versuch wurden jeweils zwei Konzentrationen von Allopregnanolone bzw. Propofol verwendet, die sich am wenigsten unterschieden, wobei jeweils die niedrigere zuerst appliziert wurde. Bereits nach 2 min war das Medium in der Badkammer komplett ausgetauscht. Nach 12 min Einwaschzeit erfolgte die zweite Messung. Nach weiterem Umhängen der Teflon-Schläuche zur Applikation der jeweils höheren Konzentration der Substanz wurde die dritte Messung gestartet. Der Versuch endete nach einer zwölfminütigen Auswaschzeit mit einer weiteren sechsminütigen Messung. Abbildung 9 zeigt den Versuchsablauf.

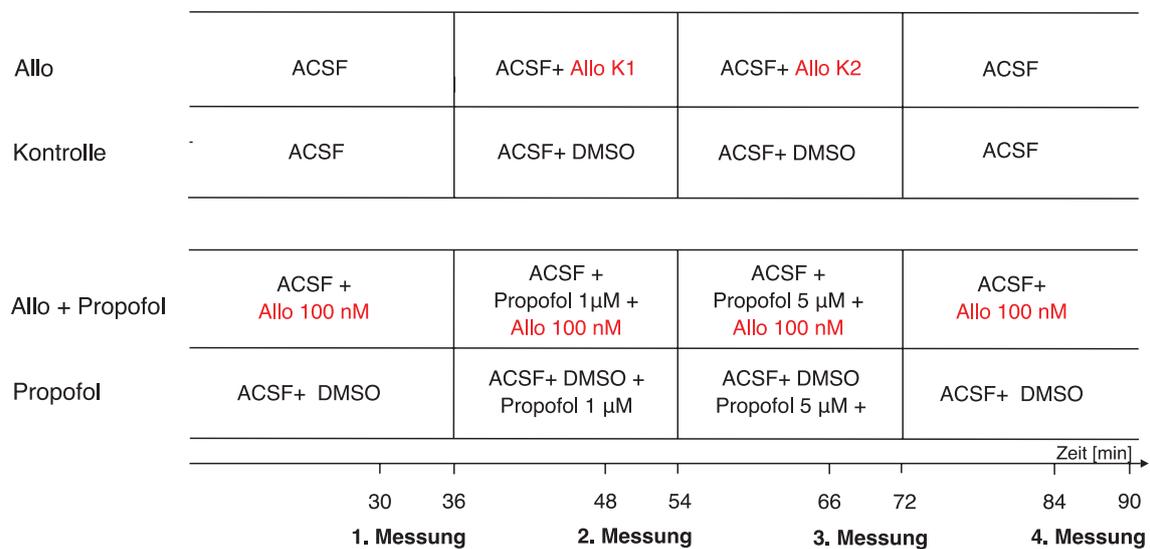


Abbildung 9 Darstellung des Versuchsablaufs der Extrazellulärmessungen. Pro Experiment wurden jeweils zwei Konzentrationen (K1 und K2) von Allopregnanolone (Allo) verwendet: 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 2 µM. Propofol wurde in den Konzentrationen von 1 µM und 5 µM verwendet. Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf an.

2.3.3 Auswertung

Zunächst wurden die Rohsignale durch einen Hochpassfilter (>300 Hz) gefiltert, um Aktionspotentiale besser darstellen zu können. Dann wurde manuell eine Schwelle gezogen, um die Aktionspotentiale vom neuronalen Grundrauschen zu separieren. Impulse oberhalb dieser gesetzten Schwelle gingen als Aktionspotentiale in die weitere Auswertung ein.



Abbildung 10 Beispiel einer Originalspur der Extrazellulärmessung. Nach Filterung können die Aktionspotentiale (senkrechte Linien) gut dargestellt werden. Die x-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf an, die y-Achse die Höhe der Aktionspotentiale. Die rot gestrichelte Linie zeigt die manuell gesetzte Schwelle, um Aktionspotentiale vom Grundrauschen abzugrenzen.

Generell wurden Experimente nur in die weitere statistische Auswertung übernommen, wenn die Grundaktivität 9000 Hz nicht überstieg, sich weder das Grundsignal noch die Feldpotentiale veränderten und keine sonstigen Störungen vorlagen. Der Auswasch wurde statistisch nicht ausgewertet und nur zur optischen Qualitätskontrolle herangezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Matlab Version 7.5 (The MathWorks Inc, Natick, USA). Die Abbildungen wurden mit dem Computerprogramm Origin Pro Version 7 SR 1 (Origin LAB Corporation, Nothampton, USA) erstellt und mit Coral Draw X 5 und X 12 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) weiterbearbeitet.

2.4 Intrazellulärmessungen

Durch die Whole-cell Voltage-clamp-Methode werden Ströme dargestellt und gemessen, die durch einzelne Ionenkanäle der Zellmembran gerichtet sind. Durch die Erzeugung eines Kompensationsstroms, der der Größe des Stroms entspricht, der durch die Membran fließt, und diesem entgegengesetzt ist, wird eine Änderung des Membranpotentials verhindert. Dies gibt Aufschluss über die Leitfähigkeit der Membran, die durch Ionenkanäle und Ionentransporter festgelegt wird.

2.4.1 Durchführung

Durch einen Laser Puller (P 2000, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) wurden Glaspipetten aus Borosilikatglas (Typ: TW150-3) (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) geformt, die an der Spitze einen Widerstand von 1,1 – 2,7 M Ω aufwiesen. Die Glaspipetten wurden mit Elektrodenmedium (Cs-Pipettenlösung nach Puia) luftblasenfrei gefüllt, die folgende Inhaltsstoffe aufwies (in mM): CsCl 141, CsOH 24, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 10, ATP 4, pH 7.2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland).

Die Pipette wurde auf einen Elektrodenhalter (ISO-S-1.5G micro electrode holder, Firma g23instruments.com, London, GB) gesteckt, der mit einem Vorverstärker (Multiclamp 700A, Molecular Devices, San Jose, USA) verbunden war. Eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) tauchte in die Badlösung und schloss den Stromkreis.

Der Rückenmarksschnitt wurde nebst Deckglas bei Raumtemperatur in die Badkammer gelegt, fixiert, und mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begaster ACSF, 40 μ M AP 5, 15 μ M CNQX und 1 μ M Strychnin umspült. Durch ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Germany) mit Phasenkontrastkondensator wurden durch 40-fache Vergrößerung die spinalen Interneurone in Lamina VIII des Vorderhorns aufgesucht, die vor allem durch ihre typische polygonale bis rundliche Form zu

erkennen waren (Zeilhofer, Wildner et al. 2012). Durch die Lage, Form und Größe konnten sie gut von α -Motoneurone unterschieden werden.

Unter Überdruck wurde die Pipette in die Badlösung getaucht und nahe der Zelle positioniert. Dabei wurde das Nullpotential festgelegt. Der Überdruck wurde auf ein Minimum reduziert und mit Hilfe eines Mikropositionierers die Pipette an die Zelloberfläche angesetzt. Zeigte sich auf der Zelle der charakteristische Lichtreflex, der durch eine leichte Eindellung der Membran durch die aus der Pipette strömende Flüssigkeit entstand, konnte die Zellmembran durch langsames Erzeugen von Unterdruck angesaugt werden. Es entstand ein sehr hoher elektrischer Widerstand im Gigaohm-Bereich, sodass kein elektrischer Strom mehr messbar war. Der sog. „Gigaseal“ vermindert das Hintergrund-Rauschen und verhindert eine Diffusion von Flüssigkeit aus dem Zellinneren in die Badlösung. Das Präparat befand sich in der „Cell-attached“-Konfiguration und der Verstärker (MultiClamp 700 A, Molecular Device, CA, USA) wurde auf den „Voltage-clamp“-Modus umgestellt. Ausgehend von dieser Konfiguration konnte die „Whole-cell“-Konfiguration erreicht werden, indem durch ruckartige Erhöhung des Unterdrucks die Zellmembran unter der Pipette aufgerissen wurde. Dabei entstand ein direkter Zugang zum Cytosol.

Das Membranpotential wurde bei -70 mV gehalten, um IPSCs aufzuzeichnen. Eine Aufnahme erfolgte nur, wenn der initiale Serienwiderstand 20 M Ω nicht überstieg und sich während des Experiments um nicht mehr als 40 % änderte. Die Aufzeichnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines MultiClamp 700 A-Verstärkers Digidata 1440 A und der Clampex 10.4 Software (alle Molecular Devices, San Jose, USA).

2.4.2 Versuchsprotokoll

Neben der begasten ACSF wurde dem Extrazellulärmedium zur Blockade von glutamatergen und glycinergen Strömen CNQX, AP 5 und Strychnin hinzugefügt. Nach einer dreiminütigen Aufzeichnung erfolgte der zwölfminütige Einwasch von

Allopregnanolone. Im Anschluss erfolgte die zweite Messung, bevor Bicuculline, ein kompetitiver GABA_A-Rezeptor Antagonist, hinzugegeben wurde. Die Messungen wurden so lange durchgeführt, bis Bicuculline die vollständige Wirkung entfacht hatte, was an einer isoelektrischen Linie zu sehen war. Damit konnten die Auswirkungen auf die extrasynaptische Signalübertragung in Form von tonischen Strömen untersucht werden. Ebenso wurde mit den Kontrollmessungen verfahren. Insgesamt wurde Allopregnanolone in den Konzentration 50, 100 und 250 nM verwendet.

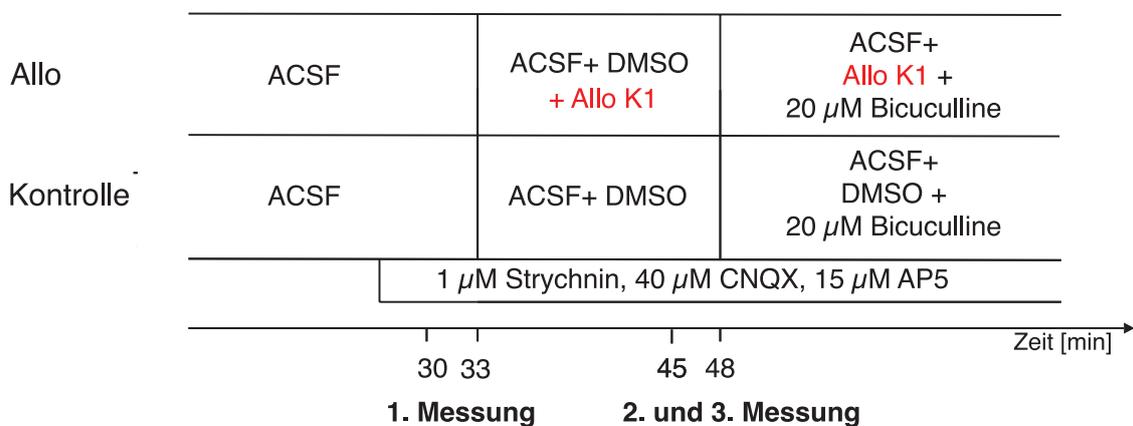


Abbildung 11 Darstellung des Versuchsablaufs für Intrazellulärmessungen. Beide Zeilen stellen je ein Experiment dar. Die x-Achse spiegelt den zeitlichen Verlauf wider. Nach 12 min Einwaschzeit mit einer Konzentration (K) von Allopregnanolone erfolgte jeweils die 1. Messung. Vor der 1. Messung erfolgt die Zugabe von Strychnin, CNQX und AP 5. Direkt nach der 2. Messung erfolgte mit der Applikation von Bicuculline die 3. Messung, bis eine isoelektrische Linie zu sehen war.

2.4.3 Auswertung

Für die Auswertung der Intrazellulärmessungen wurde ein laborintern geschriebenes Programm in Matlab 7.5 verwendet. Hierfür wurden die IPSCs isoliert sowie die Häufigkeiten, Amplituden, Abkling- und Anstiegszeiten bestimmt. Zunächst wurden die inhibitorischen postsynaptischen Ströme durch einen Boxcar-Filter von 0,5-1,0 ms Länge gefiltert. Hierbei wurde der bekannte Algorithmus nach Banks, White et al. (2000) verwendet, bei welchem zwei Fenster, ein „Peak“-Fenster sowie ein „Baseline“-Fenster, über die Daten bewegt

wurden. Es wurde der Mittelwert der Daten innerhalb der Fenster zu jedem Zeitpunkt bestimmt und die Baseline vom Peak subtrahiert. Durch diese Pseudodifferenzierung wurden IPSCs mit sowohl langsameren Abklingzeiten sowie Veränderungen der Baseline ähnlich einem Hochpassfilter eliminiert und die steile Anstiegsphase der IPSCs isoliert. Durch einen manuell gesetzten Schwellenwert wurden IPSCs definiert. Durch Ausschneiden der IPSCs und Filtern durch einen Savitzky-Golay-Filter konnte das Rauschen eliminiert werden. Für jedes ausgeschnittene IPSC wurde die Baseline berechnet und von der Wellenform subtrahiert. Ebenso wurde die Spitzenamplitude sowie die Anstiegszeit berechnet.

Für die weiteren Analysen wurden ungefilterte IPSCs verwendet. Jedes IPSC, welches nicht durch ein weiteres IPSC unterbrochen wurde und mindestens 8-10 ms lang war, wurde auf die Länge der Abklingphase untersucht. Hierfür wurden die IPSCs doppelt exponentiell gefittet. Wenn der Qualitätsparameter R^2 einen Schwellenwert von 0,3-0,6 überschritt, wurde die Abklingzeit des IPSCs extrapoliert. Die extrapolierte Stromspur wurde zu einem Template-Array hinzugefügt, das „Ipredict“ benannt wurde. Von jedem folgenden IPSC wurden Ausschnitte des „Ipredict“ subtrahiert. Der R^2 -Qualitätsparameter hängt von dem Verhältnis der IPSC-Amplitude zur Amplitude des Hintergrundrauschens ab. Als weiteres Qualitätskriterium wurde der „msenc“ verwendet, ein Maß für den Anpassungsfehler, welcher berechnet wurde, indem die mittlere quadratische Abweichung des Hintergrundrauschens von der mittleren quadratischen Abweichung der Anpassung der Daten subtrahiert und durch die Amplitude des IPSCs geteilt wurde. Durch dieses Verfahren konnte die Abklingzeit, die Frequenz, die Amplitude sowie der phasische Strom berechnet werden.

Da in dem oben beschriebenen Verfahren sehr viele IPSC nicht ausgewertet wurden, da sie die Qualitätskriterien nicht erfüllten, wurde zur Berechnung des synaptischen Gesamtstroms eine Methode nach Glykys and Mody (2007) verwendet. Hier wurden die Aufzeichnungen ebenfalls durch einen Savitzky-Golay-Filter gefiltert, in 4 s-Teile unterteilt und je in einem All-in Point-Histogramm

dargestellt. Nach Anpassung der Gauß-Kurve wurde der entsprechende x-Achsen-Wert als Baseline verwendet und subtrahiert. Daraus ergibt sich die Gesamtladung, welche berechnet wurde, indem das Integral der entstandenen Kurve durch ihre Dauer geteilt wurde. Im Anschluss wurden die Werte gemittelt.

Zudem wurden nach der Methode nach Glykys and Mody (2007) die tonische Inhibition ausgewertet. Es wurden All-Point-Histogramme erstellt, durch den Savitzky-Golay-Algorithmus geglättet und der mittlere Haltestrom berechnet. Genauso wurde nach der Applikation von Bicuculline verfahren. Den tonischen Strom konnten wir berechnen, indem wir den in Anwesenheit von Bicuculline aufgezeichneten Grundlinienstrom subtrahierten.

2.5 Videomikroskopie

Die Messungen wurden an dem oben genannten Messplatz durchgeführt, der mit einer an einem inversen Mikroskop befestigter Videokamera ausgestattet war. Die Kamera (DMK21AU04, The Imaging Source, Bremen, Deutschland) war via USB mit einem Laptop verbunden, auf dessen Festplatte die Aufnahmen in einem „avi“-Format gespeichert wurden.

Nachdem die Rückenmarkskultur mit Muskel-Co-Kultur in die Badkammer gelegt worden war, wurden bei 320-facher Vergrößerung Muskelfasern herausgesucht, die regelmäßige Kontraktionen aufwiesen und Helligkeit und Kontrast optimiert. Bei einer Samplingrate von 30 Bildern pro Minute wurden dreiminütige Videos aufgezeichnet.

2.5.1 Durchführung und Versuchsprotokoll

Dabei glich der Versuchsaufbau dem der Extrazellulärmessungen. Die erste Aufzeichnung wurde nach 30 min durchgeführt. Hiervon wurde die Kultur 18 min

mit begaster ACSF und anschließend 12 min mit 100 nM Allopregnanolone in begaster ACSF umspült. Im Anschluss an den zwölfminütigen Einwasch von Propofol 1 μ M und Allopregnanolone 100 nM erfolgte die zweite dreiminütige Aufzeichnung. Dem weiteren zwölfminütigen Einwasch von Propofol 5 μ M und Allopregnanolone 100 nM folgte die dritte Aufzeichnung. Nach der Zugabe des Muskelrelaxans Pancuronium in der Konzentration von 1 μ M wurde das vierte Video aufgenommen, das als Kontrolle diente.

Allo + Propofol	ACSF + Allo 100 nM	ACSF + Propofol 1 μ M + Allo 100 nM	ACSF + Propofol 5 μ M + Allo 100 nM	ACSF + Propofol 5 μ M + Allo 100 nM + Pancuronium 1 μ M
	ACSF+ DMSO	ACSF + Propofol 1 μ M + DMSO	ACSF + Propofol 5 μ M + DMSO	ACSF + Propofol 5 μ M + DMSO + Pancuronium 1 μ M

Zeit [min]			
30 33	45 48	60 63	75 78
1. Aufnahme	2. Aufnahme	3. Aufnahme	4. Aufnahme

Abbildung 12 Darstellung des Versuchsablaufs der Videomikroskopie. Analog der Extrazellulärmessungen wurden dreiminütige Videoaufnahmen durchgeführt. Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf wieder. Als letzter Schritt erfolgte die Applikation von Pancuronium.

2.5.2 Auswertung

Muskelkontraktionen in Nerven-Muskel-Co-Kulturen werden durch Acetylcholin-freisetzende Motoneurone kontrolliert, die in Muskelfasern projizieren (Magloire and Streit 2009). Die Muskelaktivität wurde offline mit einer Hewlett Packard Z800 Video-Workstation (Picturetools, Hamburg, Deutschland) quantifiziert. Zunächst wurde durch den Avidemux-Player im Einzelbildmodus ein Bild herausgesucht, das die Muskelfaser im entspannten Zustand darstellte. Im Anschluss erfolgte die Festlegung einer sog. „Region of Interest“ (ROI). Diese sollte einen möglichst kontrastreichen Bereich der Muskelfaser enthalten, der sich bei Kontraktion verschiebt (siehe Abb. 13A). Durch die Kontraktionen änderten sich die

Helligkeitswerte in der ROI, welche mit der Intensität und der Frequenz der Muskelzuckungen korrelierten. Durch einen in der Arbeitsgruppe verfassten Algorithmus in Matlab 7.5 konnten die Helligkeitsverschiebungen graphisch dargestellt werden (Abb. 13B). Nachdem manuell eine Schwelle gezogen wurde, konnte im Anschluss die Anzahl der Kontraktionen mittels eines in Matlab geschriebenen Programmes bestimmt werden. Der Schwellenwert wurde so gesetzt, dass eine Helligkeitsänderung von 50% den Übergang der Muskelfasern vom entspannten zum kontrahierten Zustand zeigt.

Es wurden nur Präparate verwendet, die eine mittlere Frequenz der Muskelkontraktionen von mindestens 0,1 Hz aufwiesen. Zudem sollte eine Verschiebung der Schwelle zur Erkennung der Muskelkontraktionen keinen Einfluss auf die Anzahl der Ereignisse haben. Langanhaltende Muskelkontraktionen unter Kontrollbedingungen, welche durch Übererregung verursacht wurden, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Als letztes Kriterium wurden nur Schnitte ausgewertet, welche empfindlich auf das nicht-depolarisierende Muskelrelaxans Pancuronium reagierten. Die Häufigkeit der Muskelkontraktionen wurde in der Arbeit als Korrelat der Aktionspotentialaktivität der spinalen Motoneurone interpretiert. Durch retrograde axonale Färbung konnten Acetylcholinesterase-positive Neurone markiert werden, welche typische morphologische Eigenschaften von Motoneuronen aufwiesen und am ventralen Rand von spinalen Gewebeschnitten lokalisiert waren (Spenger, Braschler et al. 1991). Pancuronium wurde am Ende appliziert, um sicherzustellen, dass die Muskelkontraktionen durch cholinerge neuromuskuläre Übertragung initiiert wurden. Pancuronium wiederum unterdrückte synaptisch vermittelte Kontraktionen des Zwerchfells, jedoch keine elektrisch induzierten Kontraktionen (Seeger, Worek et al. 2007).

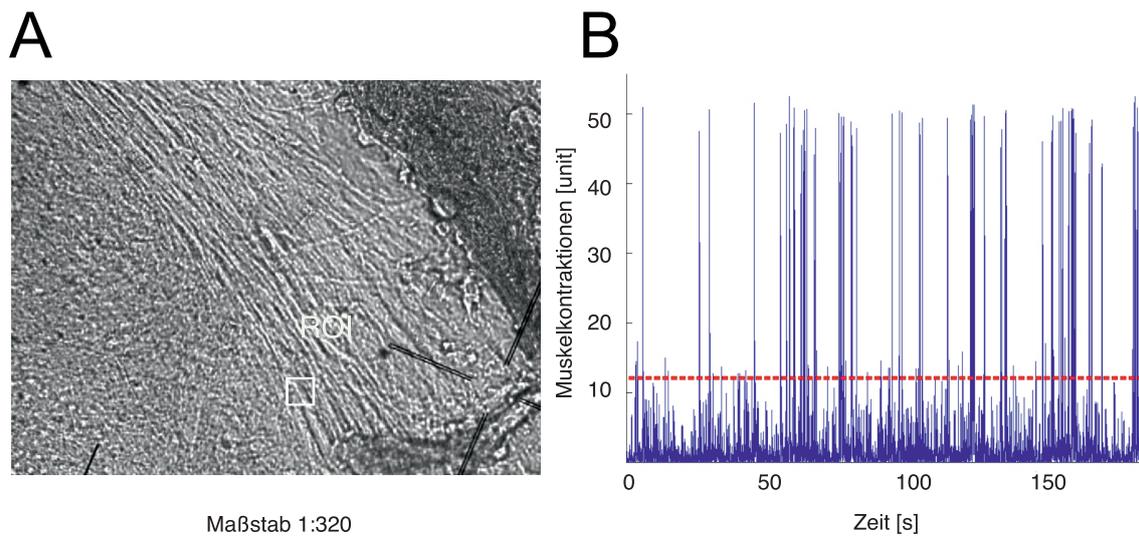


Abbildung 13 Darstellung einer Muskelfaser in spinalen Nerv-Muskel-Co-Kulturen. (A) zeigt eine Muskelfaser in der Vergrößerung von 1:320. Das Quadrat zeigt die ROI. Helligkeitsunterschiede wurden wie in **(B)** aufgezeichnet. Dabei gibt die x-Achse den zeitlichen Verlauf in Sekunden wieder, die y-Achse die Stärke der Helligkeitsunterschiede in Units. Für die Auswertung wurde manuell eine Schwelle (rote gestrichelte Linie) gezogen.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Matlab 7.5. Zur Prüfung der Normalverteilung der Daten wurde der Lilliefors-Test durchgeführt. Normalverteilte Daten wurden mit Mittelwert +/- Standardabweichung oder mit Mittelwert und 95 %-Konfidenzintervall dargestellt. Als statistisches Verfahren diente der Student's t-Test. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurden sie in Box-Whisker-Plots mit den entsprechenden Medianen und 95 %-Konfidenzintervallen dargestellt. Für diese Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 gewertet.

Im Falle von normalverteilten Daten wurden die 95%-Konfidenzgrenzen ($KI_{95\text{oben}}$ und $KI_{95\text{unten}}$) wie folgt ermittelt:

$$KI_{95oben} = x_{mittelwert} + z \cdot \frac{x_{standardabweichung}}{\sqrt{(n-1)}}$$

$$KI_{95unten} = x_{mittelwert} - z \cdot \frac{x_{standardabweichung}}{\sqrt{(n-1)}}$$

$x_{mittelwert}$ = Mittelwert der Stichprobe

$z=1.96$

Im Falle von nicht normalverteilten Stichproben wurden die Messwerte der Stichprobe zunächst nach ihrer Größe geordnet, wobei k den Index der Rangfolge innerhalb dieser nach der Größe geordneten Zahlenreihe darstellt. Hiernach ist für den kleinsten Messwert $k=1$ und den größten $k=n$ =Stichprobenumfang. Für die Angabe der Konfidenzintervalle wurde folgender Wert für k berechnet:

$$k = \frac{1}{2} \cdot (n - 1 - z \cdot \sqrt{n})$$

mit $z=1.96$ für das 95% Konfidenzintervall. Nach Rundung des so ermittelten Wertes für k auf eine ganze Zahl wurde die untere Intervallgrenze als der k -te Wert und die obere Intervallgrenze als der $(n-k+1)$ -te Wert der geordneten Rangfolge der Messwerte bestimmt.

Die Konzentrationswirkungskurve wurde mit einer Hillfunktion gefittet, wie von Antkowiak and Helfrich-Forster (1998) beschrieben. Der EC_{50} -Wert wurde der mit der folgenden Gleichung angepassten Ausgleichskurve entnommen.

$$result\ hill\ function(x) = \frac{v_{max} * x^n}{k^n + x^n}$$

v_{max} = maximaler Effekt bei unendlich hoher Konzentration

x = Konzentration

n = Hill-Koeffizient

k = EC_{50} -Wert

3 Ergebnisse

In dieser Studie wurden insgesamt 515 Experimente an organotypischen Gewebeschnitten des Rückenmarks von embryonalen C57/BL6-Mäusen durchgeführt. Durch Whole-cell Voltage-clamp-Ableitungen konnten GABA_A-Rezeptoren vermittelte Ströme an 32 organotypischen Kulturen gemessen werden. Insgesamt 483 organotypische Kulturen wurden für Extrazellulär- und die videomikroskopischen Messungen verwendet. Um Auswirkungen der Lösungsmittel zu untersuchen, wurden zu jedem Versuch Scheinapplikationen durchgeführt. Berücksichtigt wurden die Kulturen nach ca. zwei Wochen Kultivierungszeit bis maximal fünf Wochen, da während dieses Zeitraums die Spontanaktivität der Neurone unverändert blieb (Grasshoff and Antkowiak 2004).

3.1 Wirkung von Allopregnanolone auf die tonische GABAerge Inhibition

In der ersten Versuchsreihe untersuchten wir die Wirkung von Allopregnanolone auf extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren im ventralen Horn des Rückenmarks. Die Daten wurden bereits publiziert (Drexler, Grenz et al. 2020). Dabei wurden neben der Applikation des Neurosteroids Allopregnanolone in den Konzentrationen von 50, 100, und 250 nM auch Scheinapplikationen mit dem Lösungsmittel DMSO durchgeführt. Aufgezeichnet wurden jeweils Messintervalle von drei Minuten. Die Zellen wurden auf einem Spannungspotential von -70 mV gehalten. Zur Unterdrückung von glutamatergen und glycinergen Strömen wurden AP 5, CNQX und Strychnin dem Perfusat zugegeben.

Nach der Applikation von Allopregnanolone erfolgte die Zugabe von Bicuculline, einem spezifischen GABA_A-Rezeptor-Antagonisten. Neben der Blockade von synaptischen Strömen bewirkte dies bei Allopregnanolone eine Verschiebung des Haltestroms, der sich in einem „Shift“ der Baseline widerspiegelte. Anhand der Darstellung der Stromkurven in All-Point-Histogrammen, konnte der durch

Allopregnanone erzeugte tonische Strom abgelesen werden. Hierfür wurde die Differenz der Baseline vor und nach der Applikation von Bicuculline berechnet. Die folgende Abbildung 14 zeigt eine beispielhafte Whole-cell Voltage-clamp-Ableitung im Rückenmark vor und nach der Applikation von Bicuculline sowie die zugehörigen All-Point-Histogramme. Die geringere Standardabweichung resultierte aus der Blockade der phasischen Ströme durch Bicuculline.

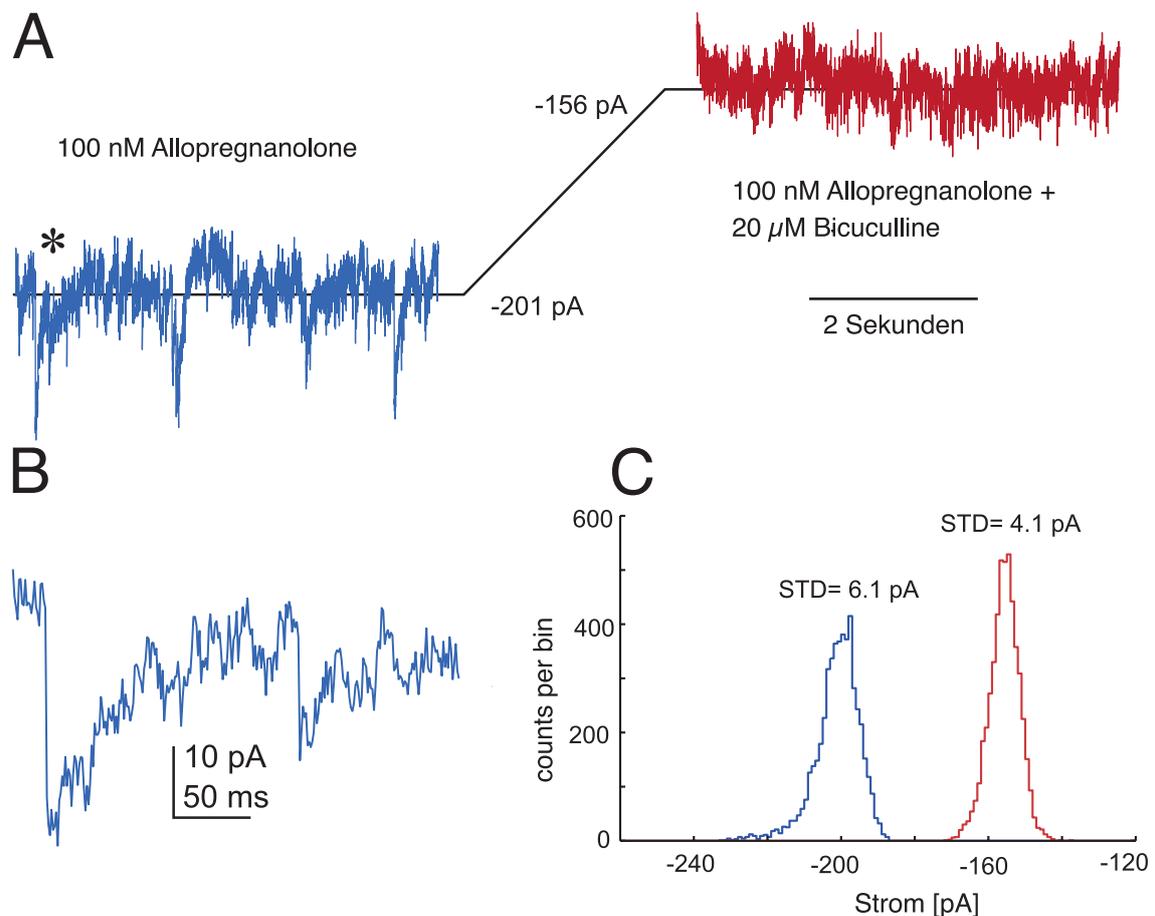


Abbildung 14 Wirkung von Allopregnanone (100 nM) auf extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren im ventralen Horn des Rückenmarks. (A) Exemplarische Darstellung einer Whole-cell Voltage-clamp-Ableitung von spinalen Interneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks nach der Applikation von 100 nM Allopregnanone. Das Membranpotential betrug -70 mV. Glutamaterge und glycinerge Ströme wurden durch spezifische Antagonisten geblockt. Nach der Zugabe von 20 µM Bicuculline sistierten die IPSCs. Zudem kam es zu einer Verschiebung der Baseline von -201 pA auf -156 pA. **(B)** zeigt das in (A) mit * markierte synaptische Ereignis vergrößert. **(C)** Darstellung des „Shifts“ der Baseline der Aufnahme (A) in einem All-Point Histogramm, als „counts per bin“. Durch die Blockade der synaptischen Ströme war die Standardabweichung (STD) geringer. Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Insgesamt bewirkte Allopregnanolone im ventralen Horn des Rückenmarks eine tonische Inhibition, welche in den Konzentrationen von 100 nM und 250 nM gegenüber von 50 nM statistische Signifikanz erreichte. In Abbildung 15 A sind die tonischen Ströme zusammenfassend dargestellt, die durch unterschiedliche Konzentrationen von Allopregnanolone verursacht wurden. Die Daten waren normalverteilt (Lilliefors-Test, $p > 0,05$). Die Hypothese, dass die durch 50 nM Allopregnanolone erzeugte tonische Inhibition sich von null unterscheidet, musste verworfen werden ($n = 8$, t-Test, $p = 0,11$). Es wurde bestätigt, dass sich die durch 100 und 250 nM erzeugte tonische Inhibition von 50 nM unterscheidet (t-Test, $p < 0,05$). Dabei ergab sich ein Mittelwert des durch Allopregnanolone induzierten tonischen Stroms von $40,8 \pm 9,8$ pA bei der Konzentration von 100 nM ($n = 9$, $p = 0,003$) bzw. von $49,3 \pm 8,2$ pA bei der Konzentration von 250 nM ($n = 4$, $p = 0,009$). Die Membranleitfähigkeit einzelner Neurone wurde durch die induzierte Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren um ca. 10 % gesteigert (Abb. 15B). Bei Applikation des Lösungsmittels DMSO konnten diese Effekte nicht nachgewiesen werden.

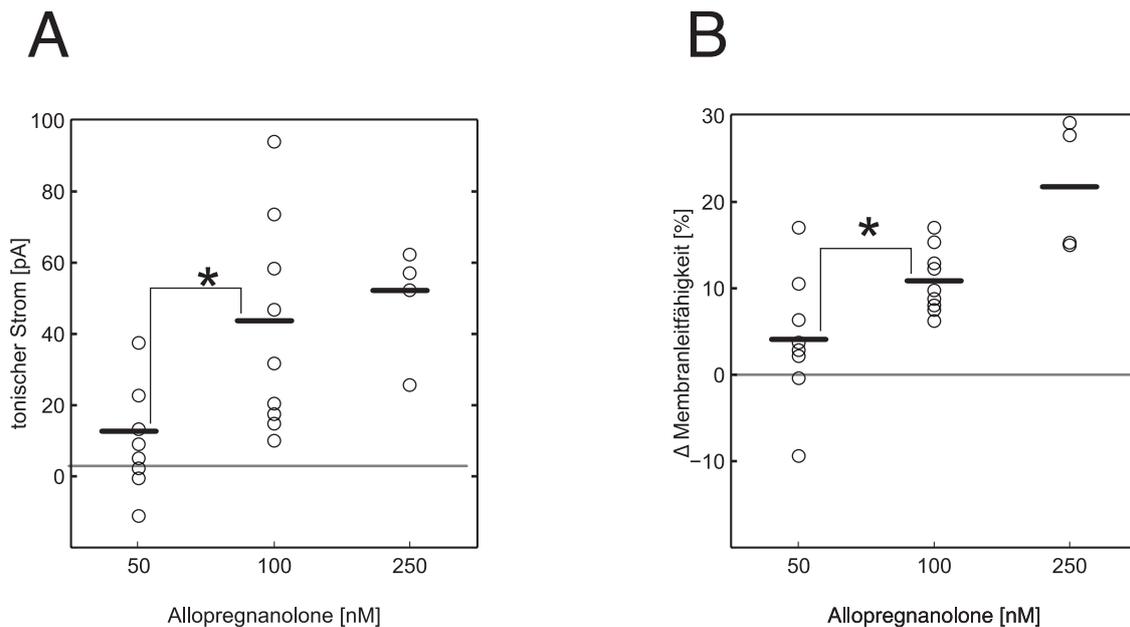


Abbildung 15 Darstellung der induzierten tonischen Ströme durch unterschiedliche Konzentrationen (50, 100, 250 nM) von Allopregnanolone sowie die Änderung der Membranleitfähigkeit. Die waagrechten Linien repräsentieren die Mittelwerte. **(A)** Zusammenfassend induzierte Allopregnanolone einen tonischen Strom: 50 nM: $9,7 \pm 5,3$ pA ($n=8$); 100 nM: $40,8 \pm 9,8$ pA ($n=9$); 250 nM: $49,3 \pm 8,2$ pA ($n=4$). Während bei 50 nM keine statistische Signifikanz erreicht wurde (t-Test, $p=0,11$), wurde in den Konzentrationen von 100 und 250 nM eine tonische Inhibition induziert, welche sich signifikant von 50 nM unterscheidet (t-Test, $p < 0,05$) **(B)** Darstellung der Membranleitfähigkeit durch Allopregnanolone. 100 nM Allopregnanolone bewirkten eine Steigerung von ca. 10 % (t-Test, $p < 0,05$). * = $p < 0,05$. Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

3.2 Wirkung von Allopregnanolone auf die phasische GABAerge Inhibition

Im nächsten Schritt wurde die phasische Inhibition am GABA_A-Rezeptor durch Allopregnanolone analysiert. Die Ergebnisse wurden bereits publiziert (Drexler, Grenz et al. 2020). Dabei wurde die Frequenz der IPSCs, die Abklingzeit, die Amplitude, die pro IPSC übertragene Ladung und der „totale synaptische Strom“ näher betrachtet. Letzterer berechnet sich aus Frequenzen, Zeitkonstanten und Amplituden der IPSCs und spiegelt die mittlere synaptische GABAerge Hemmung wider.

Die folgende Abbildung 16 zeigt die Stromspuren einer Whole-cell Voltage-clamp-Ableitung nach der Applikation von Strychnin, CNQX und AP 5. Die erste Stromspur wurde unter Kontrollbedingungen aufgenommen, die zweite Stromspur wurde unter Kontrollbedingungen aufgenommen, die zweite Stromspur nach der Applikation von 100 nM Allopregnanolone.

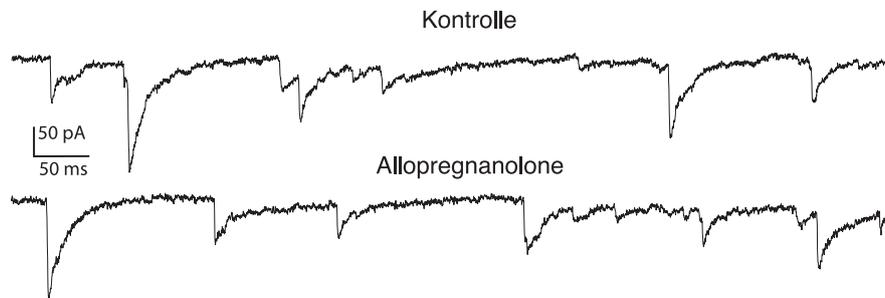


Abbildung 16 Originalspur einer Whole-cell Voltage-clamp Ableitung nach Applikation von Allopregnanolone (100 nM). Repräsentative Beispiele durch GABA_A-Rezeptoren vermittelte synaptische Ströme in Abwesenheit (obere Spur) und Anwesenheit (untere Spur) von Allopregnanolone. Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Die genauere Analyse ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Daten waren normalverteilt (Lilliefors-Test, $p > 0,05$). Wie unter 2.6 beschrieben, erfolgte die Darstellung der Mittelwerte sowie der 95 %-Konfidenzintervalle. Bei der Applikation von 100 nM Allopregnanolone zeigte sich eine geringe signifikante Verlängerung der Abklingzeit von durchschnittlich 25,2 ms auf 31,1 ms, welche doppelt exponentiell, wie in 2.4.3 beschrieben, gefittet wurden (Abb. 17 A: $n = 11$, t-Test, $p = 0,0035$). Allerdings verringerte sich sowohl die Amplitude von 22,3 pA auf 20,57 pA (Abb. 17 B: $n = 9$, t-Test, $p = 0,02$) als auch die Frequenz der IPSC von 9,1 Hz auf 6,1 Hz (Abb. 17 C: $n = 11$, t-Test, $p = 0,0005$). Der Ladungstransfer pro IPSC wurde durch Multiplikation der Abklingzeit mit der Amplitude berechnet und zeigte mit 0,61 pC in Abwesenheit und 0,64 pC in Anwesenheit von Allopregnanolone keinen signifikanten Unterschied (Abb. 17 D: $n = 9$, t-Test, $p = 0,34$), da sich die beschriebenen Teileffekte gegenseitig kompensierten. Dies spiegelte sich auch in der näheren Betrachtung des synaptischen Gesamtstroms wider. Dieser wurde berechnet, indem der Ladungstransfer pro IPSC mit der Frequenz der IPSCs multipliziert wird. Hier ergab sich kein signifikanter Anstieg des synaptischen Gesamtstroms durch Allopregnanolone (Abb. 17 E): 2,5 pC mit 100 nM Allopregnanolone und 2,1 pC ohne Allopregnanolone ($n = 9$, t-Test, $p = 0,42$).

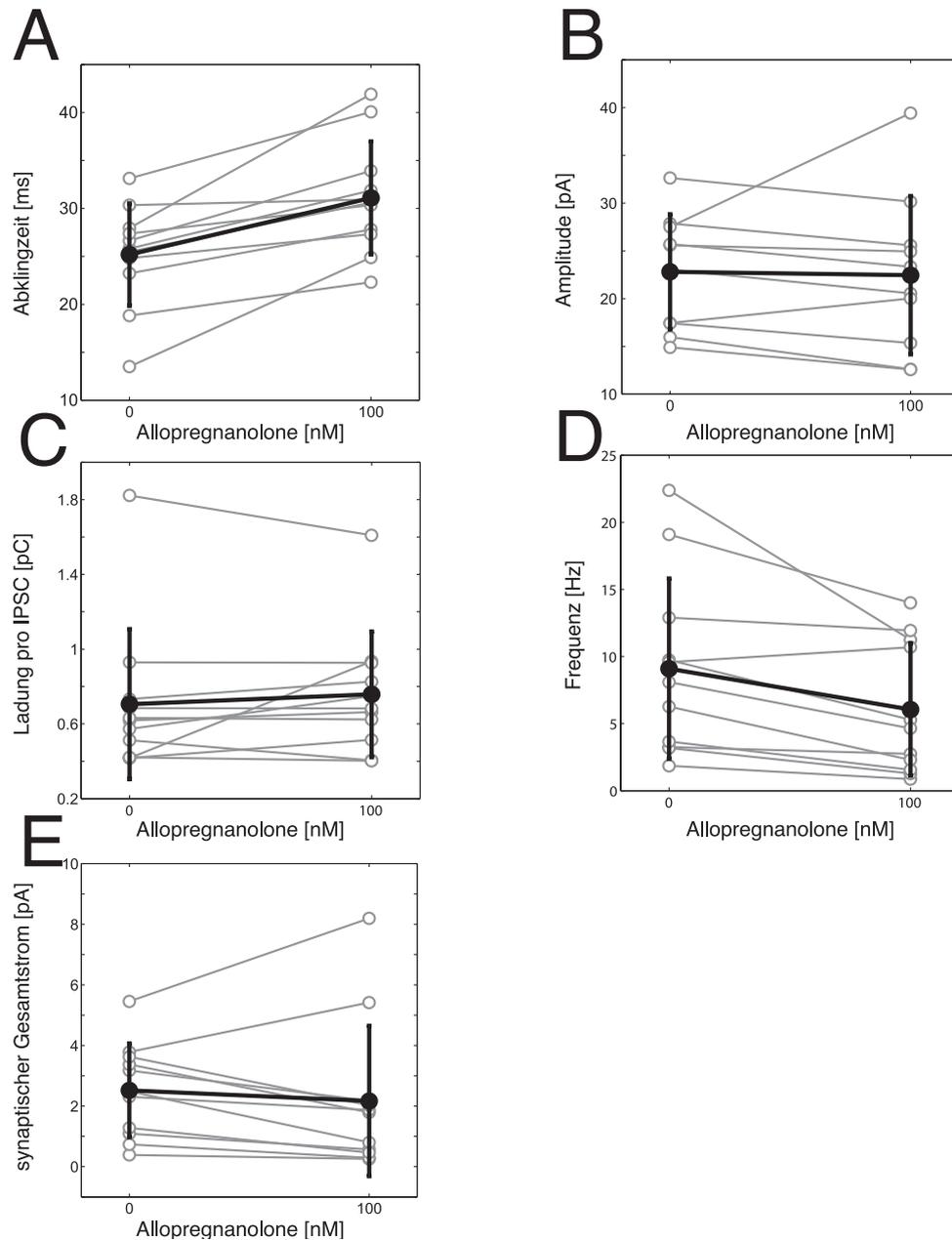


Abbildung 17 Wirkung von Allopregnanolone (100 nM) auf die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelte synaptische Inhibition. Alle Daten stellen den Mittelwert mit dem 95 %-Konfidenzintervall dar. **(A)** Allopregnanolone induzierte einen signifikanten Anstieg der Abklingzeit von 25,2 (22,03; 28,35) ms auf 31,1 (27,6; 34,58) ms ($n = 11$, t-Test, $p = 0,0035$). **(B)** Allopregnanolone reduzierte die Amplitude der IPSCs von 22,3 (18,27; 26,31) pA auf 20,57 (16,58; 24,56) pA ($n = 9$, t-Test, $p = 0,02$). **(C)** Der Ladungstransfer pro IPSC unterschied sich mit 0,61 (0,51; 0,72) pC unter Kontrollbedingungen nicht signifikant von 0,64 (0,53; 0,76) pC nach der Applikation von Allopregnanolone ($n = 9$, t-Test $p = 0,34$). **(D)** Die Frequenz der IPSC wurde durch Allopregnanolone von 9,1 (5,13; 13,07) Hz auf 6,1 (2,13; 8,97) Hz verringert ($n = 9$, t-Test, $p = 0,0005$). **(E)** Zusammenfassend verursachte 100 nM Allopregnanolone keinen signifikanten Anstieg des synaptischen Gesamtstroms: 2,5 (1,61; 3,44) pA ohne Allopregnanolone und 2,1 (0,63; 3,64) pA mit Allopregnanolone ($n = 9$, t-Test, $p = 0,42$). Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Auch in der Abbildung 18 wurden die Mittelwerte und die 95%-Konfidenzintervalle dargestellt. Hier gleicht die Wirkung von 250 nM Allopregnanolone auf die GABAerge phasische Inhibition dem Effekt von 100 nM. Auch in der Konzentration von 250 nM bewirkte Allopregnanolone eine signifikante Verlängerung der Abklingzeit von 20,6 ms auf 24,4 ms (Abb. 18 A: n= 10, t-Test, $p= 0,003$,). Die mittlere Amplitude der IPSCs wurde durch Allopregnanolone nicht beeinflusst (Abb. 18 B: n= 9, t-Test, $p= 0,64$). Auch in dieser Konzentration verursachte es einen Rückgang der Frequenz der IPSCs von 23,8 Hz auf 17,7 Hz (Abb. 18 C: n= 10, t-Test, $p= 0,0075$). Vergleichbar mit den Ergebnissen von 100 nM Allopregnanolone wurde der Ladungstransfer pro IPSC (Abb. 18D n= 9, t-Test $p= 0,4$), sowie der synaptische Gesamtstrom (Abb. 18 E: n= 9, t-Test, $p= 0,1$) durch 250 nM nicht signifikant verändert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Allopregnanolone in den Konzentrationen von 100 nM als auch 250 nM den synaptischen GABAergen Strom modifizierte. Dies hatte durch Kompensation der Teileffekte keinen wesentlichen Einfluss auf eine Zunahme der synaptischen Inhibition.

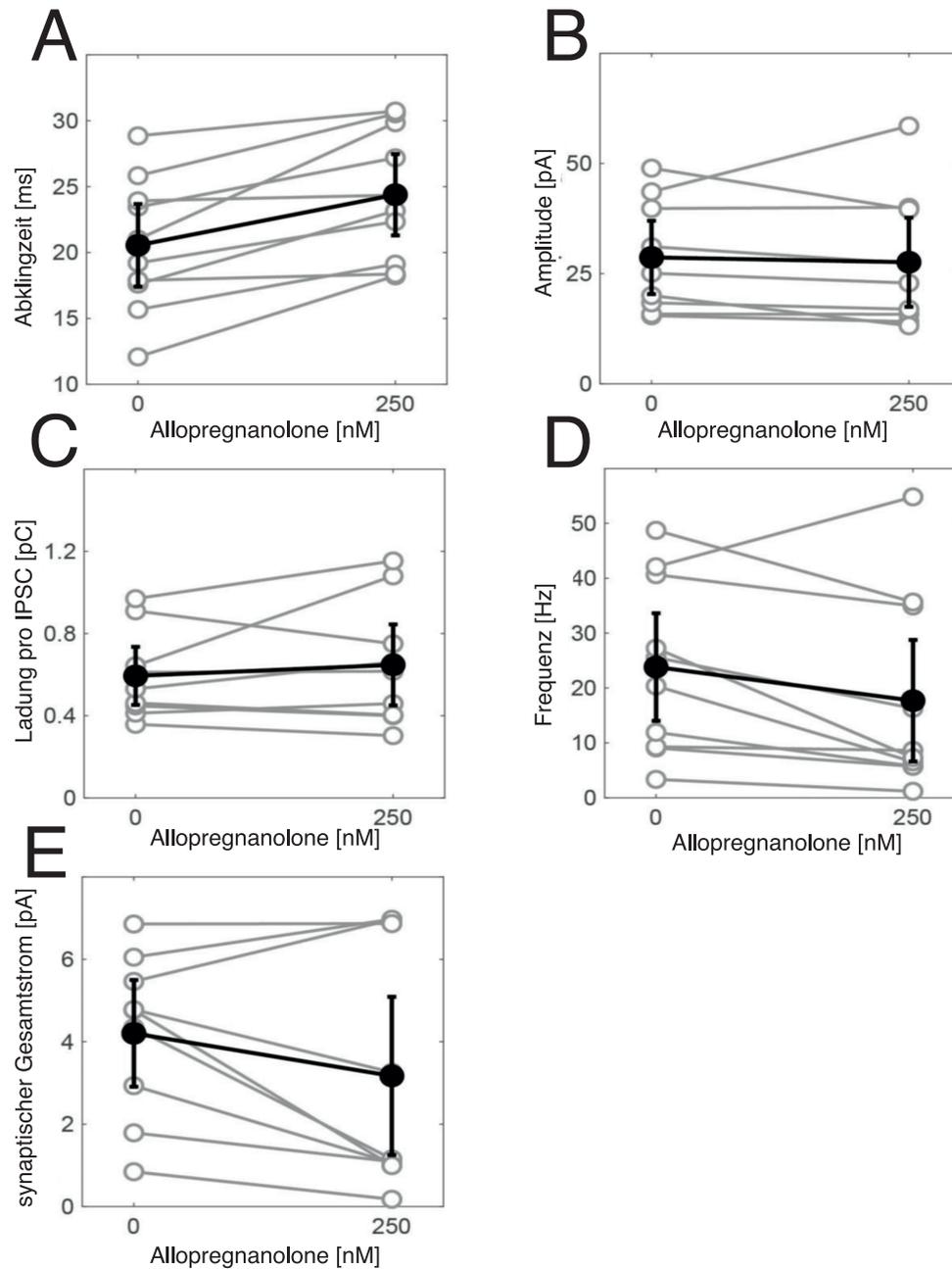


Abbildung 18 Wirkung von Allopregnanolone (250 nM) auf die durch GABA_A-Rezeptoren vermittelte synaptische Inhibition. Alle Daten stellen den Mittelwert mit den 95 %-Konfidenzintervallen dar. **(A)** Allopregnanolone bewirkte eine Verlängerung der Abklingzeit von 20,6 (17,42; 23,68) ms auf 24,4 (21,3; 27,48) ms ($n=10$, t-Test, $p=0,003$). **(B)** Allopregnanolone hatte keinen signifikanten Effekt auf die mittlere Amplitude pro IPSC: 28,7 (20,36; 37,0) pA ohne Allopregnanolone und 27,7 (17,47; 37,71) pA mit 250 nM Allopregnanolone ($n=9$, t-Test $p=0,64$). **(C)** Der Nettoeffekt des Ladungstransfers pro IPSC unterschied sich mit 0,6 (0,45; 0,74) pC ohne Allopregnanolone und 0,6 (0,46; 0,85) pC mit Allopregnanolone nicht ($n=9$, t-Test, $p=0,4$). **(D)** Allopregnanolone reduzierte die Frequenz von 23,8 (14,02; 33,64) Hz auf 17,7 (6,61; 28,77) Hz ($n=10$, t-Test, $p=0,0075$). **(E)** Insgesamt verursachte 250 nM Allopregnanolone keinen signifikanten Anstieg des phasischen Gesamtstroms von 4,2 (2,91; 5,5) pC auf 3,2 (1,28; 5,1) pC ($n=9$, t-Test, $p=0,1$). Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

3.3 Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Aktionspotentialaktivität

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde untersucht, inwieweit Allopregnanolone die spontane Netzwerkaktivität der spinalen Interneurone im Vorderhorn beeinflusst. Die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Drexler, Grenz et al. 2020). Hierfür wurden Extrazellulärableitungen an insgesamt 257 Gewebeschnitten durchgeführt. Als Messgröße diente die Aktionspotentialrate spinaler Interneurone, die sich in unmittelbarer Nähe der Spitze der Ableitelektrode befanden. Dabei wurden Konzentrationen von Allopregnanolone von 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M und 2 μ M untersucht. Aufgezeichnet wurde jeweils Messintervalle von sechs Minuten.

Nachfolgende Abbildung 19 zeigt einen Ausschnitt einer Originalaufzeichnung. Dabei spiegelt die x-Achse den Zeitverlauf der Spontanaktivität wider, anhand der y-Achse lassen sich Aktionspotential-Spikes vom Grundrauschen abgrenzen. Vor der Applikation von Allopregnanolone generierten die Neurone des ventralen Horns im kultivierten Rückenmark Aktionspotentiale mit einer Frequenz von $9,6 \pm 1,3$ Hz.

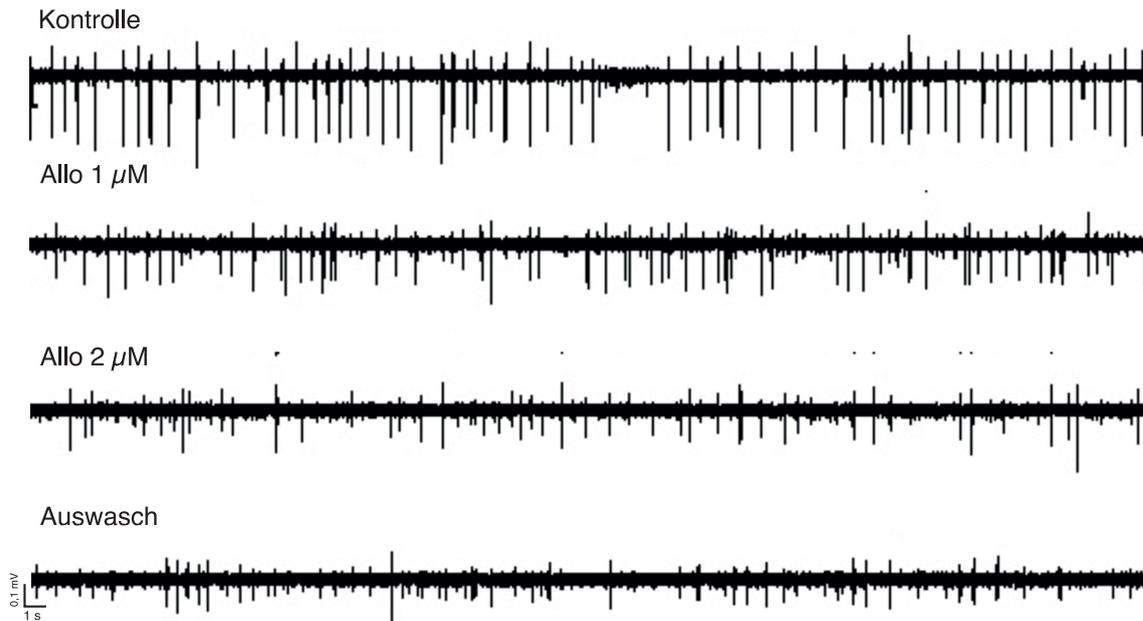


Abbildung 19 Darstellung eines Ausschnitts einer Originalaufzeichnung zur Untersuchung der Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Netzwerkaktivität.

Die x-Achse gibt den Zeitverlauf wieder. Die Spikes lassen sich deutlich vom Grundrauschen abgrenzen. Nach der Applikation von Allopregnanolone lassen sich weniger Aktionspotentiale detektieren. In diesem Beispiel wurde nach Aufzeichnung der Kontrollaktivität Allopregnanolone in den Konzentrationen von 1 und 2 μM appliziert.

Die Effekte von Allopregnanolone in unterschiedlichen Konzentrationen sind in Abbildung 20 in normalisierter Form dargestellt. Hierfür wurde die Aktionspotentialaktivität nach der Applikation von Allopregnanolone durch die jeweilige Kontroll-Aktionspotentialaktivität geteilt. Eine normalisierte Aktionspotentialaktivität von 1 bedeutet keinen Einfluss von Allopregnanolone, eine normalisierte Aktionspotentialaktivität von 0,5 spiegelt eine 50 %-Hemmung wider. Um einen Einfluss des Lösungsmittels DMSO sowie eine spontane Aktivierung der spinalen Neurone auszuschließen, wurden Scheinapplikationen durchgeführt. Wurden alle Scheinapplikationen normalisiert und zusammengefasst, ergab sich keine Änderung der Aktionspotentialaktivität.

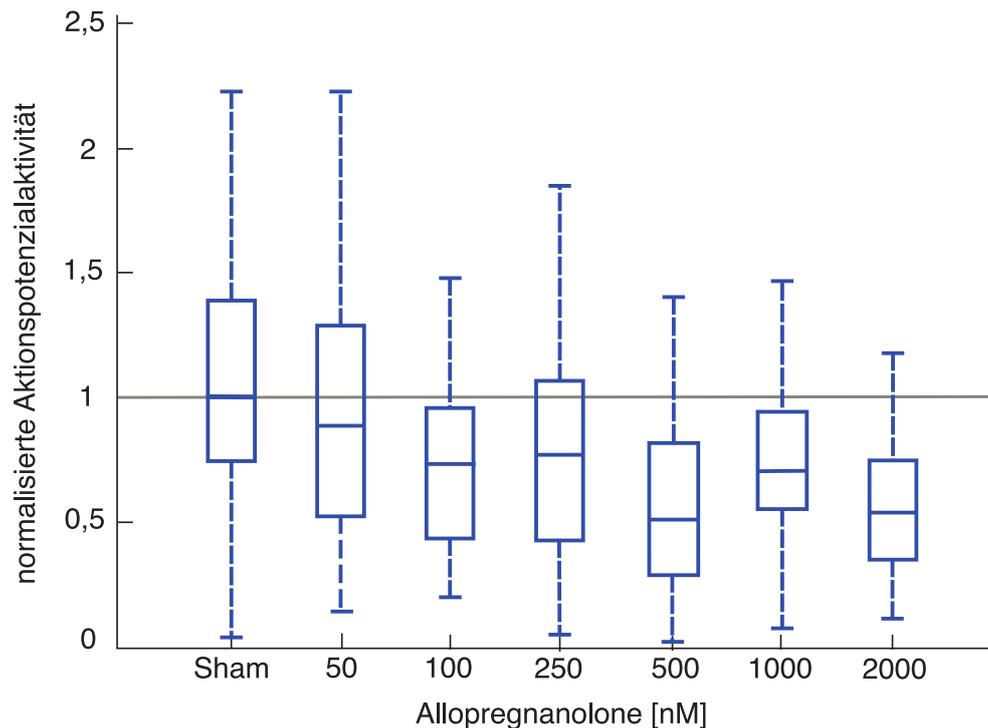


Abbildung 20 Normalisierte Wirkung von Allopregnanolone auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone. Allopregnanolone verursachte in aufsteigender Dosierung von 50 nM bis 2 μ M eine konzentrationsabhängige Hemmung der spontanen Netzwerkaktivität. Insgesamt wurden pro Konzentration 35-48 Messungen durchgeführt. Die Daten waren nicht normalverteilt (Lilliefors-Test, $p < 0,05$), daher erfolgt die Darstellung in Box-Whisker-Plots. Die waagrechte Linie gibt den Median wieder, die Box jeweils die 25 %ige sowie 75 %ige Perzentile, die Whiskers jeweils den 1,5-fachen Interquartilenabstand (interquartil range, IQR). Ab einer Konzentration von 100 nM hemmte Allopregnanolone signifikant die spontane Netzwerkaktivität (Mann-Whitney U-Test, * $p < 0,05$ mit Bonferroni-Korrektur). Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Insgesamt bewirkte Allopregnanolone ab einer Konzentration von 100 nM eine signifikante Hemmung der spontanen Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone. Die Daten waren nicht normalverteilt (Lilliefors-Test, $p < 0,05$). Im Folgenden sind die Mediane mit den 95 %-Konfidenzintervalle angegeben. Bei einer Konzentration von 100 nM betrug die Netzwerkaktivität 0,73 (0,47; 0,90) der Kontrollaktivität, bei 2 μ M 0,54 (0,43; 0,62). Pro Konzentration wurden zwischen 35-48 Experimente durchgeführt. In Abbildung 21 ist die Hemmung der Aktionspotentialaktivität durch Allopregnanolone in Prozent dargestellt. Wie unter 2.6 beschrieben wurde eine Hill-Ausgleichskurve an die experimentellen Daten angepasst. Die geschätzte mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von

Allopregnanone im Rückenmark lag bei 2259 nM. Dabei gibt die EC_{50} -Konzentration die Dosis an, bei welcher der halbmaximale Effekt erwartet wird.

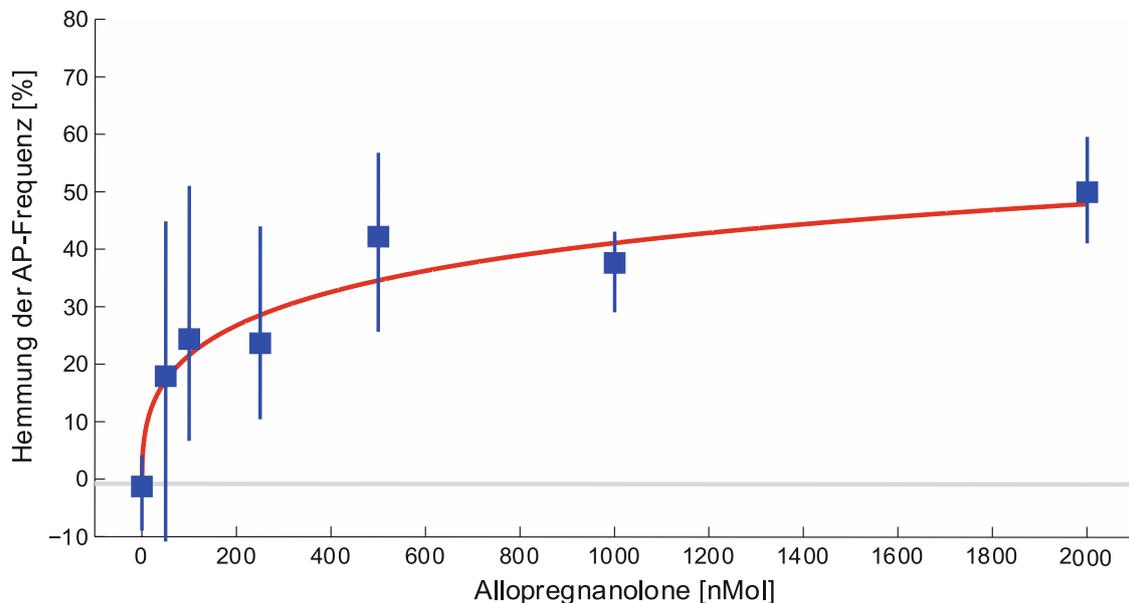


Abbildung 21 Wirkung von Allopregnanone auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone in Prozent mit zugehöriger Hill-Ausgleichskurve. Darstellung der konzentrationsabhängigen Hemmung von Allopregnanone auf die Aktionspotentialfrequenz angegeben in Prozent. Die Quadrate stellen die Mediane dar, die oberen und unteren Linien die 95% Konfidenzintervalle. Die rote Ausgleichskurve wurde durch eine Hill-Funktion an die Datenpunkte angepasst. Dabei ergab sich ein EC_{50} -Wert von 2259 nM Allopregnanone.

Zusammenfassend konnte eine signifikante Hemmung der Spontanaktivität der spinalen Neurone im Vorderhorn ab einer Konzentration von 100 nM festgestellt werden. Ab dieser Konzentration wurde wie in 3.1 beschrieben auch ein signifikanter tonischer Strom gemessen.

3.4 Wirkung von Allopregnanolone unter Koapplikation von Propofol auf die spontane Aktionspotentialaktivität

Propofol stellt das gebräuchlichste intravenöse Anästhetikum in der Allgemeinanästhesie dar. In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von Allopregnanolone unter Koapplikation von Propofol auf die spontane Aktionspotentialaktivität beleuchtet. Da beide Substanzen vorwiegend über den GABA_A-Rezeptor wirken, wurde untersucht, ob bei gleichzeitiger Applikation von Allopregnanolone und Propofol eine synergistische Wirkung beobachtet werden kann. Hierfür wurden Extrazellulärableitungen an insgesamt 220 Gewebeschnitten des ventralen Horns des Rückenmarks durchgeführt.

Propofol wurde in den Konzentrationen 1 und 5 μM zu 100 nM Allopregnanolone bzw. zu dem Lösungsmittel DMSO appliziert. 100 nM Allopregnanolone verstärkte die GABAerge tonische Inhibition, wie in 3.1 beschrieben, und verringerte die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone um ca. 25 %, wie in 3.3 beschrieben. Eckle, Rudolph et al. (2014) untersuchten die Wirkung von Propofol am ventralen Horn des Rückenmarks. Sie konnten zeigen, dass Propofol in der Konzentration von 1 μM vor allem die phasische Inhibition am synaptischen GABA_A-Rezeptor beeinflusst, während es in der Konzentration von 5 μM bevorzugt am extrasynaptischen GABA_A-Rezeptor wirkt und die GABAerge tonische Inhibition verstärkt.

Die folgende Abbildung 22 zeigt eine repräsentative Originalspur eines Experiments. Dabei waren die Aktionspotentiale deutlich vom Grundrauschen abgrenzbar. Bei der Zugabe von 1 μM Propofol zu Allopregnanolone konnten weniger Aktionspotentiale detektiert werden, nach Applikation von 5 μM Propofol kam es zu einer weiteren Abnahme der Netzwerkaktivität.

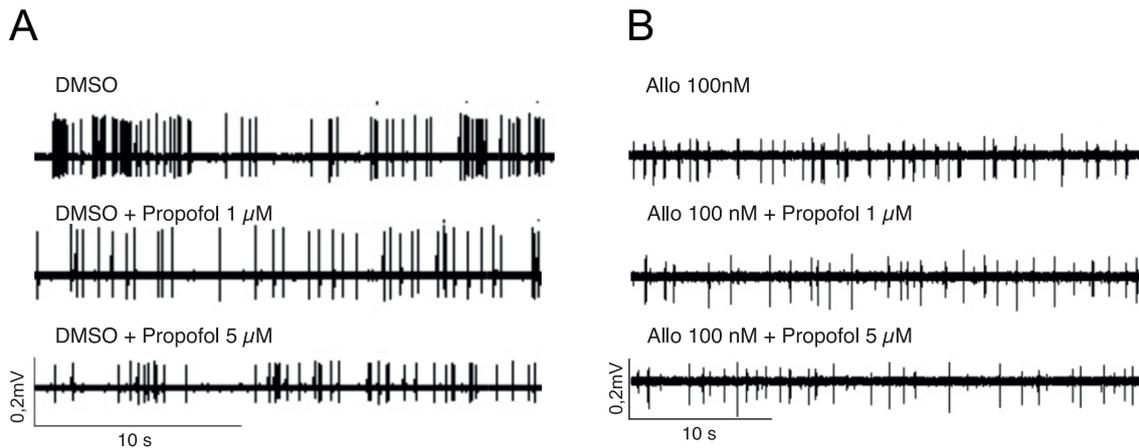


Abbildung 22 Abbildung einer Originalspur: Wirkung Allopregnanolone (100 nM) bzw. DMSO unter Koapplikation von Propofol (1 und 5 µM). Jede Reihe zeigt einen Ausschnitt aus einer sechsminütigen Messaufnahme. Der Auswasch ist nicht dargestellt. **(A)** stellt Ausschnitte der Messreihe zur Untersuchung der Wirkung von Propofol (1 und 5 µM) ohne Allopregnanolone auf die spontane Aktionspotentialrate dar. **(B)** zeigt Ausschnitte aus einer Messung nach Applikation von Propofol in den Konzentrationen von 1 und 5 µM zu 100 nM Allopregnanolone (Allo).

Die Daten waren nach dem Lilliefors-Test nicht normalverteilt ($p < 0,05$), weshalb die Berechnung der Mediane und der 95 %-Konfidenzintervalle erfolgte. Wie Abbildung 23 zeigt, lag die spontane Aktionspotentialaktivität von Allopregnanolone mit 6,40 (5,06; 7,51) Hz unter der Kontrollaktivität mit 6,97 (4,87; 9,12) Hz. In der Kontrollgruppe bewirkte die Zugabe von 1 µM Propofol eine Abnahme der Feuerrate auf 5,57 (4,13; 6,97) Hz. Allopregnanolone verursachte eine Verringerung der Aktionspotentialfrequenz auf 4,66 (3,41; 5,50) Hz. Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant ($p = 0,66$). In Gegenwart von hohen Konzentrationen von 5 µM Propofol wurde die Aktionspotentialfrequenz durch Allopregnanolone statistisch signifikant verringert: von 2,42 (1,80; 3,26) Hz ohne Allopregnanolone auf 1,69 (1,41; 2,35) Hz mit Allopregnanolone ($p = 0,035$)

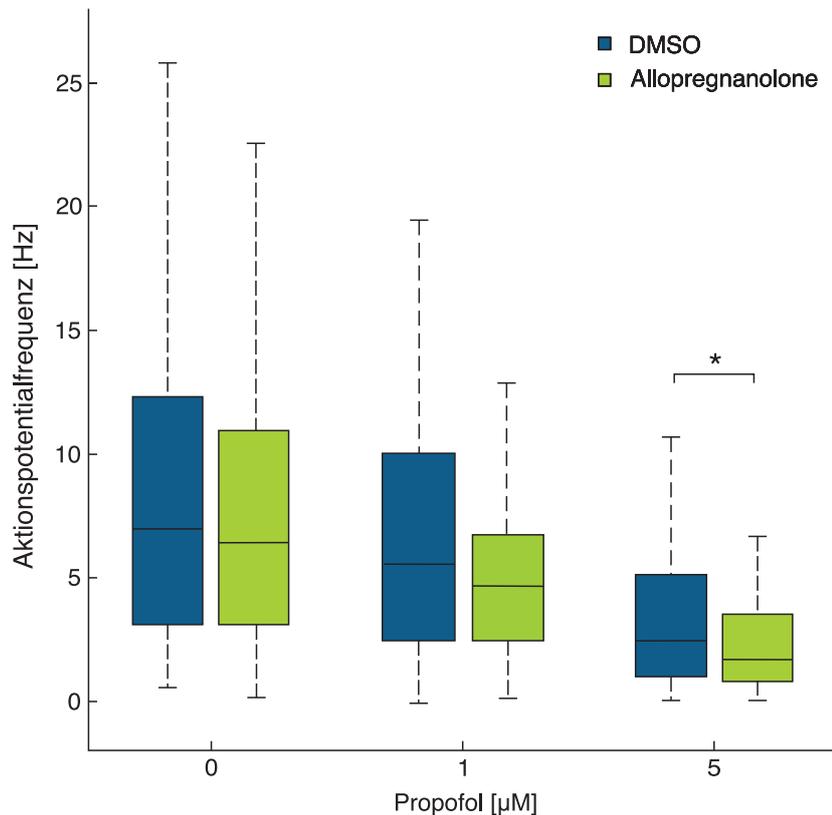


Abbildung 23 Wirkung von Propofol (1 und 5 µM) auf die spontane Aktionspotentialfrequenz mit und ohne Allopregnanolone (100 nM). Die Daten waren nicht normalverteilt (Lilliefors, $p < 0,05$). Die Darstellung erfolgt in Box-Whisker-Plots. Die waagrechten Linien geben die Mediane an, die Boxen die 25 %ige und 75 %ige Perzentile. Die senkrechten Linien geben die Whiskers ($\pm 1,5$ IQR) an. **Links:** Allopregnanolone hemmte nicht signifikant die Aktionspotentialfrequenz spinaler Interneurone von 6,97 (4,87; 9,12) Hz auf 6,4 (5,06; 7,51) Hz ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,66$). **Mitte:** Propofol reduzierte die Feuerrate auf 5,57 (4,12; 6,97) Hz. Dieser Effekt wurde durch Allopregnanolone nicht signifikant verstärkt (4,66 (3,41; 5,50) Hz) ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,086$). **Rechts:** Durch die Zugabe von 5 µM Propofol wurde die Feuerrate auf 2,42 (1,80; 3,26) Hz reduziert, nach der Applikation von Allopregnanolone zu 5 µM Propofol wurde die Aktionspotentialfrequenz statistisch signifikant auf 1,69 (1,41; 2,35) Hz verringert ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,035$). * = $p < 0,05$

In Abbildung 24 ist die Änderung der Aktionspotentialfrequenz durch Propofol in An- und Abwesenheit von Allopregnanolone dargestellt, bezogen auf die Kontrollbedingungen (DMSO bzw. 100 nM Allopregnanolone). Hier bewirkte Allopregnanolone eine signifikante Abnahme der Aktionspotentialfrequenz nach Applikation von 1 µM Propofol ($p = 0,02$). Dies ließ sich auch bei der Applikation von hohen Konzentrationen von Propofol 5 µM bestätigen ($p = 0,049$)

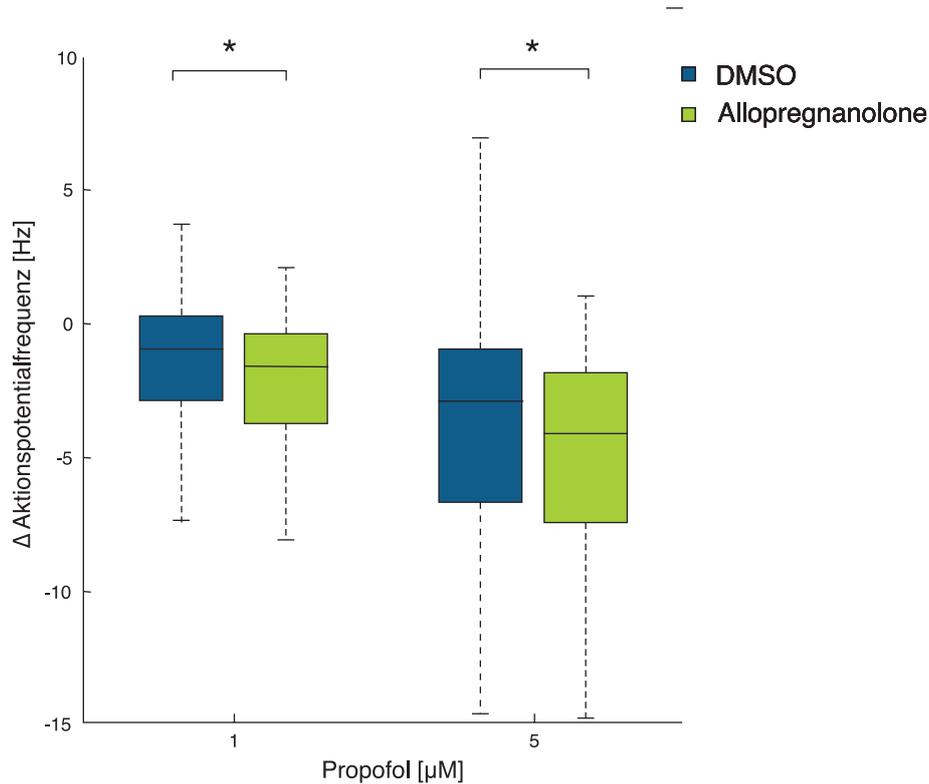


Abbildung 24 Darstellung der Änderung der Aktionspotentialfrequenz durch Propofol in An- und Abwesenheit von Allopregnanolone. Die Daten waren nicht normalverteilt (Lilliefors-Test, $p < 0,05$), daher wird der Median mit der 25 %igen und 75 %igen Perzentile dargestellt sowie den Whiskers ($\pm 1,5$ IQR). **Links:** Veränderung der Aktionspotentialfrequenz durch Applikation von 1 μM Propofol von -1,02 (-1,35; -0,63) Hz. Allopregnanolone bewirkte eine Abnahme der Frequenz um -1,66 (-2,51; -1,02) Hz. Dieser Effekt war statistisch signifikant. ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,02$). **Rechts:** Die Applikation von 5 μM Propofol verringerte die Aktionspotentialfrequenz um -2,96 (-3,95; -2,42) Hz. Wird Propofol zu Allopregnanolone appliziert, verringerte sich die Frequenz signifikant um -4,16 (-5,16; -3,31) Hz ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,049$). * = $p < 0,05$

Im folgenden Diagramm (Abb. 25) wurden die Daten normalisiert dargestellt. Betrachtet man die prozentuale Depression der Aktionspotentialfrequenz, so muss der unterschiedliche Ausgangswert von Allopregnanolone und dem Lösungsmittel beachtet werden, da bei Allopregnanolone bereits eine geringe Hemmung vorlag. Bei der Zugabe von 1 μM Propofol zu dem Allopregnanolone-Perfusat, wurde eine Hemmung von 32,17 (26,71, 38,11) % gemessen. Ohne Allopregnanolone lag nach Zugabe von 1 μM Propofol eine Inhibition von 20,35 (14,79; 27,12) % vor. Dieser Effekt war statistisch signifikant ($p = 0,049$). Nach der Zugabe von hohen Konzentrationen von 5 μM Propofol zu Allopregnanolone, wurden 70,14 (67,27; 74,22) % der spontanen

Netzwerkaktivität gehemmt. Ohne der Koapplikation von Allopregnanolone bewirkte 5 μM Propofol eine prozentuale Hemmung von 57,48 (51,56; 65,55) % ($p= 0,0001$).

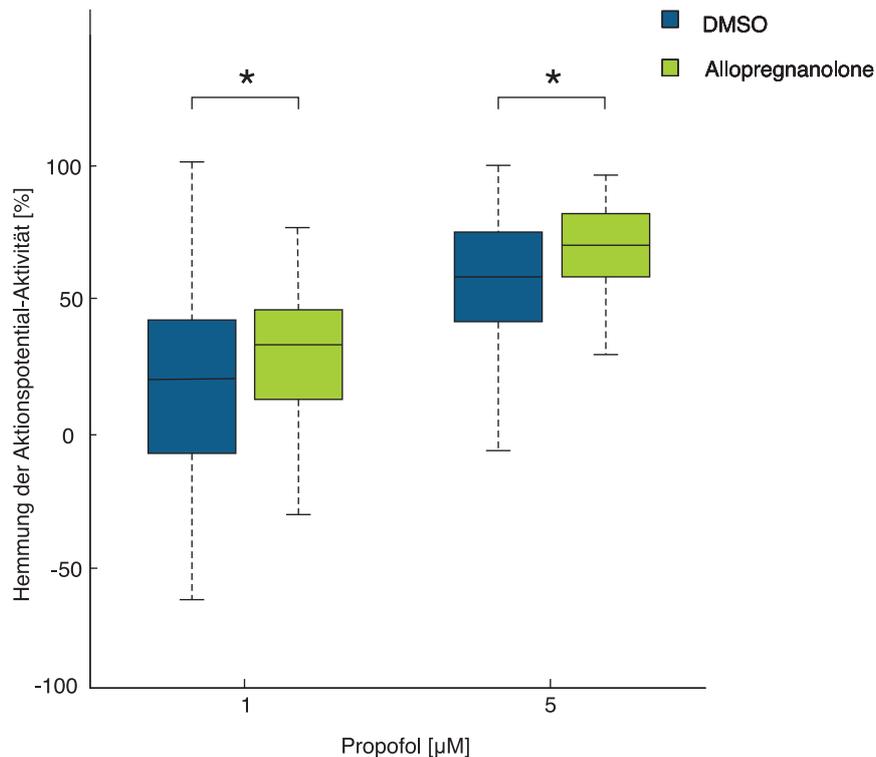


Abbildung 25 Darstellung der prozentualen Hemmung der Aktionspotentialaktivität durch Propofol mit und ohne Allopregnanolone. Die Daten wurden normalisiert und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Sie sind nicht normalverteilt (Lilliefors-Test, $p < 0,05$). Die waagrechte Linie gibt den Median an, die Boxen die 25 %ige und 75 %ige Perzentile, die senkrechten Linien die Whiskers ($\pm 1,5$ IQR). **Links:** 1 μM Propofol bewirkte eine Hemmung der Aktionspotentialaktivität von 20,35 (14,79; 27,12) %. Allopregnanolone verstärkte diese Hemmung auf 32,17 (26,71; 38,11) % ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,005$). **Rechts:** 5 μM Propofol reduzierte die Aktionspotentialaktivität auf 57,48 (51,56; 65,55) %. Allopregnanolone verstärkte diesen Effekt auf eine Hemmung von 70,14 (67,27; 74,22) % ($n = 109$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,001$). * = $p < 0,05$

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Allopregnanolone die Hemmung der Aktionspotentialaktivität durch Propofol verstärkt. Einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen konnten wir nicht erkennen. Vielmehr entfalten die beiden Substanzen eine additive Wirkung am GABA_A -Rezeptor.

3.5 Wirkung von Allopregnanolone unter Koapplikation von Propofol auf den motorischen Output

Nachdem die Wirkung von Allopregnanolone und Propofol auf die spinalen Interneurone beleuchtet wurde, untersuchten wir in dieser Versuchsreihe den Einfluss auf die Aktivität der α -Motoneurone. Die Ergebnisse wurden bereits publiziert (Drexler, Grenz et al. 2020). Hierfür wurden Co-Kulturen aus Rückenmark und Muskelgewebe verwendet, wie in 2.1.2 beschrieben. In diesen Präparaten werden Muskelkontraktionen durch Acetylcholin-freisetzende α -Motoneurone induziert, die über synaptische Verbindungen in Muskelfasern projizieren (Magloire and Streit 2009). Gleichzeitig konnten Aktionspotentiale durch Extrazellulärmessungen abgeleitet werden. Die Auswertung und Quantifizierung der Muskelkontraktion erfolgte über Videomikroskopie über die Registrierung von Hell-Dunkelverschiebungen. Insgesamt wurden jeweils 29 bzw. 28 Experimente pro Versuchsreihe durchgeführt.

Die folgende Abbildung 26 zeigt den neurogenen Ursprung der Muskelaktivität. Unter Kontrollbedingungen (Abb. 26 A) konnte eine gute Korrelation zwischen der rhythmischen Aktivität der Muskelfasern und der Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone beobachtet werden. Im Anschluss wurde Pancuronium appliziert, ein kompetitiver Antagonist nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren. Wie Abbildung 26 B zeigt, unterdrückte Pancuronium die Muskelaktivität ohne Einfluss auf die Grundaktivität der spinalen Neurone zu haben. Dieser Effekt war im Auswasch reversibel (Abb. 26 C). Dies lässt vermuten, dass nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren vor allem an der neuromuskulären Synapse eine wichtige Rolle spielen und nur wenig Einfluss auf die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone haben (Jordan, McVagh et al. 2014). Wurde Tetrodotoxin (Abb. 26 D) hinzugefügt, ein spezifischer Blocker der spannungsgesteuerten Natrium-Kanäle, wurden sowohl die Muskelkontraktionen als auch die Aktionspotentialaktivität vollständig gehemmt. Auch dieser Effekt war vollständig reversibel (Abb. 26 E). Pancuronium wurde in unseren Experimenten jeweils am Ende hinzugefügt, um sicherzustellen, dass die Muskelaktivität durch α -Motoneurone verursacht wurde. Dadurch konnte die Wirkung von

Allopregnanone und Propofol auf ihre muskelrelaxierende Eigenschaften untersucht werden.

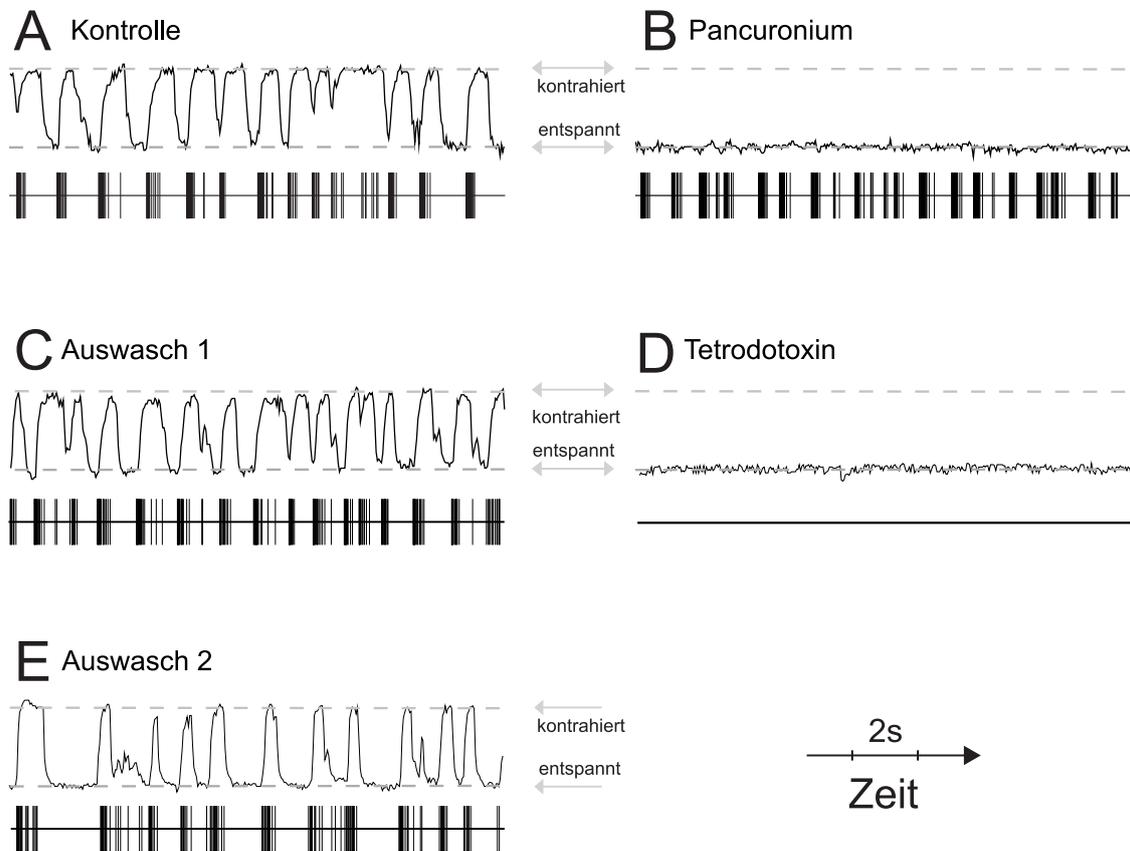


Abbildung 26 Registrierung von Muskelkontraktionen und der Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone in Rückenmarkskulturen mit Muskelzell-Co-Kulturen. Die erste Zeile gibt die Aktivität der Muskelfasern wieder (kontrahiert: aufsteigende Linie, entspannt: absteigende Linie). Die zweite Linie zeigt die Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone (horizontale Linie: Grundrauschen, vertikale Linien: Einzel- oder Gruppe von Aktionspotentialen) **(A)** Es sind längere Phasen der Kontraktion und Relaxation der Muskelfaser zu erkennen, wobei das Interneuron eine Serie von Aktionspotentialen jeweils zu Beginn der kontrahierten Phase generierte. **(B)** Nachdem das nicht depolarisierende Muskelrelaxans Pancuronium ($1 \mu\text{M}$) appliziert wurde, sistierten die Muskelkontraktionen, während die Grundaktivität unverändert blieb. **(C)** Nach dem Auswaschen war die Muskelaktivität wieder sichtbar. **(D)** Der Natriumkanal-Blocker Tetrodotoxin ($0,5 \mu\text{M}$) induzierte keinerlei neurogene Aktivität, sowohl die Muskelaktivität als auch die Grundaktivität sistierte. **(E)** Die Wirkung von Tetrodotoxin war reversibel. Es zeigte sich weiterhin eine Korrelation zwischen der Aktionspotentialaktivität und der Muskelaktivität. Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Im folgenden Diagramm (Abb. 27) ist die Wirkung von Allopregnanolone (100 nM), Propofol (1 μ M) und die Kombination der beiden Substanzen dargestellt. Die Daten waren nicht normalverteilt (Lilliefors-Test, $p < 0,05$), weshalb die Angabe der Mediane und der 95 %-Konfidenzintervalle erfolgte. Allopregnanolone verringert die Frequenz der Muskelkontraktionen um ca. 35 % von einer Kontrollaktivität von 1,2 (0,8; 1,3) Hz auf 0,81 (0,70; 0,95). 1 μ M Propofol hemmt die Muskelkontraktionen um ca. 23 % auf eine Frequenz von 0,92 (0,55; 1,04) Hz. Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Depression der Aktionspotentialaktivität von Propofol im ventralen Horn des Rückenmarks (Eckle, Rudolph et al. 2014), sowie mit unseren Daten in 3.4. Eine kombinierte Applikation von 100 nM Allopregnanolone und 1 μ M Propofol ergab eine Hemmung der Frequenz der Muskelkontraktionen auf 0,56 (0,32; 0,78) Hz. Nach der Applikation von Pancuronium zeigte sich eine nahezu vollständige Relaxation der Muskelfasern.

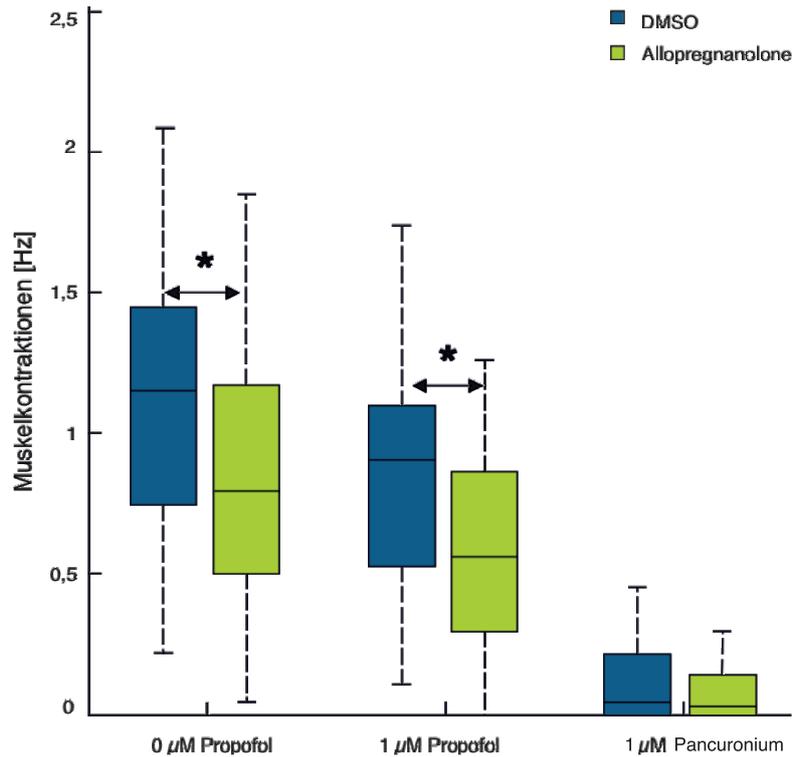


Abbildung 27 Wirkung von Allopregnanolone (100 nM) auf die Muskelkontraktionen in An- und Abwesenheit von Propofol (1 μM). Die Daten sind nicht normalverteilt (Lilliefors-Test, $p < 0,05$), daher erfolgt die Darstellung in Box-Whisker-Plots. Die waagrechte Linie stellt den Median dar, die Boxen die 25 %ige bzw. 75 %ige Perzentile, die senkrechten Linien die Whiskers ($\pm 1,5$ IQR). **Links:** 100 nM Allopregnanolone hemmte signifikant die Muskelkontraktionsfrequenz von 1,16 (0,84; 1,29) Hz unter Kontrollbedingungen auf 0,81 (0,70; 0,95) Hz ($n = 29$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,043$). **Mitte:** Propofol reduzierte den Median der Muskelkontraktionsfrequenz auf 0,92 (0,55; 1,04) Hz. In Anwesenheit von 100 nM Allopregnanolone wurde dieser Effekt signifikant verstärkt auf 0,56 (0,32; 0,78) Hz ($n = 28$, Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,041$). **Rechts:** Die Muskelkontraktionen sistierten in der Anwesenheit von 1 μM Pancuronium. * = $p < 0,05$, modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Abbildung 28 zeigt zusammenfassend die Wirkung von Allopregnanolone und Propofol auf die α -Motoneurone. Zur Übersicht wurden nur die Mediane dargestellt. Neben der Konzentration von 1 μM Propofol wurde auch die Wirkung von Propofol in der hohen Konzentration von 5 μM auf die Muskelkontraktionen dargestellt. Wie man der Abbildung 28 entnehmen kann, bewirkte die kombinierte Gabe von 100 nM Allopregnanolone und 1 μM Propofol eine Inhibition der α -Motoneurone von ca. 51,5 %. Ähnliche Effekte hatte die alleinige Applikation von 5 μM Propofol mit einer Inhibition von 52,0 %. Daneben verstärkte die

kombinierte Gabe von 100 nM Allopregnanolone und 5 μM Propofol die Inhibition auf α - Motoneurone im Vergleich zur alleinigen Gabe von Propofol 5 μM nur geringfügig. In Anwesenheit von hohen Konzentrationen von Propofol war die Fähigkeit von Allopregnanolone, hemmend auf die Muskelkontraktionen zu wirken, deutlich verringert.

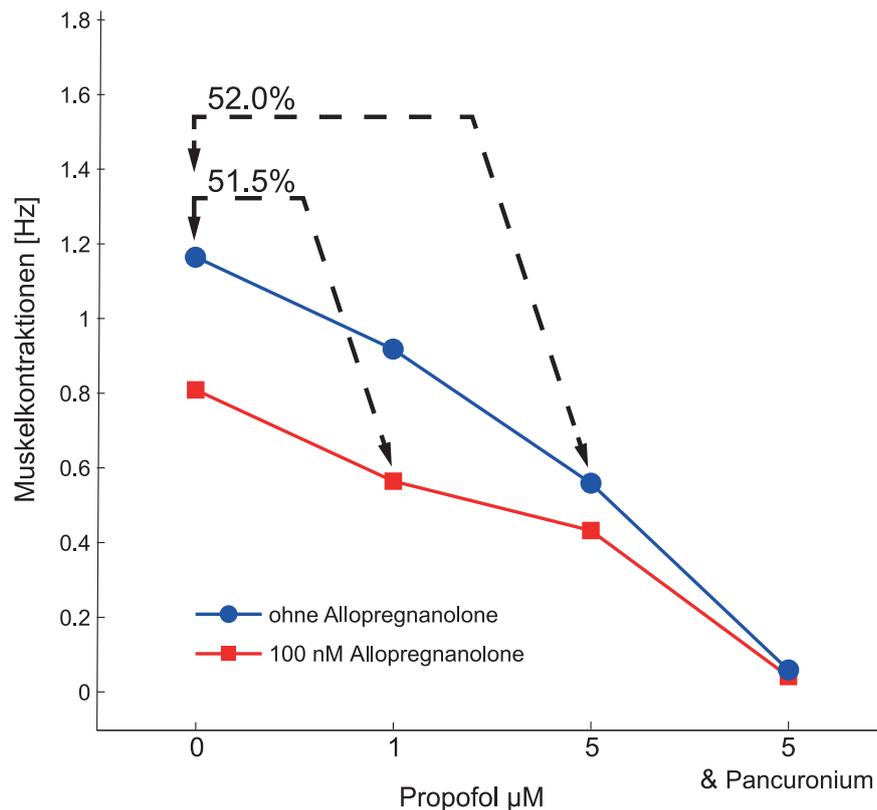


Abbildung 28 Wirkung von Propofol (1 und 5 μM) auf die Muskelaktivität unter Koapplikation von Allopregnanolone (100 nM). Die beiden Linien zeigen die Interaktionen von Propofol in Anwesenheit (rote Linie) und Abwesenheit von Allopregnanolone (Allo) (blaue Linie). Die kombinierte Gabe von Allopregnanolone 100 nM und Propofol 1 μM hemmt die Muskelaktivität ähnlich stark wie die alleinige Gabe von Propofol 5 μM . Bei der Zugabe von Pancuronium kam es zu einer fast vollständigen Relaxation der Muskelfasern. Modifiziert nach Drexler, Grenz et al. (2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Addition der hemmenden Effekte auf die Muskelaktivität von 1 μM Propofol (Erhöhung der phasischen GABAergen Inhibition (Eckle, Rudolph et al. 2014)) und 100 nM Allopregnanolone (Erhöhung der tonischen GABAergen Inhibition) stattfand.

4 Diskussion

4.1 Organotypische Kulturen

Für die vorliegende Studie wurden organotypische Kulturen des Rückenmarks von embryonalen Wildtypmäusen verwendet. Vor allem durch die Morphologie der Rezeptorstruktur sowie der synaptischen Verschaltung, welche in vivo-Experimenten sehr ähnlich sind, eignen sie sich besonders zum Testen neuroaktiver Substanzen (Drexler, Hentschke et al. 2010). Organotypische Gewebekulturen durchlaufen nach der Präparation einen Reifungs- und Differenzierungsprozess, welche denen eines lebenden Tier entsprechen. Nach ca. 12 Tagen ist der Reifungsprozess weit vorangeschritten, sodass die Morphologie der Neurone deren Zustand im adulten Tier sehr ähnlich ist (Gähwiler 1981). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Spontanaktivität zwischen Tag 12 und 35 nicht signifikant unterschied, weshalb innerhalb dieses Zeitraums gemessen wurde (Grasshoff and Antkowiak 2004).

Zahlreiche Studien belegen eine weitgehende Übereinstimmung der Entwicklung spinaler Neurone in vivo und in vitro in organotypischen Gewebekulturen. Holopainen and Lauren (2003) konnten durch Untersuchung von mRNA für die Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors eine weitgehende Übereinstimmung in vivo und in vitro feststellen. Auch auf neokortikalen Pyramidenneuronen konnte bei der Verteilung von den GABAergen Synapsen nicht zwischen in vivo und in vitro unterschieden werden (Di Cristo, Wu et al. 2004). Hentschke, Schwarz et al. (2005) untersuchten die Wirkung von volatilen Anästhetika am lebenden Tier sowie in vitro durch organotypische Kulturen des Neokortex. In klinisch relevanten Konzentrationen zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Hemmung der neuronalen Aktivität in vivo und in vitro.

Ein weiteres in-vitro Modell sind akute Schnittkulturen des Rückenmarks. Hier erfolgt die Präparation des Rückenmarks am adulten Tier. Während die Zytoarchitektur am ehesten der in vivo entspricht, besteht die Gefahr, dass je

nach Lokalisation zahlreiche synaptische Verbindungen zerstört werden. Dies hat zur Folge, dass durch den Verlust des synaptischen Inputs die Netzwerkaktivität nur durch elektrische oder pharmakologische Stimulation erzeugt werden kann. Da sich in organotypischen Kulturen synaptische Verbindungen erst in vitro entwickeln, sind mehr miteinander verbundene Neurosynapsen vorhanden und es besteht bereits je nach Region eine ausgeprägte spontane Netzwerkaktivität ohne weitere Stimulation (Debanne, Guerineau et al. 1995). Ein weiterer Vorteil von organotypischen Gewebekulturen verglichen mit akuten Schnittkulturen ist die geringere Dicke und daher geringere Diffusionszeit des Pharmakons. Im Gegensatz zu akuten Schnitten, welche eine Dicke von 300 μm aufweisen, nimmt die Dicke von organotypischen Kulturen während der Kultivierungsphase auf 50 μm ab, sodass ein Monolayer funktionstüchtiger Zellen entsteht. Während die Diffusionszeit von Propofol in akuten Hirnschnitten mehrere Stunden bis zum Gleichgewichtszustand andauert, kann diese in organotypischen Gewebekulturen auf einige Minuten reduziert werden (Gredell, Turnquist et al. 2004, Benkwitz, Liao et al. 2007).

Zur Beurteilung des motorischen Outputs spinaler Neurone wurden organotypische Rückenmarkskulturen mit Muskel-Co-Kulturen verwendet. Dadurch kann die Wirkung von Pharmaka auf die Muskelaktivität untersucht werden.

4.2 Konzentration von Allopregnanolone und verwendete Dosierungen

Die Konzentration von Allopregnanolone im Plasma und im Gehirn unterliegt starken Schwankungen und hängt von physiologischen Faktoren wie Entwicklung, dem weiblichen Zyklus oder Stress ab. Physiologische Konzentrationen von Allopregnanolone wurden zwischen 10-300 nM gemessen (Belelli, Harrison et al. 2009, Lambert, Cooper et al. 2009). In der Anwesenheit von GABA modulieren Konzentrationen von 10-1000 nM den GABA_A-Rezeptor

allosterisch. Ab einer Konzentration von 1 μM können Neurosteroid direkt den GABA_A -Rezeptor ohne Anwesenheit von GABA aktivieren (Reddy and Rogawski 2002, Lambert, Cooper et al. 2009). Ferner wurde gezeigt, dass bereits 60 nM Allopregnanolone in Körnerzellen des Gyrus dentatus der Maus einen signifikanten tonischen Strom erzeugen (Rajasekaran, Joshi et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden klinische relevante Konzentrationen von Allopregnanolone von 50-250 nM für die Whole-cell Voltage-clamp-Messungen sowie von 50-2000 nM für Extrazellulärmessungen bzw. Videomikroskopie verwendet.

4.3 selektive Modulation der GABA_A -Rezeptor-abhängigen tonischen Inhibition

Zusammenfassend induzierte Allopregnanolone in spinalen Interneuronen des ventralen Horns des Rückenmarks einen tonischen GABA_A -ergen Strom, der mit einer Abnahme der Aktivität spinaler α -Motoneurone einhergeht. Dabei bewirkte 100 nM und 250 nM Allopregnanolone eine signifikante tonische Inhibition von $40,8 \text{ pA} \pm 9,8 \text{ pA}$. Diese tonische Inhibition könnte durch die Aktivierung von extrasynaptischen GABA_A -Rezeptoren verursacht werden. Im Gegensatz dazu scheint die Wirkung von Allopregnanolone an synaptischen GABA_A -Rezeptoren eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde bereits die Wirkung von Allopregnanolone auf den zerebralen Cortex untersucht. Im Gegensatz zu den aktuellen Ergebnissen dieser Arbeit, moduliert Allopregnanolone im Neokortex sowohl synaptische als auch extrasynaptische Rezeptoren (Drexler, Balk et al. 2016). Hierbei konnte ein Anstieg der Abklingzeit der IPSCs um ca. 50 % sowie ein tonischer Strom von $24,6 \pm 13,6 \text{ pA}$ gemessen werden.

Dieser heterogene Wirkungseffekt von Allopregnanolone im Rückenmark kann sich daraus erklären, dass die Wirkung von Neurosteroiden wie Allopregnanolone auf GABA_A-Rezeptoren stark von der Region im ZNS und dem Neuronentyp abhängt. Zusätzlich werden die pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften durch die Zusammensetzung der Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren bestimmt (Belelli and Lambert 2005, Herd, Belelli et al. 2007).

Eine Untergruppe von extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren beinhaltet die δ -Untereinheit. Dabei bewirkt die Bindung von Neurosteroiden an die extrasynaptisch gelegene δ -Untereinheit eine Konformationsänderung, eine stärkere Kanalöffnung sowie eine verringerte Desensibilisierung der tonischen Inhibition (Bianchi and Macdonald 2003). Im Gyrus dentatus der Maus konnte gezeigt werden, dass Allopregnanolone in geringen nanomolaren Konzentrationen GABAerge Ströme verstärkt (Carver and Reddy 2013). In δ -knockout Mäusen war dieser Effekt deutlich vermindert, was auf eine hohe Empfindlichkeit von Allopregnanolone auf δ -GABA_A-Rezeptoren schließen lässt. Zahlreiche Studien zeigten ähnliche Ergebnisse (Stell, Brickley et al. 2003, Glykys, Mann et al. 2008, Wu, Guo et al. 2014).

Im Rückenmark kommen δ -Untereinheiten vor allem im dorsalen Horn vor und sind an der Nozizeption beteiligt (Takahashi, Mashimo et al. 2006, Bonin, Labrakakis et al. 2011). Die Expression und Bedeutung in motorischen Schaltkreisen sind ungewiss. Die δ -Untereinheit kommt oft mit der $\beta_{2/3}$ -Untereinheit sowie der α_4 - oder α_6 -Untereinheit vor, abhängig von dem jeweiligen Gewebe und der Region (Carver and Reddy 2013). GABA_A-Rezeptoren, die aus der δ - und α_6 -Untereinheit bestehen, sind durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Furosemid charakterisiert (Minier and Sigel 2004). Im Rückenmark von Schildkröten wurden in der Mehrzahl der Motoneurone tonische Ströme gemessen, welche sehr sensibel auf Furosemid reagierten (Andres, Aguilar et al. 2014). In spinalen Interneuronen des ventralen Horns konnten diese nicht nachgewiesen werden (Castro, Aguilar et al. 2011). Zusammenfassend

lässt sich die Annahme, dass Allopregnanolone im ventralen Horn über Bindung an δ -GABA_A-Rezeptoren die Bicuculline-sensitiven tonischen Ströme verstärkt, nicht untermauern.

Das Vorhandensein der δ - Untereinheit ist jedoch keine Voraussetzung für die Erzeugung eines tonischen Stroms. An Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus, in welcher nur wenige GABA_A-Rezeptoren mit der δ - Untereinheit vorkommen (Glykys, Mann et al. 2008), konnten tonische Ströme abgeleitet werden. Hier konnte eine hohe Dichte an extrasynaptisch gelegenen $\alpha_5\beta\gamma_2$ - Rezeptoren gefunden wurden. Auch im Rückenmark ist die α_5 - Untereinheit an der tonischen GABAergen Inhibition beteiligt (Delgado-Lezama, Loeza-Alcocer et al. 2013). Castro, Aguilar et al. (2011) untersuchten tonische Ströme an spinalen Interneuronen im ventralen Horn. Der spezifische α_5 - Antagonist L655,708 konnte diese unterdrücken. Weitere Untersuchungen mittels reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) und Immunhistochemie bestätigten das Vorkommen der α_5 - Untereinheit. Tonische GABAerge Ströme wurden auch an Motoneuronen gemessen, die empfindlich auf L-655-708 reagierten (Castro, Aguilar et al. 2011). Hernández-Reyes, Salinas-Abarca et al. (2019) zeigten in einer aktuellen Studie, dass L655-708 den Hoffmann-Reflex bei Ratten moduliert. In Zusammenschau aller Befunde gehen wir davon aus, dass α_5 - GABA_A-Rezeptoren auch in vivo an der Kontrolle spinaler motorischer Netzwerke eine wichtige Rolle spielen.

Wie genau Allopregnanolone die tonische GABAerge Inhibition verstärkt, bleibt unklar. Allopregnanolone könnte als positiv allosterischer Modulator am GABA_A-Rezeptor wirken, nachdem dieser durch GABA aus der Umgebung aktiviert wurde. Extrazelluläres GABA könnte von einem „Spillover“ von synaptischer vesikulärer Freisetzung stammen, von Astrozyten, umgekehrt arbeitenden GABA-Transporter oder durch nicht vesikuläre Mechanismen freigesetzt werden (Liu, Schaffner et al. 2000, Kozlov, Angulo et al. 2006, Bright, Aller et al. 2007, Glykys and Mody 2007, Christensen, Delgado-Lezama et al. 2018). Ein anderer Mechanismus ist die direkte Aktivierung des GABA_A-Rezeptors durch

Allopregnanolone, wie bei dem intravenösen Anästhetikum Thiopental beschrieben wurde (Grasshoff, Netzhammer et al. 2008).

Erwähnung finden muss jedoch auch, dass die Fähigkeit von Neurosteroiden die tonische Inhibition zu beeinflussen, nicht nur von der Zusammensetzung der Untereinheiten abhängt, sondern auch von der Besetzung von GABA_A-Rezeptoren sowie von der Konzentration von extrazellulärem GABA (Houston, McGee et al. 2012). Zudem beeinflussen beispielsweise eine erhöhte Aktivität der GABA-Transporter und -Aufnahme die Interaktion am extrasynaptischen Rezeptor (Madsen, Ebert et al. 2011).

4.4 untergeordnete Rolle der phasischen GABAergen Inhibition

Obwohl Allopregnanolone vor allem die tonische GABAerge Inhibition verstärkt, modifiziert es auch synaptische GABA_A-Rezeptoren. Wie in Abbildung 17 dargestellt, bewirkte Allopregnanolone eine Zunahme der Abklingzeit um ca. 25 %. Zudem wurde die Frequenz der IPSCs verringert, ohne die Amplitude zu beeinflussen. Einen ähnlichen Effekt ließ sich auch bei spinalen Neuronen des Hinterhorns beobachten bei Konzentrationen von 1 µM bis 10 µM (Mitchell, Gentet et al. 2007). GABA_A-Rezeptoren können aufgrund einer unterschiedlichen Zusammensetzung ihrer Protein-Untereinheiten unterschiedliche kinetische Eigenschaften aufweisen, was sich in unterschiedlichen Abklingzeiten manifestiert. So erschien es denkbar, dass auf unterschiedlichen Typen von Interneuronen, an denen möglicherweise die intrazellulären Messungen durchgeführt wurden, auch unterschiedliche Typen von GABA_A Rezeptoren vorhanden waren. Aus den Verteilungen der IPSC-Abklingzeiten und -Amplituden ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise auf die Existenz von Rezeptor-Subpopulationen.

Doch in welchem Umfang trägt die phasische Inhibition über Verlängerung der Abklingzeit zu dem hemmenden Effekt von Allopregnanolone auf die spontane Netzwerkaktivität bei? Die durchschnittlich übertragene Ladung eines einzelnen IPSC lag in unseren Untersuchungen bei 0,7 pC (Abb. 17 C), die Frequenz lag bei circa 10 Hz (Abb. 17 D). In der Summe entspricht dies einem tonischen Strom von 7 pA. Wird angenommen, dass Allopregnanolone die pro IPSC übertragene Ladung um 25 % erhöht, ohne Einfluss auf die Amplitude oder Frequenz zu nehmen, beträgt der durch Allopregnanolone induzierte Strom ca. 1,75 pA. Vergleicht man diesen Wert mit dem durch Allopregnanolone induzierten tonischen Strom von etwa 40 pA, so wird klar, dass Allopregnanolone über die Modifikation von synaptischen GABA_A-Rezeptoren nicht signifikant zum hemmenden Effekt auf die spontane Netzwerkaktivität beiträgt. Diese Schätzung berücksichtigt nicht die Verringerung der Frequenz der IPSCs durch Allopregnanolone.

4.5 Auswirkung von Allopregnanolone auf die spontane Netzwerkaktivität

Auf Rezeptorebene erzeugte Allopregnanolone eine signifikante tonische Inhibition am GABA_A-Rezeptor. Wir untersuchten, inwieweit sich diese tonische Inhibition auf die Netzwerkaktivität spinaler Interneurone auswirkte. Durch Extrazellulärableitungen wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve von Allopregnanolone im Rückenmark erstellt. Eine signifikante Inhibition von 25 % der Netzwerkaktivität trat ab Konzentrationen von 100 nM ein. Eine vollständige Hemmung der Netzwerkaktivität konnte im Rückenmark auch bei hohen Konzentrationen nicht erreicht werden. Dies spiegelt sich auch in der berechneten EC₅₀-Konzentration von 2259 nM wider.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich im Neocortex, wo eine Hemmung der kortikalen Netzwerkaktivität durch 100 nM Allopregnanolone um 21 % gemessen wurde (Drexler, Balk et al. 2016). Wie unter 4.1 und 4.2 bereits beschrieben

konnte man auf synaptischer Ebene im Neocortex eine Verlängerung der Abklingzeit der IPSCs von ca. 70 % messen, verglichen mit 25 % in unseren spinalen Neuronen. Dies lässt ebenfalls vermuten, dass die tonische Inhibition in Bezug auf die spontane Netzwerkaktivität im Neocortex eine untergeordnetere Rolle spielt als im Rückenmark. Während im Rückenmark eine maximale Inhibition von 50 % bei 2 μM gemessen wurde, konnte im Neocortex eine fast vollständige Inhibition der Spontanaktivität erreicht werden, jedoch bei sehr hohen Konzentrationen von Allopregnanolone (5 μM). Eine Erklärung könnte die Regionen-spezifische Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten und die Präferenz von Allopregnanolone für bestimmte GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten sein (Antkowiak and Rammes 2019).

Insgesamt zeichnet sich in der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 21) von Allopregnanolone auf spinale Neurone ein Sättigungseffekt ab. Auch mit hohen Konzentrationen konnte keine vollständige Depression der Aktionspotentialaktivität erreicht werden. Ein ähnlicher Effekt lässt sich bei der Wirkung des intravenösen Anästhetikum Propofol auf spinale Neurone feststellen. Auch hier zeigte sich in klinisch relevanten Konzentrationen eine maximale Depression der spontanen Netzwerkaktivität von ca. 60 % (Grasshoff and Antkowiak 2004, Eckle, Rudolph et al. 2014). Im Gegensatz dazu bewirkt das volatile Anästhetikum Sevofluran eine fast vollständige Hemmung der Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone (Grasshoff and Antkowiak 2004). Gründe hierfür könnten die unterschiedlichen molekularen Zielstrukturen sein. Während Propofol hauptsächlich als allosterischer Modulator am GABA_A-Rezeptor wirkt, bindet Sevofluran an GABA_A-, Glycin-, glutamaterge und andere Rezeptoren (Eckle, Hauser et al. 2013). Daher kommt die Vermutung auf, dass für die vollständige Depression der spontanen Netzwerkaktivität im Rückenmark eine GABAerge Inhibition nicht ausreicht.

4.6 Wirkung von Allopregnanolone und Propofol auf Muskel-Kontraktionen

Zusammenfassend beeinflusst das Neurosteroid Allopregnanolone in der klinisch relevanten Konzentration von 100 μM vor allem durch tonische Inhibition die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone. Wie beeinflusst Allopregnanolone durch tonische Inhibition den motorischen Output spinaler Neurone? Kann durch Allopregnanolone die Wirkung des intravenösen Anästhetikums Propofol auf spinale Motoneurone verstärkt werden?

Die Ergebnisse zeigen, dass Allopregnanolone signifikant die Pancuronium-sensitiven-Muskel-Kontraktionen der organotypischen Rückenmarkskulturen mit Muskelzell-Co-Kulturen hemmt. Spenger, Braschler et al. (1991) identifizierten Motoneurone als große, Acetylcholinesterase-positive Neurone, welche sich ventral in den kultivierten spinalen Gewebekulturen befanden. Die Muskelkontraktionen konnten durch Pancuronium, einem nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden. In gleichzeitiger Untersuchung der spontanen Aktionspotentialaktivität und Muskelkontraktionen, sistierten nach Applikation von Pancuronium die Muskelkontraktionen nahezu vollständig, während das Muskelrelaxans keinen Einfluss auf die Aktionspotentialaktivität hatte (Abb. 26). Dies weist auf einen Wirkmechanismus an der motorische Endplatte hin. Seeger, Worek et al. (2007) zeigten, dass Pancuronium in der Konzentration von 1 μM keinen Einfluss auf Muskelfasern des Zwerchfells von Mäusen hatte, welche direkt elektrisch stimuliert wurden, jedoch in der Lage war, synaptisch vermittelte Muskelkontraktionen zu blockieren. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass diese Pancuronium-sensitiven Muskelkontraktionen durch α -Motoneurone verursacht werden.

Eine Konzentration von 100 nM Allopregnanolone bewirkte eine mittlere Hemmung von 32,5 % der α -Motoneurone, welche auf molekularer Ebene vor allem durch eine signifikante tonische Inhibition erzeugt wurde, während der Einfluss der synaptischen Inhibition eine untergeordnete Rolle spielte. Wurde Propofol in der Dosis von 1 μM hinzugegeben, welche vor allem eine phasische

Inhibition bewirkt ohne signifikanten Einfluss auf die tonische Inhibition zu haben, konnte man eine mittlere Inhibition von 23,3 % verzeichnen. Die unterschiedliche Wirkweise der beiden Substanzen auf molekularer Ebene lässt vermuten, dass Propofol und Allopregnanolone auf unterschiedliche Subtypen des GABA_A-Rezeptors wirken. Dies könnte eine Erklärung für die additive hemmende Wirkung am α -Motoneuron sein. Bei der gleichzeitigen Applikation von 1 μ M Propofol und 100 nM Allopregnanolone wurde eine Hemmung von 51,5 % gemessen (Abb. 27), welcher sehr nahe am geschätzten additiven Effekt von 55,8 % liegt.

In höheren Konzentrationen von Propofol kann dieser additive Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. 5 μ M Propofol, eine Dosis, die bei Menschen Immobilität verursacht (Di Cristo, Wu et al. 2004), erzeugt einen signifikanten tonischen Strom, entsprechend dem tonischen Strom von Allopregnanolone bei 100 nM (45 pA). Die Wirkung von Allopregnanolone auf α -Motoneurone war auf Kulturen, welche 5 μ M Propofol exponiert waren, deutlich geringer als auf Kulturen, die 1 μ M Propofol ausgesetzt waren. Zusätzlich ist zu beachten, dass der Effekt der additiven Gabe von 1 μ M Propofol und 100 nM Allopregnanolone nahezu dem Effekt der alleinigen Gabe von 5 μ M Propofol entspricht (Abb. 28).

Die Gründe für den verringerten Effekt von Allopregnanolone bei der Gabe von hohen Konzentrationen von Propofol können vielseitig sein. Da beide Substanzen unterschiedliche Bindungsstellen am GABA_A-Rezeptor aufweisen (Forman and Miller 2016), scheint ein kompetitiver Mechanismus unwahrscheinlich. Eine Erklärung könnte sein, dass bei 100 nM Allopregnanolone bereits fast alle extrasynaptischen Rezeptoren aktiviert waren. Da Propofol in hohen Konzentrationen ebenfalls auf extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren wirkt, kann durch die kumulative Gabe kein additiver Effekt erzielt werden. Diese Hypothese wird auch davon gestützt, dass sich der tonische Strom nur durch Erhöhung der Konzentrationen von Allopregnanolone von 50 nM auf 100 nM verstärkte. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 250 nM hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Verstärkung des GABAergen tonischen

Stroms. Zudem war wie bereits erwähnt, die jeweilige Höhe des tonischen Stroms von Allopregnanolone und Propofol sehr ähnlich (45 pA).

4.7 Wirkung von Allopregnanolone mit Propofol auf die Netzwerkaktivität spinaler Interneurone

Neben dem Einfluss von Allopregnanolone und Propofol auf α -Motoneurone im ventralen Horn des Rückenmarks wurde zudem die Wirkung auf spinale Interneurone untersucht. Hierfür wurde in Extrazellulärableitungen die Wirkung auf die spontane Netzwerkaktivität untersucht. Frühere Studien zeigten, dass Neurosteroid die Affinität von Muscimol (Harrison and Simmonds 1984) oder Flunitrazepam (Harris, Wong et al. 1995) am GABA_A-Rezeptor erhöhen. Li, Bracamontes et al. (2014) fanden heraus, dass das Neurosteroid Pregnanolone und das intravenöse Anästhetikum Etomidat, beides allosterische Liganden am GABA_A-Rezeptor, einen synergistischen Wirkungseffekt am GABA_A-Rezeptor entfalten. Durch die Applikation von Pregnanolone wurde die Konzentrations-Wirkungskurve des intravenösen Anästhetikums Etomidat zu niedrigeren Konzentrationen hin verschoben. Daher kam die Frage nach einer möglichen synergistischen Wirkung von Allopregnanolone und Propofol auf Netzwerkebene auf. Als Synergismus wurde eine signifikante, überadditive Wirkung der beiden Substanzen bei gleichzeitiger Applikation definiert, die den Wert übersteigt, der sich aus der Addition der Einzeleffekte ergibt.

Zur Untersuchung eines möglichen Synergismus wurden zwei Konzentrationen von Propofol (1 μ M und 5 μ M) und 100 nM Allopregnanolone gewählt. Vergleichbar mit vorherigen Publikationen (Eckle, Rudolph et al. 2014) hemmt 1 μ M Propofol die Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone um ca. 20 %, in hohen Konzentrationen von 5 μ M um ca. 60 % (Abb. 25). Durch unsere durchgeführten Versuche ist bekannt, dass eine Hemmung der Aktionspotentialaktivität durch Allopregnanolone ebenfalls von 25 % zu erwarten ist (Abb. 20, 21). Nach der Zugabe von 1 μ M Propofol zu Allopregnanolone

würden wir im Falle eines synergistischen Effekts eine Hemmung der Aktionspotentialaktivität von mehr als 45% erwarten. Dies jedoch traf nicht zu, da wir lediglich eine Zunahme der Hemmung der Aktionspotentialaktivität von ca. 32 % messen konnten. Zudem zeigte sich eine sehr breite Streuung der einzelnen Messwerte, weshalb keine Signifikanz erreicht wurde. Bei der Zugabe von Propofol in der hohen Konzentration von 5 μM zu Allopregnanolone nahm diese Streubreite der Einzelmessungen ab und es zeigte sich eine signifikante Hemmung von ca. 70 % im Vergleich zur 60 %-igen Hemmung durch die alleinige Applikation von Propofol. Auch hier wären im Falle eines Synergismus eine Hemmung von mehr als 85% zu erwarten. Insgesamt ist daher auch auf Netzwerkebene ein additiver oder sogar antagonistischer Effekt von Allopregnanolone und Propofol zu sehen. Jedoch scheint die Wirkung von Allopregnanolone auf Netzwerkebene geringer zu sein, als bei der Betrachtung des motorischen Outputs. Ein Grund für die fehlende synergistische Wirkung der beiden Substanzen könnte die Tatsache sein, dass sowohl Allopregnanolone als auch Propofol über unterschiedliche GABA_A-Rezeptor Subtypen wirken, wie in 4.6 bereits dargestellt. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte bereits die Interaktionen von Allopregnanolone und Propofol in organotypischen Gewebekulturen des Neokortex (Drexler, Balk et al. 2016). Hier zeigte sich auf molekularer Ebene eine synergistische bzw. supraadditive Wirkung von Allopregnanolone und Propofol. Im Gegensatz zur alleinigen Applikation, bewirkte Propofol in Anwesenheit von Allopregnanolone eine Verdopplung der Abklingzeit der IPSCs. Auf Netzwerkebene konnte diese Beobachtung ebenfalls nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich lediglich eine kumulative Wirkung von Propofol auf die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Neurone.

4.8 Limitationen der Studie

Natürlich müssen auch die Einschränkungen der Studie erläutert werden. Wie dargestellt, besteht eine gute Korrelation zwischen der konzentrationsabhängigen Erhöhung der tonischen GABAergen Ströme und der

Reduktion der spontanen Netzwerkaktivität der spinalen Interneurone des Vorderhorns. Hier muss beachtet werden, dass es sich um unterschiedliche experimentelle Bedingungen handelt. Zur Untersuchung der tonischen Ströme wurden Whole-cell Voltage-clamp Ableitungen durchgeführt. Hierbei wurde die glutamaterge und glycinerge Neurotransmission blockiert und dadurch die Netzwerkaktivität spinaler Interneurone unterbrochen. Die reduzierte glutamaterge Erregung der GABA-freisetzenden Neurone könnte sich möglicherweise auf das Gleichgewicht zwischen phasischer und tonischer GABAerger Hemmung auswirken. Daher ist es nicht auszuschließen, dass Allopregnanolone die GABAerge synaptische Übertragung im Falle einer konservierten glutamatergen Neurotransmission potenzieren könnte. Allerdings sind die GABA-Konzentrationen durch die geringere Größe des extrazellulären Raums und durch die kontinuierliche Perfusion mit künstlichem Liquor wahrscheinlich viel niedriger als in vivo. Untersuchungen auf die spontane Netzwerkaktivität oder Muskelkontraktionen wurden ohne die Zugabe von Blockern der glutamatergen oder glycinergen Übertragung durchgeführt.

In der vorliegenden Studie wurden nur medikamentös induzierte Veränderungen der spontanen Netzwerkaktivität untersucht, nicht durch einen Stimulus induzierte neuronale Aktivität und Muskelkontraktionen. Hierbei könnten unterschiedliche Netzwerke betroffen sein, welche in der vorliegenden Studie nicht differenziert untersucht werden.

4.9 weitere Studien und klinischer Ausblick

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Bicuculline-sensitive tonische Ströme die Aktivität spinaler ventraler Interneurone und α -Motoneurone modulieren. Frühere pharmakologische Studien geben den Hinweis auf die wichtige Rolle der $\alpha 5$ - und δ - Untereinheit für die Erzeugung dieser GABAergen tonischen Ströme. Allerdings müssen die GABA_A-Rezeptor-Subtypen noch genauer identifiziert werden. Zukünftige Studien sollten daher die Wirkung von

Neurosteroiden auf Gewebeschnitte untersuchen, welche von $\alpha 5$ - und δ - Untereinheit-Knockout-Mäusen stammen. In einem folgenden Schritt können Hypothesen, die sich aus in vitro Experimenten ergeben in vivo getestet werden. Hier könnten die Auswirkungen von Allopregnanolone auf den Hoffmann-Reflex untersucht werden, welche die monosynaptische Stimulation der α -Motoneurone beinhaltet.

Neurosteroide sind körpereigene Stoffe und ihre Konzentration im Gehirn hängt von Alter und Geschlecht ab und unterliegt physiologischen Schwankungen, beispielsweise bei Stress, Alkoholkonsum oder während der Schwangerschaft (Purdy, Morrow et al. 1991, Paul and Purdy 1992, Schumacher, Weill-Engerer et al. 2003, Kumar, Fleming et al. 2004, Schumacher, Mattern et al. 2014). Zudem wirken sie neuroprotektiv (Borowicz, Czuczwar et al. 2011). Sollte sich der in vitro beobachtete Effekt von Allopregnanolone und Propofol in vivo bestätigen, so könnte durch Dosiseinsparung des intravenösen Anästhetikums die Wahrscheinlichkeit für intraoperative Bewegungen und andere unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Gleichzeitig könnte der Patient von den positiven Wirkungen von Allopregnanolone profitieren und so das Outcome nach einer Operation verbessert werden.

5 Zusammenfassung

Das Neurosteroid Allopregnanolone ist ein positiv allosterischer Modulator am GABA_A-Rezeptor und wirkt neben seinen sedierenden Eigenschaften, anxiolytisch, antidepressiv und antikonvulsiv. Es ist nicht bekannt, welchen Einfluss das Neurosteroid auf die spinalen motorischen Netzwerke hat. Daher untersuchten wir die Hypothese, dass Allopregnanolone die spontane Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone und Motoneurone verringert, indem es vor allem die tonische, nicht jedoch die phasische GABAerge Hemmung verstärkt.

Hierfür verwendeten wir Videomikroskopie, um an organotypischen Kulturen, die aus dem Rückenmark und Muskelgewebe präpariert wurden, die Muskelaktivität zu untersuchen, die durch α -Motoneurone erzeugt wird. Zur genauen Beleuchtung des Wirkmechanismus der GABAergen Inhibition von Allopregnanolone im ventralen Horn des Rückenmarks wurden Whole-cell Voltage-clamp-Ableitungen durchgeführt. In unseren durchgeführten Experimenten reduzierte Allopregnanolone (100 nM) die spontane Aktionspotentialaktivität von spinalen Interneuronen um 27 % und hemmte die Aktivität von α -Motoneuronen um 33 %. Bei der kombinierten Applikation von Propofol (1 μ M) und Allopregnanolone (100 nM) zeigte sich eine additive Wirkung auf die durch Motoneurone induzierten Muskelkontraktionen. In hohen Konzentrationen von Propofol (5 μ M) war die Wirkung von Allopregnanolone auf die Muskelkontraktionen geringer. Auch hinsichtlich der spontanen Aktionspotentialaktivität spinaler Interneurone zeichnete sich eine additive Wirkungsweise von Propofol und Allopregnanolone ab. Auf Rezeptorebene evozierte Allopregnanolone einen tonischen GABAergen Strom der Amplitude von 41 pA, während die phasische GABA_A-Rezeptor vermittelte Übertragung nicht erhöht wurde. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass Propofol in der klinisch relevanten Konzentration von 1 μ M vor allem die phasische GABAerge Inhibition verstärkte ohne größere Wirkung auf extrasynaptische

GABA_A-Rezeptoren zu haben. Daher vermuten wir, dass Allopregnanolone und Propofol bevorzugt an unterschiedliche Subtypen des GABA_A-Rezeptors binden.

Diese Ergebnisse unserer Studie liefern erste Informationen, dass durch eine kombinierte Applikation des Neurosteroids Allopregnanolone und des intravenösen Anästhetikums Propofol in der Allgemeinanästhesie intraoperative Bewegungen und unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden könnten. Diese werden häufig unter Vollnarkose mit intravenösen Allgemeinanästhetika beobachtet. Zudem könnten Patienten gleichzeitig von den positiven Eigenschaften von Allopregnanolone, wie der Neuroprotektion oder Anxiolyse profitieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Adeosun, S. O., X. Hou, Y. Jiao, B. Zheng, S. Henry, R. Hill, Z. He, A. Pani, P. Kyle and X. Ou (2012). "Allopregnanolone reinstates tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and motor performance in an MPTP-lesioned mouse model of Parkinson's disease." PLoS One **7**(11): e50040.
2. Afrazi, S., S. Esmaeili-Mahani, V. Sheibani and M. Abbasnejad (2014). "Neurosteroid allopregnanolone attenuates high glucose-induced apoptosis and prevents experimental diabetic neuropathic pain: in vitro and in vivo studies." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **139**: 98-103.
3. Alkire, M. T., R. J. Haier, S. J. Barker, N. K. Shah, J. C. Wu and J. Y. Kao (1995). "Cerebral metabolism during propofol anesthesia in humans studied with positron emission tomography." Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists **82**(2): 393-403.
4. Andres, C., J. Aguilar, R. González-Ramírez, D. Elias-Viñas, R. Felix and R. Delgado-Lezama (2014). "Extrasynaptic α 6 subunit-containing GABA A receptors modulate excitability in turtle spinal motoneurons." PloS one **9**(12): e115378.
5. Antkowiak, B. and C. Helfrich-Forster (1998). "Effects of Small Concentrations of Volatile Anesthetics on Action Potential Firing of Neocortical Neurons In Vitro " Anesthesiology **88**(6): 1592-1605.
6. Antkowiak, B. and G. Rammes (2019). "GABA (A) receptor-targeted drug development-New perspectives in perioperative anesthesia." Expert opinion on drug discovery **14**(7): 683-699.
7. Antognini, J. F. and K. Schwartz (1993). "Exaggerated anesthetic requirements in the preferentially anesthetized brain." Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists **79**(6): 1244-1249.
8. Antognini, J. F., X. W. Wang and E. Carstens (2000). "Isoflurane action in the spinal cord blunts electroencephalographic and thalamic-reticular formation responses to noxious stimulation in goats." Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists **92**(2): 559-559.
9. Antognini, J. F., X. W. Wang, M. Piercy and E. Carstens (2000). "Propofol directly depresses lumbar dorsal horn neuronal responses to noxious stimulation in goats." Canadian journal of anaesthesia **47**(3): 273-279.
10. Avossa, D., M. Rosato-Siri, F. Mazzarol and L. Ballerini (2003). "Spinal circuits formation: a study of developmentally regulated markers in organotypic cultures of embryonic mouse spinal cord." Neuroscience **122**(2): 391-405.

11. Axmacher, N. and A. Draguhn (2004). "Inhibition of GABA release by presynaptic ionotropic GABA receptors in hippocampal CA3." Neuroreport **15**(2): 329-334.
12. Bai, D., P. S. Pennefather, J. F. MacDonald and B. A. Orser (1999). "The general anesthetic propofol slows deactivation and desensitization of GABA_A receptors." Journal of Neuroscience **19**(24): 10635-10646.
13. Bai, D., G. Zhu, P. Pennefather, M. F. Jackson, J. F. MacDonald and B. A. Orser (2001). "Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by γ -aminobutyric acid_A receptors in hippocampal neurons." Molecular pharmacology **59**(4): 814-824.
14. Banks, M. I., J. A. White and R. A. Pearce (2000). "Interactions between distinct GABA_A circuits in hippocampus." Neuron **25**(2): 449-457.
15. Baulieu, E.-E. (1981). Steroid hormones in the brain: several mechanisms? Steroid hormone regulation of the brain, Elsevier: 3-14.
16. Baulieu, E. E., P. Robel and M. Schumacher (2001). "Neurosteroids: beginning of the story." Int Rev Neurobiol **46**: 1-32.
17. Baumann, S. W., R. Baur and E. Sigel (2003). "Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors." J Neurosci **23**(35): 11158-11166.
18. Belelli, D., A. Casula, A. Ling and J. J. Lambert (2002). "The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA_A receptors." Neuropharmacology **43**(4): 651-661.
19. Belelli, D., N. L. Harrison, J. Maguire, R. L. Macdonald, M. C. Walker and D. W. Cope (2009). "Extrasynaptic GABA_A receptors: form, pharmacology, and function." Journal of Neuroscience **29**(41): 12757-12763.
20. Belelli, D. and J. J. Lambert (2005). "Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA A receptor." Nature Reviews Neuroscience **6**(7): 565.
21. Benkowitz, C., M. Liao, M. J. Laster, J. M. Sonner, E. I. Eger and R. A. Pearce (2007). "Determination of the EC₅₀ Amnesic Concentration of Etomidate and Its Diffusion Profile in Brain Tissue: Implications for In Vitro Studies." The Journal of the American Society of Anesthesiologists **106**(1): 114-123.
22. Bianchi, M. T. and R. L. Macdonald (2003). "Neurosteroids shift partial agonist activation of GABA_A receptor channels from low-to high-efficacy gating patterns." Journal of Neuroscience **23**(34): 10934-10943.
23. Bonin, R. P., C. Labrakakis, D. G. Eng, P. D. Whissell, Y. De Koninck and B. A. Orser (2011). "Pharmacological enhancement of δ -subunit-containing GABA_A receptors that generate a tonic inhibitory conductance in spinal neurons attenuates acute nociception in mice." Pain **152**(6): 1317-1326.

24. Borowicz, K., S. Czuczwar, B. Piskorska and M. Banach (2011). "Neuroprotective actions of neurosteroids." Frontiers in endocrinology **2**: 50.
25. Bradley, R. J., G. Biggio, R. H. Purdy, R. A. Harris and P. Jenner (2001). Neurosteroids and brain function, Academic Press.
26. Braschler, U., A. Iannone, C. Spenger, J. Streit and H.-R. Lüscher (1989). "A modified roller tube technique for organotypic cocultures of embryonic rat spinal cord, sensory ganglia and skeletal muscle." Journal of neuroscience methods **29**(2): 121-129.
27. Brickley, S. G., S. G. Cull-Candy and M. Farrant (1996). "Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors." The Journal of physiology **497**(3): 753-759.
28. Bright, D. P., M. I. Aller and S. G. Brickley (2007). "Synaptic release generates a tonic GABAA receptor-mediated conductance that modulates burst precision in thalamic relay neurons." Journal of Neuroscience **27**(10): 2560-2569.
29. Caraiscos, V. B., E. M. Elliott, K. E. You-Ten, V. Y. Cheng, D. Belelli, J. G. Newell, M. F. Jackson, J. J. Lambert, T. W. Rosahl and K. A. Wafford (2004). "Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing γ -aminobutyric acid type A receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(10): 3662-3667.
30. Carver, C. M. and D. S. Reddy (2013). "Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA A receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability." Psychopharmacology **230**(2): 151-188.
31. Castro, A., J. Aguilar, R. González-Ramírez, E. Loeza-Alcocer, M. Canto-Bustos, R. Felix and R. Delgado-Lezama (2011). "Tonic inhibition in spinal ventral horn interneurons mediated by $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors." Biochemical and biophysical research communications **412**(1): 26-31.
32. Cherradi, N., E. M. Chambaz and G. Defaye (1995). "Organization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase and cytochrome P450scc into a catalytically active molecular complex in bovine adrenocortical mitochondria." J Steroid Biochem Mol Biol **55**(5-6): 507-514.
33. Chiara, D. C., S. S. Jayakar, X. Zhou, X. Zhang, P. Y. Savechenkov, K. S. Bruzik, K. W. Miller and J. B. Cohen (2013). "Specificity of intersubunit general anesthetic-binding sites in the transmembrane domain of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor." Journal of Biological Chemistry **288**(27): 19343-19357.

34. Child, K., J. Currie, B. Davis, M. Dodds, D. Pearce and D. Twissell (1971). "The pharmacological properties in animals of CT1341—a new steroid anaesthetic agent." BJA: British Journal of Anaesthesia **43**(1): 2-13.
35. Christensen, R. K., R. Delgado-Lezama, R. E. Russo, B. L. Lind, E. L. Alcocer, M. F. Rath, G. Fabbiani, N. Schmitt, M. Lauritzen and A. V. Petersen (2018). "Spinal dorsal horn astrocytes release GABA in response to synaptic activation." The Journal of physiology **596**(20): 4983-4994.
36. Clarke, R., J. Dundee and I. Carson (1973). "New Drugs in Anæsthesia: A New Steroid Anaesthetic-Althesin." Proceedings of the Royal Society of Medicine **66**(10): 1027-1030.
37. Debanne, D., N. Guerineau, B. H. Gähwiler and S. M. Thompson (1995). "Physiology and pharmacology of unitary synaptic connections between pairs of cells in areas CA3 and CA1 of rat hippocampal slice cultures." Journal of Neurophysiology **73**(3): 1282-1294.
38. Delgado-Lezama, R., E. Loeza-Alcocer, C. Andrés, J. Aguilar, P. A. Guertin and R. Felix (2013). "Extrasynaptic GABAA receptors in the brainstem and spinal cord: structure and function." Current pharmaceutical design **19**(24): 4485-4497.
39. Di Cristo, G., C. Wu, B. Chattopadhyaya, F. Ango, G. Knott, E. Welker, K. Svoboda and Z. J. Huang (2004). "Subcellular domain-restricted GABAergic innervation in primary visual cortex in the absence of sensory and thalamic inputs." Nature neuroscience **7**(11): 1184-1186.
40. Djebaili, M., S. Hoffman and D. Stein (2004). "Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex." Neuroscience **123**(2): 349-359.
41. Drasbek, K. R. and K. Jensen (2006). "THIP, a hypnotic and antinociceptive drug, enhances an extrasynaptic GABAA receptor-mediated conductance in mouse neocortex." Cerebral cortex **16**(8): 1134-1141.
42. Drexler, B., M. Balk and B. Antkowiak (2016). "Synergistic Modulation of γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor-Mediated Synaptic Inhibition in Cortical Networks by Allopregnanolone and Propofol." Anesthesia & Analgesia **123**(4): 877-883.
43. Drexler, B., J. Grenz, C. Grasshoff and B. Antkowiak (2020). "Allopregnanolone Enhances GABAergic Inhibition in Spinal Motor Networks." International Journal of Molecular Sciences **21**(19): 7399.
44. Drexler, B., H. Hentschke, B. Antkowiak and C. Grasshoff (2010). "Organotypic cultures as tools for testing neuroactive drugs-link between in-vitro and in-vivo experiments." Current medicinal chemistry **17**(36): 4538-4550.

45. Drexler, B., T. Seeger, C. Grasshoff, H. Thiermann and B. Antkowiak (2011). "Long-term evaluation of organophosphate toxicity and antidotal therapy in co-cultures of spinal cord and muscle tissue." Toxicology letters **206**(1): 89-93.
46. Eckle, V., U. Rudolph, B. Antkowiak and C. Grasshoff (2014). "Propofol modulates phasic and tonic GABAergic currents in spinal ventral horn interneurons." British Journal of Anaesthesia **114**(3): 491-498.
47. Eckle, V.-S., S. Hauser, B. Drexler, B. Antkowiak and C. Grasshoff (2013). "Opposing actions of sevoflurane on GABAergic and glycinergic synaptic inhibition in the spinal ventral horn." PLoS One **8**(4): e60286.
48. Farrant, M. and Z. Nusser (2005). "Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors." Nat Rev Neurosci **6**(3): 215-229.
49. Ficher, M. and E. Steinberger (1971). "In vitro progesterone metabolism by rat testicular tissue at different stages of development." Acta Endocrinol (Copenh) **68**(2): 285-292.
50. Fiset, P., T. Paus, T. Daloz, G. Plourde, P. Meuret, V. Bonhomme, N. Hajj-Ali, S. B. Backman and A. C. Evans (1999). "Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study." Journal of Neuroscience **19**(13): 5506-5513.
51. Forman, S. A. and K. W. Miller (2016). "Mapping general anesthetic sites in heteromeric gamma-aminobutyric acid type a receptors reveals a potential for targeting receptor subtypes." Anesthesia and analgesia **123**(5): 1263.
52. Franks, N. P. and W. R. Lieb (1998). "Which molecular targets are most relevant to general anaesthesia?" Toxicol Lett **100-101**: 1-8.
53. Fritschy, J. M. and P. Panzanelli (2014). "GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system." Eur J Neurosci **39**(11): 1845-1865.
54. Gähwiler, B. (1981). "Organotypic monolayer cultures of nervous tissue." Journal of neuroscience methods **4**(4): 329-342.
55. Gähwiler, B., M. Capogna, D. Debanne, R. McKinney and S. Thompson (1997). "Organotypic slice cultures: a technique has come of age." Trends in neurosciences **20**(10): 471-477.
56. Garcia, P. S., S. E. Kolesky and A. Jenkins (2010). "General anesthetic actions on GABAA receptors." Current neuropharmacology **8**(1): 2.
57. Glykys, J., E. O. Mann and I. Mody (2008). "Which GABAA receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus?" Journal of Neuroscience **28**(6): 1421-1426.

58. Glykys, J. and I. Mody (2006). "Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABAA receptor $\alpha 5$ subunit-deficient mice." Journal of neurophysiology **95**(5): 2796-2807.
59. Glykys, J. and I. Mody (2007). "The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus." The Journal of physiology **582**(3): 1163-1178.
60. Grasshoff, C. and B. Antkowiak (2004). "Propofol and Sevoflurane Depress Spinal Neurons In Vitro via Different Molecular Targets." Anesthesiology **101**(5): 1167-1176.
61. Grasshoff, C., N. Netzhammer, J. Schweizer, B. Antkowiak and H. Hentschke (2008). "Depression of spinal network activity by thiopental: shift from phasic to tonic GABAA receptor-mediated inhibition." Neuropharmacology **55**(5): 793-802.
62. Grasshoff, C., U. Rudolph and B. Antkowiak (2005). "Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept." Curr Opin Anaesthesiol **18**(4): 386-391.
63. Gredell, J., P. Turnquist, M. Maciver and R. Pearce (2004). "Determination of diffusion and partition coefficients of propofol in rat brain tissue: implications for studies of drug action in vitro." British Journal of Anaesthesia **93**(6): 810-817.
64. Gyermek, L. and L. F. Soyka (1975). "Steroid anesthetics." Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists **42**(3): 331-344.
65. Hall, P. F. (1985). Role of cytochromes P-450 in the biosynthesis of steroid hormones. Vitamins & Hormones, Elsevier. **42**: 315-368.
66. Harney, S. C., B. G. Frenguelli and J. J. Lambert (2003). "Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones." Neuropharmacology **45**(6): 873-883.
67. Harris, B. D., G. Wong, E. J. Moody and P. Skolnick (1995). "Different subunit requirements for volatile and nonvolatile anesthetics at gamma-aminobutyric acid type A receptors." Mol Pharmacol **47**(2): 363-367.
68. Harris, R. A., S. J. Mihic, S. Brozowski, K. Hadingham and P. J. Whiting (1997). "Ethanol, flunitrazepam, and pentobarbital modulation of GABAA receptors expressed in mammalian cells and *Xenopus* oocytes." Alcoholism: Clinical and Experimental Research **21**(3): 444-451.
69. Harrison, N. L. and M. A. Simmonds (1984). "Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic." Brain research **323**(2): 287-292.
70. Hentschke, H., C. Schwarz and B. Antkowiak (2005). "Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression

- of firing rates and increase of GABAA receptor-mediated inhibition." European Journal of Neuroscience **21**(1): 93-102.
71. Herd, M. B., D. Belelli and J. J. Lambert (2007). "Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors." Pharmacol Ther **116**(1): 20-34.
 72. Herd, M. B., D. Belelli and J. J. Lambert (2007). "Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors." Pharmacology & therapeutics **116**(1): 20-34.
 73. Hernández-Reyes, J. E., A. B. Salinas-Abarca, G. C. Vidal-Cantú, G. Raya-Tafolla, D. Elias-Viñas, V. Granados-Soto and R. Delgado-Lezama (2019). "α5GABAA receptors play a pronociceptive role and avoid the rate-dependent depression of the Hoffmann reflex in diabetic neuropathic pain and reduce primary afferent excitability." Pain **160**(6): 1448-1458.
 74. Holopainen, I. and H. Lauren (2003). "Neuronal activity regulates GABAA receptor subunit expression in organotypic hippocampal slice cultures." Neuroscience **118**(4): 967-974.
 75. Hosie, A. M., S. D. Buckingham, A. Hamon and D. B. Sattelle (2006). "Replacement of asparagine with arginine at the extracellular end of the second transmembrane (M2) region of insect GABA receptors increases sensitivity to penicillin G." Invert Neurosci **6**(2): 75-79.
 76. Hosie, A. M., L. Clarke, H. da Silva and T. G. Smart (2009). "Conserved site for neurosteroid modulation of GABAA receptors." Neuropharmacology **56**(1): 149-154.
 77. Hosie, A. M., M. E. Wilkins, H. M. da Silva and T. G. Smart (2006). "Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites." Nature **444**(7118): 486-489.
 78. Hosie, A. M., M. E. Wilkins and T. G. Smart (2007). "Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors." Pharmacol Ther **116**(1): 7-19.
 79. Houston, C. M., T. P. McGee, G. MacKenzie, K. Troyano-Cuturi, P. M. Rodriguez, E. Kutsarova, E. Diamanti, A. M. Hosie, N. P. Franks and S. G. Brickley (2012). "Are extrasynaptic GABAA receptors important targets for sedative/hypnotic drugs?" Journal of Neuroscience **32**(11): 3887-3897.
 80. Jacob, T. C., S. J. Moss and R. Jurd (2008). "GABA A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition." Nature Reviews Neuroscience **9**(5): 331-343.
 81. Jacob, T. C., S. J. Moss and R. Jurd (2008). "GABA A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition." Nature Reviews Neuroscience **9**(5): 331.

82. Jefcoate, C. (2002). "High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex." The Journal of clinical investigation **110**(7): 881-890.
83. Jordan, L. M., J. R. McVagh, B. R. Noga, A. M. Cabaj, H. Majczyński, U. Sławińska, J. Provencher, H. Leblond and S. Rossignol (2014). "Cholinergic mechanisms in spinal locomotion-potential target for rehabilitation approaches." Front Neural Circuits **8**: 132.
84. Jurd, R., M. Arras, S. Lambert, B. Drexler, R. Siegwart, F. Crestani, M. Zaugg, K. E. Vogt, B. Ledermann and B. Antkowiak (2003). "General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABAA receptor β 3 subunit." The FASEB Journal **17**(2): 250-252.
85. Kaneda, M., M. Farrant and S. G. Cull-Candy (1995). "Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum." J Physiol **485** (Pt 2): 419-435.
86. Kim, J., A. Yao, R. Atherley, E. Carstens, S. L. Jinks and J. F. Antognini (2007). "Neurons in the ventral spinal cord are more depressed by isoflurane, halothane, and propofol than are neurons in the dorsal spinal cord." Anesthesia and analgesia **105**(4): 1020.
87. Kozlov, A., M. Angulo, E. Audinat and S. Charpak (2006). "Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(26): 10058-10063.
88. Kullmann, D. M., A. Ruiz, D. M. Rusakov, R. Scott, A. Semyanov and M. C. Walker (2005). "Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why?" Progress in biophysics and molecular biology **87**(1): 33-46.
89. Kumar, S., R. L. Fleming and A. L. Morrow (2004). "Ethanol regulation of gamma-aminobutyric acid A receptors: genomic and nongenomic mechanisms." Pharmacol Ther **101**(3): 211-226.
90. Kungys, G., J. Kim, S. L. Jinks, R. J. Atherley and J. F. Antognini (2009). "Propofol produces immobility via action in the ventral horn of the spinal cord by a GABAergic mechanism." Anesthesia and analgesia **108**(5): 1531.
91. Labombarda, F., A. M. Ghomari, P. Liere, A. F. De Nicola, M. Schumacher and R. Guennoun (2013). "Neuroprotection by steroids after neurotrauma in organotypic spinal cord cultures: A key role for progesterone receptors and steroidal modulators of GABAA receptors." Neuropharmacology **71**: 46-55.
92. Lambert, J. J., D. Belelli, C. Hill-Venning and J. A. Peters (1995). "Neurosteroids and GABAA receptor function." Trends in pharmacological sciences **16**(9): 295-303.

93. Lambert, J. J., D. Belelli, D. R. Peden, A. W. Vardy and J. A. Peters (2003). "Neurosteroid modulation of GABAA receptors." Prog Neurobiol **71**(1): 67-80.
94. Lambert, J. J., M. A. Cooper, R. D. Simmons, C. J. Weir and D. Belelli (2009). "Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABAA receptors." Psychoneuroendocrinology **34**: S48-S58.
95. Li, P., J. Bracamontes, B. Manion, S. Mennerick, J. Steinbach, A. Evers and G. Akk (2014). "The neurosteroid 5 β -pregnan-3 α -ol-20-one enhances actions of etomidate as a positive allosteric modulator of α 1 β 2 γ 2 L GABAA receptors." British journal of pharmacology **171**(23): 5446-5457.
96. Liu, Q.-Y., A. E. Schaffner, Y. H. Chang, D. Maric and J. L. Barker (2000). "Persistent Activation of GABAARceptor/Cl⁻ Channels by Astrocyte-Derived GABA in Cultured Embryonic Rat Hippocampal Neurons." Journal of neurophysiology **84**(3): 1392-1403.
97. Luscher, B., T. Fuchs and C. L. Kilpatrick (2011). "GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses." Neuron **70**(3): 385-409.
98. Madsen, K. K., B. Ebert, R. P. Clausen, P. Krogsgaard-Larsen, A. Schousboe and H. S. White (2011). "Selective GABA transporter inhibitors tiagabine and EF1502 exhibit mechanistic differences in their ability to modulate the ataxia and anticonvulsant action of the extrasynaptic GABAA receptor agonist gaboxadol." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **338**(1): 214-219.
99. Magloire, V. and J. Streit (2009). "Intrinsic activity and positive feedback in motor circuits in organotypic spinal cord slice cultures." European journal of neuroscience **30**(8): 1487-1497.
100. Maguire, J. L., B. M. Stell, M. Rafizadeh and I. Mody (2005). "Ovarian cycle-linked changes in GABA A receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety." Nature neuroscience **8**(6): 797-804.
101. Marx, C. E., W. T. Trost, L. J. Shampine, R. D. Stevens, C. M. Hulette, D. C. Steffens, J. F. Ervin, M. I. Butterfield, D. G. Blazer and M. W. Massing (2006). "The neurosteroid allopregnanolone is reduced in prefrontal cortex in Alzheimer's disease." Biological Psychiatry **60**(12): 1287-1294.
102. McEwen, B. S., H. Coirini and M. Schumacher (1990). "Steroid effects on neuronal-activity—when is the genome involved." Steroids and neuronal activity **153**: 3-21.
103. Mellon, S. H. and L. D. Griffin (2002). "Neurosteroids: biochemistry and clinical significance." Trends in endocrinology & metabolism **13**(1): 35-43.
104. Mellon, S. H., L. D. Griffin and N. A. Compagnone (2001). "Biosynthesis and action of neurosteroids." Brain research reviews **37**(1-3): 3-12.

105. Michels, G. and S. J. Moss (2007). "GABAA receptors: properties and trafficking." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **42**(1): 3-14.
106. Midzak, A., M. Rone, Y. Aghazadeh, M. Culty and V. Papadopoulos (2011). "Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria." Molecular and cellular endocrinology **336**(1-2): 70-79.
107. Miller, P. S. and T. G. Smart (2010). "Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors." Trends in pharmacological sciences **31**(4): 161-174.
108. Minier, F. and E. Sigel (2004). "Positioning of the α -subunit isoforms confers a functional signature to γ -aminobutyric acid type A receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(20): 7769-7774.
109. Mitchell, E. A., L. J. Gentet, J. Dempster and D. Belelli (2007). "GABAA and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids." J Physiol **583**(Pt 3): 1021-1040.
110. Mody, I., Y. De Koninck, T. S. Otis and I. Soltesz (1994). "Bridging the cleft at GABA synapses in the brain." Trends Neurosci **17**(12): 517-525.
111. Mody, I. and R. A. Pearce (2004). "Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors." Trends in neurosciences **27**(9): 569-575.
112. Mohler, H., J. M. Fritschy, F. Crestani, T. Hensch and U. Rudolph (2004). "Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy." Biochem Pharmacol **68**(8): 1685-1690.
113. Moss, S. J. and T. G. Smart (2001). "Constructing inhibitory synapses." Nature Reviews Neuroscience **2**(4): 240-250.
114. Nelson, L., T. Guo, J. Lu, C. Saper, N. Franks and M. Maze (2002). "The sedative component of anesthesia is mediated by GABA A receptors in an endogenous sleep pathway." Nature neuroscience **5**(10): 979-984.
115. Noorbakhsh, F., G. B. Baker and C. Power (2014). "Allopregnanolone and neuroinflammation: a focus on multiple sclerosis." Frontiers in cellular neuroscience **8**: 134.
116. Nusser, Z. and I. Mody (2002). "Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells." J Neurophysiol **87**(5): 2624-2628.
117. Olsen, R. W. (2018). "GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators." Neuropharmacology **136**(Pt A): 10-22.
118. Olsen, R. W. and W. Sieghart (2008). "International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis

- of subunit composition, pharmacology, and function. Update." Pharmacological reviews.
119. Paul, S. M. and R. Purdy (1992). "Neuroactive steroids." The FASEB Journal **6**(6): 2311-2322.
120. Pelletier, G. (2010). "Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects." Prog Brain Res **181**: 193-207.
121. Peters, J. A., T. G. Hales and J. L. Jeremy (2005). "Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from the 5-HT₃ receptor." Trends in pharmacological sciences **26**(11): 587-594.
122. Pirker, S., C. Schwarzer, A. Wieselthaler, W. Sieghart and G. Sperk (2000). "GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain." Neuroscience **101**(4): 815-850.
123. Porcello, D. M., M. M. Huntsman, R. M. Mihalek, G. E. Homanics and J. R. Huguenard (2003). "Intact synaptic GABAergic inhibition and altered neurosteroid modulation of thalamic relay neurons in mice lacking delta subunit." J Neurophysiol **89**(3): 1378-1386.
124. Prenosil, G. A., E. M. Schneider Gasser, U. Rudolph, R. Keist, J.-M. Fritschy and K. E. Vogt (2006). "Specific subtypes of GABAA receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons." Journal of neurophysiology **96**(2): 846-857.
125. Puia, G., I. Ducić, S. Vicini and E. Costa (1993). "Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABAA receptor subunit composition?" Receptors & channels **1**(2): 135-142.
126. Purdy, R. H., A. L. Morrow, P. H. Moore, Jr. and S. M. Paul (1991). "Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4553-4557.
127. Rajasekaran, K., S. Joshi, C. Sun, Z. Mtchedlishvili and J. Kapur (2010). "Receptors with low affinity for neurosteroids and GABA contribute to tonic inhibition of granule cells in epileptic animals." Neurobiology of disease **40**(2): 490-501.
128. Ramakrishnan, L. and G. P. Hess (2010). "Mechanism of potentiation of a dysfunctional epilepsy-linked mutated GABAA receptor by a neurosteroid (3 α , 21-dihydroxy-5 α -pregnan-20-one): transient kinetic investigations." Biochemistry **49**(36): 7892-7901.
129. Rampil, I. J., P. Mason and H. Singh (1993). "Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat." Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists **78**(4): 707-712.

130. Reddy, D. S. and M. A. Rogawski (2002). "Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABAA receptor function and seizure susceptibility." Journal of Neuroscience **22**(9): 3795-3805.
131. Rehberg, B. and D. S. Duch (1999). "Suppression of central nervous system sodium channels by propofol." The Journal of the American Society of Anesthesiologists **91**(2): 512-520.
132. Richerson, G. B. and Y. Wu (2003). "Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore." Journal of Neurophysiology **90**(3): 1363-1374.
133. Rone, M. B., J. Fan and V. Papadopoulos (2009). "Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids **1791**(7): 646-658.
134. Rupprecht, R., J. M. Reul, T. Trapp, B. van Steensel, C. Wetzel, K. Damm, W. Zieglgansberger and F. Holsboer (1993). "Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids." Neuron **11**(3): 523-530.
135. Sayeed, I., Q. Guo, S. W. Hoffman and D. G. Stein (2006). "Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion." Annals of emergency medicine **47**(4): 381-389.
136. Schumacher, M., C. Mattern, A. Ghoumari, J. Oudinet, P. Liere, F. Labombarda, R. Sitruk-Ware, A. F. De Nicola and R. Guennoun (2014). "Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors." Progress in neurobiology **113**: 6-39.
137. Schumacher, M., S. Weill-Engerer, P. Liere, F. Robert, R. Franklin, L. M. Garcia-Segura, J. J. Lambert, W. Mayo, R. Melcangi and A. Parducz (2003). "Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system." Progress in neurobiology **71**(1): 3-29.
138. Seeger, T., F. Worek, L. Szinicz and H. Thiermann (2007). "Reevaluation of indirect field stimulation technique to demonstrate oxime effectiveness in OP-poisoning in muscles in vitro." Toxicology **233**(1-3): 209-213.
139. Selye, H. (1941). "Anesthetic effect of steroid hormones." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **46**(1): 116-121.
140. Semyanov, A., M. C. Walker, D. M. Kullmann and R. A. Silver (2004). "Tonically active GABAA receptors: modulating gain and maintaining the tone." Trends in neurosciences **27**(5): 262-269.

141. Sieghart, W. (2015). "Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites." Advances in Pharmacology **72**: 53-96.
142. Simon, J., H. Wakimoto, N. Fujita, M. Lalande and E. A. Barnard (2004). "Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome." J Biol Chem **279**(40): 41422-41435.
143. Simpson, E. R. and M. R. Waterman (1983). "Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex." Canadian journal of biochemistry and cell biology **61**(7): 692-707.
144. Sine, S. M. and A. G. Engel (2006). "Recent advances in Cys-loop receptor structure and function." Nature **440**(7083): 448.
145. Smith, S. S., Q. H. Gong, X. Li, M. H. Moran, D. Bitran, C. A. Frye and F.-C. Hsu (1998). "Withdrawal from 3 α -OH-5 α -Pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABA receptor α 4 subunit in association with increased anxiety." Journal of Neuroscience **18**(14): 5275-5284.
146. Smith, S. S., H. Shen, Q. H. Gong and X. Zhou (2007). "Neurosteroid regulation of GABAA receptors: Focus on the α 4 and δ subunits." Pharmacology & therapeutics **116**(1): 58-76.
147. Spenger, C., U. F. Braschler, J. Streit and H. R. Lüscher (1991). "An organotypic spinal cord-dorsal root ganglion-skeletal muscle coculture of embryonic rat. I. The morphological correlates of the spinal reflex arc." European Journal of Neuroscience **3**(11): 1037-1053.
148. Spigelman, I., Z. Li, J. Liang, E. Cagetti, S. Samzadeh, R. M. Mihalek, G. E. Homanics and R. W. Olsen (2003). "Reduced inhibition and sensitivity to neurosteroids in hippocampus of mice lacking the GABAA receptor δ subunit." Journal of neurophysiology **90**(2): 903-910.
149. Stell, B. M., S. G. Brickley, C. Tang, M. Farrant and I. Mody (2003). "Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by δ subunit-containing GABAA receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(24): 14439-14444.
150. Streit, J., C. Spenger and H. R. Lüscher (1991). "An Organotypic Spinal Cord - Dorsal Root Ganglion - Skeletal Muscle Coculture of Embryonic Rat. II. Functional Evidence for the Formation of Spinal Reflex Arcs In Vitro." Eur J Neurosci **3**(11): 1054-1068.
151. Takahashi, A., T. Mashimo and I. Uchida (2006). "GABAergic tonic inhibition of substantia gelatinosa neurons in mouse spinal cord." Neuroreport **17**(12): 1331-1335.
152. The, V. L., Y. Lachance, C. Labrie, G. Leblanc, J. L. Thomas, R. C. Strickler and F. Labrie (1989). "Full Length cDNA Structure and Deduced Amino Acid

- Sequence of Human β -Hydroxy-5-Ene Steroid Dehydrogenase." Molecular Endocrinology **3**(8): 1310-1312.
153. Twyman, R. and R. Macdonald (1992). "Neurosteroid regulation of GABAA receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture." The Journal of physiology **456**(1): 215-245.
154. Uchida, H., K. Kishikawa and J. Collins (1995). "Effect of propofol on spinal dorsal horn neurons: comparison with lack of ketamine effects." The Journal of the American Society of Anesthesiologists **83**(6): 1312-1320.
155. Vautrin, J., A. E. Schaffner and J. L. Barker (1994). "Fast presynaptic GABAA receptor-mediated Cl⁻conductance in cultured rat hippocampal neurones." The Journal of physiology **479**(1): 53-63.
156. Wang, J. M., C. Singh, L. Liu, R. W. Irwin, S. Chen, E. J. Chung, R. F. Thompson and R. D. Brinton (2010). "Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(14): 6498-6503.
157. Wohlfarth, K. M., M. T. Bianchi and R. L. Macdonald (2002). "Enhanced neurosteroid potentiation of ternary gabaareceptors containing the δ subunit." Journal of Neuroscience **22**(5): 1541-1549.
158. Wu, Z., Z. Guo, M. Gearing and G. Chen (2014). "Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model." Nature communications **5**(1): 1-13.
159. Yip, G. M., Z.-W. Chen, C. J. Edge, E. H. Smith, R. Dickinson, E. Hohenester, R. R. Townsend, K. Fuchs, W. Sieghart and A. S. Evers (2013). "A propofol binding site on mammalian GABA A receptors identified by photolabeling." Nature chemical biology **9**(11): 715.
160. Zeilhofer, H. U., H. Wildner and G. E. Yévenes (2012). "Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control." Physiol Rev **92**(1): 193-235.
161. Zoccolan, D. F., F. FURLAN and L. Ballerini (2004). "Interneurone bursts are spontaneously associated with muscle contractions only during early phases of mouse spinal network development: a study in organotypic cultures."

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Studie wurde an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Antkowiak durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. Antkowiak.

Die Herstellung und Pflege der organotypischen Kulturen wurde von mir in Zusammenarbeit mit den Labormitgliedern Herrn Professor Dr. Antkowiak, Frau Holt, Frau Pappe und Frau Streißenberger durchgeführt.

Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Holt und Frau Pappe wurden die Experimente von mir durchgeführt. Für die Whole-cell Voltage-clamp-Experimente erfolgte die Einarbeitung durch Herrn Dr. Hentschke.

Nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Holt und Herrn Dr. Hentschke erfolgte die Datenanalyse durch mich. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Antkowiak und Herrn Dr. Hentschke.

Die Daten-Recherche erfolgte überwiegend durch mich und ergänzend durch Herrn Professor Dr. Antkowiak.

Die Abbildungen 1-6, 9-13, 18 und 21 wurden durch mich erstellt. Abbildung 7 wurde nach Gähwiler (1997) modifiziert. Abbildung 8 wurde freundlicherweise von den Autoren bereitgestellt und von mir modifiziert. Die Abbildungen 14-18, 20-21, 23-25, 27-28 wurden mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Antkowiak und Frau Holt erstellt und von mir modifiziert. Abbildung 26 wurde aus früheren Experimenten der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und von mir modifiziert.

Die Veröffentlichung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. Drexler, Herrn Professor Dr. Grasshoff und Herrn Professor Dr. Antkowiak verfasst.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig und nach Anleitung durch Professor Dr. Antkowiak verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Heidelberg, den 07.05.2021

8 Veröffentlichungen

Ein Teil der Arbeit wurde bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Drexler, B., J. Grenz, C. Grasshoff and B. Antkowiak (2020). "Allopregnanolone Enhances GABAergic Inhibition in Spinal Motor Networks." International Journal of Molecular Sciences **21**(19): 7399.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir für das Gelingen dieser Arbeit behilflich waren.

Zuerst gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Antkowiak für die Überlassung des Themas sowie der Betreuung der Arbeit. Er stand stets sowohl während der Durchführung der Experimente als auch während des Verfassens der Dissertation mit Ratschlägen bereit.

Ich möchte mich bei der gesamten Sektion für Experimentelle Anästhesiologie für die nette Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Vielen Dank an Frau Holt und Frau Pappe, die mich in die Technik der Extrazellulärableitungen und Videomikroskopie eingearbeitet haben und immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Harald Hentschke für die sehr gute Einarbeitung in der Durchführung und Auswertung der Patch-Clamp-Experimente sowie für die gute Einführung in Matlab.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, Frieda Grenz, für die langjährige Unterstützung bedanken. Vielen Dank auch an Michael Ramjoué für die Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.