

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin

**Auswirkung von Inflammation auf die Expression von  
Adenosinrezeptoren und die spontane Netzwerkaktivität  
im Kortex von Mäusen**

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

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

**vorgelegt von**

**Bleier, Lukas**

**2020**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Grasshoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Garaschuk

Tag der Disputation: 08.01.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Anästhetika . . . . .	1
1.1.1	Einführung . . . . .	1
1.1.2	Die Anästhesietiefe beeinflusst das Patientenwohl . . . . .	3
1.1.3	Der Bedarf von Anästhetika variiert individuell . . . . .	4
1.1.4	Die Wirkung von Anästhetika wird durch Inflammation beeinflusst	5
1.2	Adenosin . . . . .	6
1.2.1	Einführung . . . . .	6
1.2.2	Einfluss von Adenosin auf Vigilanz und das Schlafverhalten . . .	7
1.2.3	Interaktion von Adenosin mit der Wirkung von Anästhetika . . .	8
1.2.4	Adenosin als Neuromodulator . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Zymosan A Modell . . . . .	12
2.1.1	Behandlung der Versuchstiere und Gewebegewinnung . . . . .	12
2.1.2	Evaluation Entzündungsmodell . . . . .	13
2.1.3	Messung der Adenosinrezeptorexpression . . . . .	14
2.2	Plasmid-Modell . . . . .	15
2.2.1	Herstellung von organotypischen Kortexkulturen . . . . .	15
2.2.2	Plasmidtransfektion . . . . .	16
2.2.3	Evaluation der Adenosinrezeptorüberexpression . . . . .	19
2.2.4	Elektrophysiologie . . . . .	19
2.3	Statistik und Grafiken . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Zymosan-Modell . . . . .	24
3.1.1	Evaluierung der Entzündungsreaktion . . . . .	24
3.1.2	Expression der Adenosinrezeptoren nach Zymosanexposition . .	24

3.2	Plasmid Modell . . . . .	28
3.2.1	Evaluation der Überexpression von Adenosinrezeptoren . . . . .	28
3.2.2	Versuchsreihe Adenosinantagonist . . . . .	30
3.2.3	Effekte der externen Applikation von Adenosin auf die spontane Aktionspotentialaktivität . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Einfluss von Inflammation auf die Adenosinrezeptorexpression . . . . .	50
4.1.1	Evaluation der Entzündungsinduktion durch Zymosan . . . . .	50
4.1.2	Veränderung der Adenosinrezeptorexpression im Kortex nach Induktion einer peripheren Inflammation . . . . .	50
4.2	Die Rolle von Adenosinrezeptoren in neuronalen Netzwerken . . . . .	53
4.2.1	Intrinsisches Adenosin moduliert neuronale Netzwerkaktivität in organotypischen Kulturen des Neokortex . . . . .	54
4.2.2	Externe Zugabe von Adenosin hemmt neokortikale Netzwerkaktivität . . . . .	55
4.3	Einfluss einer erhöhten Expression von Adenosinrezeptoren auf neuronale Netzwerke . . . . .	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b>	<b>75</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>76</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Schema Erstellung Kortexkulturen . . . . .	17
2.2	Auswertung der elektrophysiologischen Experimente . . . . .	21
3.1	MPO-Aktivität und Zellzahl . . . . .	25
3.2	Adenosinrezeptorexpression nach zwei und vier Stunden Zymosanexposition . . . . .	26
3.3	Effektstärke der veränderten Adenosinrezeptorexpression nach zwei und vier Stunden Zymosanexposition . . . . .	27
3.4	Plasmid-A1R/A2a Evaluation mittels PCR . . . . .	29
3.5	Plasmidevaluation mittels Immunfluoreszenz: A3R-Plasmid vs. Leerplasmid . . . . .	29
3.6	Rohdaten DPCPX-Gabe bei A1-Transf . . . . .	31
3.7	DPCPX-Gabe bei A1-Transfektion: Burstlänge, Burstrate und relative Zeit in Bursts . . . . .	32
3.8	DPCPX-Gabe bei A1-Transfektion: Dauer der Ruhephase, relative Zeit in Bursts . . . . .	33
3.9	DPCPX-Gabe bei A1-Transfektion: Effektstärke . . . . .	35
3.10	DPCPX-Gabe bei A1-Transfektion: Interaktionseffekt . . . . .	35
3.11	Rohdaten Adenosin-Gabe bei A1-Transfektion . . . . .	37
3.12	Adenosin-Gabe bei A1-Transfektion: Burstlänge, Burstrate und Eventrate . . . . .	38
3.13	Adenosin-Gabe bei A1-Transfektion: Dauer der Ruhephasen und relative Zeit in Bursts . . . . .	39
3.14	Adenosin-Gabe bei A1-Transfektion: Effektstärke . . . . .	40
3.15	Adenosin-Gabe bei A1-Transfektion: Interaktionseffekt . . . . .	42
3.16	Adenosin-Gabe bei A1-Transfektion: Interaktionsgrafik . . . . .	43
3.17	Adenosin-Gabe bei A2a-Transfektion: Burstlänge, Burstrate und Aktionspotentialrate . . . . .	45

3.18 Adenosin-Gabe bei A2a-Transfektion: Dauer der Ruhephase und relative Zeit in Bursts . . . . .	46
3.19 Adenosin-Gabe bei A2a-Transfektion: Effektstärke . . . . .	47

# Tabellenverzeichnis

1.1	Anästhetika Einteilung . . . . .	2
1.2	Adenosinrezeptorsubtypen . . . . .	7
2.1	Zusammensetzung des Nährmediums . . . . .	16

# Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP	Aktionspotential
ATBS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ATP	Adenosintriphosphat
AUROC	Area under the Receiver Operating Curve
BIS	Bispectral Index
EEG	Elektroenzephalographie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP	green fluorescent protein
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel
IL	Interleukin
Kon.	Kontrollgruppe
LFP	Local field potential
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	minimale alveoläre Konzentration
MMST	Mini-Mental-Status-Test
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphate-buffered saline
R	Rezeptor
RP	Rezeptorplasmid
TLR	Toll-like Rezeptor



# 1 Einleitung

Häufig sind Patienten durch Operationen oder Infektionen inflammatorischen Stimuli ausgesetzt, wodurch sich der Anästhetikabedarf ändern kann. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass eine zu tiefe Narkose mit einer erhöhten Mortalität nach chirurgischen Eingriffen korreliert. Um eine korrekte Steuerung der Anästhesietiefe zu ermöglichen und damit das Outcome von Patienten zu verbessern, ist es daher nötig, die molekulargenetischen Grundlagen dieser veränderten Anästhetikatoleranz bei Inflammation zu verstehen. Adenosin ist an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt und reguliert die Vigilanz. Bei Inflammation wird der Adenosinstoffwechsel im zentralen Nervensystem verändert, weshalb auch ein Einfluss auf die Adenosinrezeptorexpression im Kortex denkbar ist. Somit könnte eine veränderte Adenosinrezeptorexpression im Kortex der Vermittler einer veränderten Anästhetikatoleranz bei Inflammation sein. Um sich dieser Fragestellung zu nähern, wurde in dieser Arbeit zunächst in einem in vivo Versuch die Auswirkung von Inflammation auf die Adenosinrezeptorexpression im Kortex von Mäusen untersucht. In einem zweiten Schritt wurde dann die Auswirkungen einer veränderten Adenosinrezeptorexpression auf die spontane Netzwerkaktivität in organotypischen Kulturen von Mäusen getestet.

## 1.1 Anästhetika

### 1.1.1 Einführung

Als 1846 der Zahnarzt William Thomas Morton der Einladung des Chirurgen John Collins Warren folgte und die erste öffentliche Demonstration einer Narkose durchführte, wurde der Grundstein für das Fachgebiet der Anästhesie gelegt. Allgemeinanästhetika bewirken

eine Sedierung, Hypnose und Amnesie. Anästhetika modulieren Ionenkanäle und Rezeptoren im Zentralen Nervensystem. Die molekularen Zielstrukturen sind nicht bei allen Anästhetika gleich. Auch Wirkprofil und Applikationsart sind unterschiedlich. Anhand dieser Kriterien lassen sich Anästhetika in drei Gruppen grob charakterisieren. Diese sind vereinfacht in Tabelle 1.1 modifiziert nach Solt et al. (2007) aufgeführt.

**Tabelle 1.1** – Anästhetika Einteilung

<b>Gruppe</b>	<b>Anästhetika (Beispiele)</b>	<b>Hauptwirkung</b>	<b>wichtige molekulare Zielstrukturen</b>
1	Etomidat, Propofol, Phenobarbital	Hypnose, Amnesie, Verlangsamung EEG, schwache Immobilisierung	GABA-A R.
2	Ketamin, Xenon, Cyclopropan	v.a. Analgesie, schwache Hypnose und Immobilisierung	NMDA-R., AMPA-R., Neuronale nACh R., K-Kanäle
3	Isofluran, Sevofluran, Desflurane, Halothan, Chloroform	Hypnose, Amnesie, Immobilisierung, Verlangsamung EEG	GABA-A R., Glycine-R., Glutamat-R., neuronale nACh-R u. a.

Anästhetika aus Gruppe eins und drei wirken komplett oder teilweise, indem sie am Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor binden und modulieren. Dadurch verstärken diese Anästhetika die Wirkung von GABA. Zu einer GABA-Ausschüttung kommt es an den Synapsen einer präsynaptischen Zelle durch den Calciumeinstrom, der auf ein Aktionspotential folgt. GABA bindet dann an der postsynaptischen Membran an GABA-Rezeptoren, an denen, wie oben beschrieben auch Anästhetika binden können. Die Konformationsänderung am Rezeptor durch GABA bewirkt einen Einstrom negativer Chloridionen in die postsynaptische Zelle und bewirkt so eine Hyperpolarisation. Diese führt wiederum zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle. Außerdem bewirkt GABA eine sogenannte Shunting-Inhibition. Dabei kommt es durch das Öffnen von Ionenkanäle zu einem verminderten Membranwiderstand beziehungsweise zu einer erhöhten Membranleitfähigkeit. Dies führt zu einer Abschwächung von depolarisierenden Strömen durch vermehrten Einstrom von Chloridionen. Die Multiple Site- Multiple Mechanism Theorie differenziert die Wirkung von Anästhetika noch genauer (Grasshoff et al., 2005). Die Theorie besagt, dass Anästhetika ihre Wirkung an unterschiedlichen Strukturen des zen-

tralen Nervensystems entfalten (Multiple Site). Zudem zeigen die Autoren, dass Amnesie, Hypnose und Immobilität durch die Beeinflussung unterschiedlicher molekularen Zielstrukturen vermittelt werden (Multiple Mechanism). So vermitteln sowohl volatile als auch intravenöse Anästhetika ihre sedierende Wirkung über Beeinflussung neokortikaler (Hentschke et al. (2005a), Heinke et al. (2004))  $\beta$ 2-GABA-A-Rezeptoren (Reynolds et al., 2003) und eine schlaffördernde Wirkung über neokortikale (Drexler et al., 2005)  $\beta$ 3-GABA-A-Rezeptoren (Reynolds et al., 2003). Dabei sei erwähnt, dass die nötigen Wirkspiegel sich je nach Anästhetikum stark unterscheiden. Immobilität scheint bei intravenösen Anästhetika hauptsächlich durch Aktivierung von  $\beta$ 3-GABA-A-Rezeptoren (Jurd et al., 2003) im Rückenmark (Sonner et al., 2003) vermittelt zu werden. Dagegen scheint die Immobilisierung bei Gabe von volatilen Anästhetika durch Interaktion mit weiteren molekularen Zielstrukturen wie Glycinrezeptoren (Zhang et al., 2003), Glutamatrezeptoren (Ishizaki et al., 1995) und Kaliumkanälen vom Typ TREK-1 (Torp et al., 1997) zu entstehen. Der Erfolg einer Anästhesie hängt entscheidend von der richtigen Narkosetiefe ab. Im folgenden Abschnitt werde ich darlegen, warum sowohl eine zu flache als auch eine zu tiefe Narkose eine Gefahr für den Patienten darstellt.

### **1.1.2 Die Anästhesietiefe beeinflusst das Patientenwohl**

Die Überwachung der Anästhesietiefe ist über eine Auswertung von Elektroenzephalographie(EEG)-Signalen möglich. Diese Technik wurde bisher vor allem in der Absicht benutzt, Awareness, also intraoperative Wachheit mit expliziter Erinnerung, zu vermeiden. Dabei kommt es aufgrund einer zu flachen Narkose dazu, dass der Patient seine Umgebung während einer Operation wahrnehmen und diese Wahrnehmung nach dem Ereignis erinnern kann. Intraoperative Wachheit mit explizierter Erinnerung als Folge tritt bei ca. 0.13% aller Allgemeinanästhesien auf (Sebel et al., 2004). Nach einer Studie von Lennmarken et al. (2002) entwickeln ca. 50% der betroffenen Patienten zwei Jahre nach einer Operation mit Erleben von Awareness eine Posttraumatische Belastungsstörung. Eine zu flache Narkose hat somit einen negativen Einfluss auf das Patientenwohl.

Die meisten Studien, die sich mit Anästhesietiefe beschäftigen, nutzen den Bispectral Index (BIS) Monitor (Medtronic-Covidien, Dublin, Irland). Der BIS Monitor nutzt EEG-Signale und errechnet daraus einen Parameter, der mit der Stärke der Sedierung und Bewusstseinsverlust korreliert (Leslie et al., 1995). Der Parameter wird als einheitslose Zahl

zwischen 0 und 100 angegeben, wobei ein Wert von 100 einen wachen Patienten repräsentiert und ein Wert von 0 bei isoelektrischen EEG-Signalen auftritt. In mehreren Studien, die den Zusammenhang zwischen Anästhesietiefe und postoperativer Langzeitmortalität untersuchten wurde der BIS Monitor zur Evaluation der Anästhesietiefe benutzt. Bei einer frühen prospektiven Studie zum Thema konnte durch eine Multivariatenanalyse gezeigt werden, dass die Einjahresmortalität in Abhängigkeit zur Zeitdauer intraoperativer tiefer Narkose ( $BIS < 45$ ) ansteigt (Monk et al., 2005). Retrospektive Analysen von Daten, die zur Überprüfung von Awarenessfällen gesammelt wurden, konnten die Ergebnisse teilweise bestätigen, beispielsweise bei Patienten nach kardialen Operationen (Kertai et al., 2010). Bei der retrospektiven Analyse einer Patientengruppe ohne kardiale Operationen konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen längeren Phasen tiefer Narkose und einer erhöhten Langzeitmortalität festgestellt werden (Kertai et al., 2011). Eine prospektive, randomisierte Studie zum Thema ist aktuell in Arbeit (Short et al., 2015). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine durch BIS kontrollierte Anästhesie seltener zu einem postoperativen Delir und seltener zu postoperativer zerebraler Dysfunktion kommt (Chan et al., 2013). Die Autoren vermuten als Grund dafür eine zu tiefe Anästhesie in der Kontrollgruppe. Dies begründen sie mit einem verminderten Bedarf an Anästhetika in der BIS kontrollierten Patientengruppe. Zudem hatten die Patienten, bei denen die Anästhesisten die BIS-Werte während der Narkose einsehen konnten, im Median höhere BIS-Werte. Sowohl eine zu flache als auch eine zu tiefe Narkose haben also einen Einfluss auf das Patientenwohl. Deshalb sind Unterschiede beim Bedarf an Anästhetika für eine sichere Narkose von großer Bedeutung.

### **1.1.3 Der Bedarf von Anästhetika variiert individuell**

Der Anästhetikabedarf von Menschen hängt von vielen Variablen ab. So konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl Alter als auch die Körpertemperatur Einfluss auf die minimale alveoläre Konzentration (MAC) von volatilen Anästhetika haben. Die MAC ist ein Maß, das die intraalveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikums angibt, die nötig ist, um bei 50 % der Individuen eines Kollektivs die gezielte Abwehrreaktion auf einen definierten Schmerzreiz (z.B. einen Bauchschnitt) zu unterdrücken, sie somit zu immobilisieren (Eger, 2001).

Auch beim intravenös verabreichten Propofol konnte ein altersabhängiger Effekt ge-

zeigt werden. Mit steigendem Alter wird im Durchschnitt weniger Propofol benötigt, um vergleichbare Sedations- beziehungsweise Anästhesietiefe zu erzielen. Weiterhin wird die Zeit, bis Patienten nach Beendigung der Applikation des Medikamentes wieder die Augen öffnen können verlängert (Kreuer et al., 2005).

Die MAC kann auch durch die gleichzeitige Applikation des Opioidanalgetikums Fentanyl signifikant verringert werden (Katoh und Ikeda, 1998). Auch die Schmerzwahrnehmung hat damit einen Einfluss auf den Anästhetikabedarf. Zudem gibt es einen Einfluss auf die Wirkung von Anästhetika durch die Ausschüttung bestimmter Neuromodulatoren. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter cholinergischer Tonus in organotypischen kortikalen Netzwerken zu einer verminderten Potenz und Effektivität intravenöser und volatiler Anästhetika führt (Grasshoff et al., 2007). Weiterhin konnte *in vivo* gezeigt werden, dass bei einer Verringerung cholinergischer Neurone im medialen Septum die Dosis von Isofluran zum Verlust des Aufrichtreflexes ("righting reflex") bei Ratten erniedrigt ist (Tai et al., 2014). Das Allgemeinanästhetikum Propofol vermindert die Ausschüttung von Acetylcholin im Frontalkortex und im Hippocampus (Kikuchi et al., 1998). Laalou et al. (2008) wiesen in einem *in vivo* Versuch mit Ratten nach, dass eine verminderte Anzahl cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn zu einer erhöhten Potenz von Propofol führt. In einer klinischen Studie konnten Laalou et al. (2010) zeigen, dass eine präoperativ verminderte Punktzahl im Mini-Mental-Status-Test (MMST) mit einem intraoperativ verminderten Propofolverbrauch korreliert. Der MMST ist ein Test zur Einschätzung kognitiver Defizite und wird als Screening-Verfahren zum Erkennen von Demenz und Alzheimer verwendet. Eine verminderte Punktzahl im MMST korreliert mit einem Verlust cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn (Schliebs und Arendt, 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch beim Menschen ein Verlust cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn zu einer verstärkten Propofolwirkung führt. Neben cholinergen Neuronen können auch histaminerge Neurone einen Einfluss auf die Wirkung von Anästhetika haben. Luo et al. (2011) konnten zeigen, dass durch eine verminderte Anzahl histaminerger Neurone im Nucleus Tuberosus bei Ratten eine geringere Dosis Isofluran zum Verlust des Aufrichtreflexes nötig ist. Auch die Wirkdauer von Isofluran war dadurch verlängert.

### **1.1.4 Die Wirkung von Anästhetika wird durch Inflammation beeinflusst**

Inflammation erhöht die Sensitivität für bestimmte Anästhetika. In vitro konnte dies anhand von kortikalen und hippokampalen Kulturen gezeigt werden (Avramescu et al., 2016). Die Autoren zeigten durch elektrophysiologische Messungen, dass nach Exposition der Kulturen mit dem Entzündungsmediator Interleukin-1- $\beta$  (IL-1- $\beta$ ) eine verstärkte Aktivierung der GABA-(A)-Rezeptoren durch die Anästhetika Etomidat und Isofluran erfolgt. Zudem konnten die Autoren verhaltensexperimentell eine erhöhte Anästhetikasensitivität bei Mäusen nachweisen, die mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) behandelt waren. Dabei wurde bei den behandelten Tieren ein schnellerer Wirkeintritt bei niedrigen Dosen von Etomidat und Isofluran beobachtet und eine deutliche Verringerung der Dosis bis zum Eintritt von Immobilität bei Etomidat. In einem normotensiven Sepsismodell bei Mäusen konnten Gill et al. (1995) zeigen, dass eine durch Sepsis verminderte MAC von Isofluran unabhängig von hämodynamischen Veränderungen auftritt. Diese Erkenntnis konnte durch Allaouchiche et al. (2001) bei normotensiven septischen Schweinen, die mit Sevofluran anästhesiert wurden, bestätigt werden.

In einem weiteren Sepsismodell mit Schweinen konnten bei septischen Tieren eine Verminderung der Infusionsrate von Propofol und Fentanyl zum Erreichen einer vorgegebenen Anästhesietiefe gezeigt werden (Bollen et al., 2007). Die klinische Erfahrung vieler Ärzte im intensivmedizinischen Bereich lässt diesen Zusammenhang auch beim Menschen vermuten. Die Zusammenhänge, die hinter diesem Phänomen stecken, sind bisher jedoch unklar. Im folgenden Abschnitt werde ich darlegen, dass Adenosin beziehungsweise die Aktivierung von Adenosinrezeptoren die Erregbarkeit von Zellen und die synaptische Übertragung zwischen Neuronen beeinflusst und somit indirekt die Wirksamkeit von Anästhetika beeinflussen kann. Zudem werde ich auf die Veränderung des Adenosinstoffwechsels durch Inflammation eingehen, weshalb gerade die Anästhetikawirkung während Entzündungszuständen maßgeblich durch Adenosin beeinflusst werden könnte.

## 1.2 Adenosin

### 1.2.1 Einführung

Als Nukleosid ist Adenosin essentieller Bestandteil aller lebenden Zellen. In der phosphorylierten Form Adenosintriphosphat (ATP) ist es als Energieträger an fast allen zellulären Aktivitäten beteiligt. Außerdem nimmt Adenosin eine wichtige Rolle als intra- und extrazellulärer Signalgeber ein. So ist beispielsweise bereits bekannt, dass Aktivierung von Adenosinrezeptoren Einfluss auf Herzfrequenz und Körpertemperatur nehmen kann (Yang et al., 2009). Außer auf das Herz-Kreislauf-System sind Wirkungen von Adenosin auch auf das Immunsystem und das Gehirn bekannt. Die Effekte auf das Gehirn sind schon lange das Ziel von Genußmitteln, so wirkt die weltweit am meisten eingenommene psychoaktive Substanz Koffein über die Antagonisierung von Adenosinrezeptoren (Fredholm et al., 1999).

Derzeit sind vier verschiedene Subtypen von Adenosinrezeptoren bekannt: A1, A2a, A2b und A3. Alle Subtypen besitzen sieben Transmembrandomänen und wirken über eine Kopplung an G-Proteine. Die Verteilung der Adenosinrezeptoren im Gehirn sowie deren Affinität zu Adenosin sind in Tabelle 1.2 (modifiziert nach Dunwiddie et al. (2001) und Fredholm et al. (2001)) aufgeführt.

**Tabelle 1.2** – Adenosinrezeptorsubtypen

Subtyp	Affinität	Expression und Verteilung im Gehirn
A1	hoch (70nM)	hoch in Kortex, Zerebellum, Hippocampus
A2a	hoch (150nM)	hoch in Striatum, tuberculum olfactorium, ansonsten niedrig
A2b	gering (5100nM)	niedrig
A3	gering (6500nM)	mittel in Zerebellum und Hippocampus, ansonsten niedrig

### 1.2.2 Einfluss von Adenosin auf Vigilanz und das Schlafverhalten

Adenosin kann schlaffördernd wirken. Ein starker Hinweis auf die Beteiligung des A1-Rezeptors ist die Tatsache, dass der A1-Rezeptor Antagonist Koffein schlafhemmend wirkt (Lin et al., 1997). Dies konnten Van Dort et al. (2009) in einer Studie mit Wildtyp-tieren durch Mikrodialyse von A1-Rezeptor Antagonisten und Agonisten in den Präfrontalkortex bestätigen.

Die Aktivität des Gehirns wird maßgeblich durch die Aktivität cholinerger Neurone des Mesencephalons und der Pons reguliert (Steriade et al., 1993). Diese Neurone sind vor allem bei aktiven Bewusstseinszuständen aktiv (Steriade et al., 1990). In vitro konnten Rainnie et al. (1994) zeigen, dass diese Neurone tonisch von Adenosin inhibiert werden. Dieser Effekt scheint über einwärts gerichtete Kaliumkanäle sowie über eine Hemmung von Ionenkanälen, die durch Hyperpolarisation aktiviert werden, zu entstehen.

Adenosin spielt in einer weiteren Hirnregion ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation des Schlaf-Wach- Rhythmus. Im basalen Vorderhirn konnte durch Mikrodialyse von Adenosin in Gebiete cholinerger Neuronen ein schlaffördernder Effekt und eine Hemmung von EEG-Signalen, die Erregung abbilden, erreicht werden (Portas et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Adenosinkonzentration im basalen Vorderhirn während längerer Wachphasen ansteigt und während Schlafphasen wieder sinkt (Porkka-Heiskanen et al., 1997). Eine Akkumulation von Adenosin im basalen Vorderhirn während längerer Wachphasen könnte somit zu einer Unterdrückung cholinergischer Neurone führen und wirkt dadurch erregungshemmend beziehungsweise schlaffördernd.

Auch im präfrontalen Kortex gibt es einen Zusammenhang zwischen Ausschüttung von Acetylcholin und EEG Aktivierung im Mausmodell (Douglas et al., 2002). Beim Menschen konnte nach Schlafentzug eine erhöhte A1-Rezeptor Konzentration im orbitofrontalen Kortex, einem Teil des präfrontalen Kortex, gezeigt werden (Elmenhorst et al., 2007). Van Dort et al. (2009) konnten zeigen, dass die Mikrodialyse von A1-Rezeptor-Agonisten in den präfrontalen Kortex zu einer in dieser Region verminderten Acetylcholinausschüttung führte, die Aufwachzeit nach Gabe eines Anästhetikums verlängert wurde und eine verminderte Aktivität im EEG gemessen wurde. Dagegen führte das Experiment mit einem A2a-Rezeptor Agonisten zu gegenteiligen Effekten. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass sich durch Mikrodialyse von A1R- und A2aR-Agonisten beziehungsweise Antagonisten im präfrontalen Kortex auch die Acetylcholinausschüttung in der *Formatio Reticularis* veränderten. Die *Formatio Reticularis* ist eine Hirnregion, die maßgeblich an der Regulation von Schlaf und Arousal beteiligt ist (Brown et al., 2012).



### **1.2.3 Interaktion von Adenosin mit der Wirkung von Anästhetika**

Es gibt verschiedene experimentelle Hinweise darauf, dass Adenosin die Wirkung von Allgemeinanästhetika beeinflusst. So konnten Tanase et al. (2003) durch die Injektion eines A1-Rezeptor Agonisten in die *Formatio Reticularis* von Katzen eine verlängerte Wirkung von Halothan nachweisen. Dies scheint über eine verminderte Ausschüttung von Acetylcholin vermittelt zu werden. Weiterhin konnten Seitz et al. (1990) durch die direkte Gabe von Adenosin oder durch die indirekte Erhöhung der Adenosinkonzentration durch die Blockade von Adenosintransportern mittels Dipyridamol bei Hunden eine Reduktion des MAC Wertes von Halothan bewirken. Die Autoren schlugen als Erklärung dafür die hemmende Wirkung von Adenosin auf noradrenerge Neurone (Fredholm und Hedqvist, 1980) vor, da deren Signale Einfluss auf die Anästhesietiefe haben (Louie et al., 1986). Auch beim Menschen führt eine Adenosininfusion bei einer Narkose mit dem inhalativen Anästhetikum Isofluran zu einem verminderten Anästhetikabedarf (Segerdahl et al., 1995).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Adenosin im Mausmodell die Wirkung von intravenösen Anästhetika verstärkt. Kaputlu et al. (1998) erreichten durch die Gabe von Adenosin, einem Adenosinanalogen oder durch die Blockade der Wiederaufnahme von Adenosin durch Dipyridamol eine schnellere und längere Wirkung von intravenös applizierten Anästhetika. Diesen Effekt konnten die Autoren für die strukturell unterschiedlichen intravenösen Anästhetika Propofol, Thiopental und Midazolam zeigen. Ähnlich wie Seitz et al. (1990) schlugen die Autoren eine Mitbeteiligung noradrenerger Neurone als Erklärung dafür vor.

### **1.2.4 Adenosin als Neuromodulator**

Adenosin ist kein klassischer Neurotransmitter. Es wird weder in Vesikeln gespeichert, noch nach einem Aktionspotential in den Extrazellularraum abgegeben. Trotzdem nimmt Adenosin als Neuromodulator Einfluss auf Neurone und Synapsen (Dunwiddie und Hoffer, 1980). In den Extrazellularraum gelangt Adenosin zum einen durch die Dephosphorylierung von Adeninnukleotiden durch Ectonucleotidasen im Extrazellularraum. Adeninnukleotide wie ATP werden beispielsweise zusammen mit Neurotransmittern ausgeschüttet (Fredholm et al., 1982) oder als cyclisches Adenosinmonophosphat in den Extra-

zellularraum freigesetzt (Rosenberg und Li, 1995). Außerdem gibt es aktive und passive Nukleosidtransporter, die Adenosin direkt in den Extrazellularraum transportieren. Die Neuromodulation durch Adenosin geschieht sowohl auf präsynaptischer als auch auf postsynaptischer Ebene. Präsynaptische Rezeptoren können über extrazelluläres Adenosin beeinflusst werden (Kocsis et al. (1984), Bannon et al. (2014)). Dadurch wird eine verminderte Ausschüttung von Neurotransmittern bewirkt (Prince und Stevens, 1992). Dies wird über eine G-Protein gekoppelte Hemmung des Kalzium Einstroms vermittelt (Wu und Saggau, 1997). Da die Hemmung der Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat überwiegt, wirkt Adenosin hemmend auf die Erregung von Zellen (Brundege und Dunwiddie, 1996). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Adenosin auch eine Kalzium-unabhängige Glutamatausschüttung inhibieren kann (Scanziani et al., 1992). Postsynaptisch bewirkt Adenosin durch die Aktivierung G-Protein gekoppelter einwärts gerichteter Kalium Kanäle (GIRKS) eine Hyperpolarisation von Zellmembranen. Dadurch wird die allgemein hemmende Wirkung auf Neurone noch verstärkt (Takigawa und Alzheimer, 1999). So konnte bei Pyramidenzellen aus dem Kortex von Ratten durch Adenosin eine Hyperpolarisation der Zellmembran gezeigt werden (van Aerde et al., 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass A1- und GABA-(B)-Rezeptoragonisten synergistisch zur Aktivierung von GIRKS führen (Sodickson und Bean, 1998). Des Weiteren gibt es einen postsynaptischen Effekt von Adenosin auf Glutamat-Rezeptoren. So konnten de Mendonca et al. (1995) in hippocampalen Neuronen zeigen, dass die NMDA-Rezeptorvermittelten exzitatorischen Ströme durch die Aktivierung von postsynaptischen A1-Rezeptoren vermindert werden.

### **1.2.5 Einfluss von Inflammation auf den Adenosinstoffwechsel**

Da Adenosin eine wichtige Rolle in der Modulation einer Immunantwort im ZNS einnimmt (Hasko et al., 2005), ist es naheliegend, dass Inflammation auch den Adenosinstoffwechsel beeinflusst. Wang et al. (1999) konnten beispielsweise bei Kortexkulturen von Ratten zeigen, dass eine Exposition mit dem bakteriellen Endotoxin LPS eine Erhöhung der Adenosinfreisetzung bewirkt. In einem Model mit hippocampalen Kulturen gewonnen aus Ratten konnte gezeigt werden, dass das Zytokin Interleukin- $1\beta$  zu einer Verminderung der Glutamatausschüttung führt (Luk et al., 1999). Die Autoren konnten durch den Einsatz von Adenosin-Antagonisten zeigen, dass dieser Effekt zumindest teil-

weise über eine Erhöhung der endogenen Adenosinproduktion vermittelt wird. In einem weiteren in vitro Experiment wurden Kortexkulturen von Ratten gegenüber Ammoniumacetat exponiert, um eine systemische Inflammation ähnlich eines akuten Leberversagens zu simulieren. Auch hierbei wurden signifikant erhöhte Adenosinkonzentrationen im Extrazellulärraum gemessen (Bjerring et al., 2015). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die extrazelluläre Konzentration von Adenosin im ZNS durch eine Inflammation erhöht wird.

### **1.3 Fragestellung**

Aus den bisher zitierten Studien geht hervor, dass unter einer generalisierten Inflammation die Sensitivität von Individuen gegenüber Anästhetika erhöht ist. Weiterhin ist bekannt, dass eine generalisierte Inflammation zu einer erhöhten Ausschüttung von Adenosin im zentralen Nervensystem führt. Adenosin selbst ist unter physiologischen Bedingungen in die Regulation des Schlaf-Wach Rhythmus eingebunden und reguliert die Vigilanz. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- in wie weit verändert eine generalisierte Inflammation die Expression von Adenosinrezeptoren im Kortex von Nagern?
- welche Veränderungen der Funktionalität ergeben sich daraus für die spontane elektrophysiologische Aktivität im kortikalen Netzwerk?

Der Kortex ist für die Untersuchungen von besonderem Interesse, da hier durch Anästhetika Hypnose induziert wird und Veränderungen der anästhesiologischen Potenz in dieser Hirnregion zu veränderter Narkosetiefe führt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zymosan A Modell**

#### **2.1.1 Behandlung der Versuchstiere und Gewebegewinnung**

##### **Entzündungsmodell**

Zymosan A ist ein aus der Zellwand von Hefenpilzen gewonnenes Polysaccharid, das bei Injektion eine generalisierte Entzündungsreaktion auslöst (Volman et al., 2005). Es wurden weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6N im Alter von etwa sechs Wochen verwendet (Tierversuchsantrag A2/15 unter der Leitung von König/ Köhler beziehungsweise im Verlauf Körner/ Mirakaj). Vorbereitend wurden 10 mg Zymosan A (Sigma) in 10 ml 0.9% Natriumchloridlösung (Braun) gelöst, indem die Mischung über etwa eine Stunde in einem Ultraschallbad (BRANSONIC 52) belassen wurde. Von dieser vorgewärmten Lösung wurde je acht Tieren 1 ml intraperitoneal gespritzt, nachdem die Einstichstelle mit 99% Ethanol desinfiziert wurde. Als Kontrolle wurde den übrigen Tieren 1 ml 0.9% Natriumchloridlösung ohne Zymosan A gespritzt.

Nach zwei oder vier Stunden wurden die Tiere zunächst anästhesiert. Nachdem steril das Bauchfell abpräpariert wurde, wurde das Bauchfell eröffnet, die Vena Cava durchtrennt und mit Hilfe einer Kanüle (Sarstedt) der linke Vorhof punktiert. Es wurde dann solange mit gekühlter PBS<sup>-</sup> Lösung gespült, bis der Ausfluss klar war. Nach der Dekapitation wurde durch einen Sagittalschnitt das Schädelfell abpräpariert. Danach wurden durch einen Koronarschnitt mithilfe einer Rasierklinge der verbliebene Hirnstamm sowie die Wirbelsäule abgetrennt. Mithilfe einer Schere wurde dann von kaudal aus vom Foramen Magnum die Schädeldecke mittig eröffnet. Es folgten je zwei Schnitte von der Trenn-

linie zwischen den beiden Hemisphären zu den Augenhöhlen, sowie an der Trennlinie zwischen Kortex und Kleinhirn. Während der kompletten folgenden Präparation wurde das Gehirn mit gekühltem PBS<sup>-</sup> feucht gehalten. Die Schädelhälften wurden nach außen weggebrochen und das Gehirn auf eine mit Filterpapier bedeckte Kühlplatte gelegt. Mit je einem Schnitt einer Rasierklinge wurden Bulbus Olfactorius sowie das Zerebellum abgetrennt. Durch einen weiteren Schnitt wurden die Hemisphären getrennt und in einer -80°C Kühltruhe gelagert. Zur Evaluation der Entzündungsreaktion wurde in einem Vor-experiment nach 24 stündiger Zymosanexposition zusätzlich vor Durchtrennen der Vena Cava eine peritoneale Lavage mit 5 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS<sup>-</sup>, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

## **2.1.2 Evaluation Entzündungsmodell**

### **Myeloperoxidase-Messung**

Um die peritoneale Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten im Rahmen des Entzündungsmodell zu überprüfen, erfolgte eine Myeloperoxidase-Messung aus der Peritoneallavage der Tiere. Dazu wurden 28mg Diamoniumsalz (ABTS), 5 ml Citratpuffer, 50 µl Wasserstoffperoxid mit 45 ml Aqua Dest. vermischt. Je Well wurden dann 50 µl Lavage, 50 µl Citratpuffer sowie 100 µl der oben beschriebenen Mischung pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Proben bei 405 nm spektrophotometrisch gemessen. Zur Leerwertbestimmung wurde PBS<sup>-</sup> gemessen. Anhand eines mitgemessenen Standards mit bekannter Konzentration konnte die absolute Konzentration berechnet werden.

### **Zellzählung**

Aus der im Vorexperiment gewonnenen Peritoneallavage wurden die Zellzahlen mithilfe eines Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter) bestimmt. Dazu wurden je 20 µl Probe mit je 10 ml 0.9% NaCl (Braun) verdünnt.

### **2.1.3 Messung der Adenosinrezeptorexpression**

#### **RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation aus den Proben wurde mit peqGOLD TriFAST (peqlab) durchgeführt. Nachdem die RNA in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst wurde, wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) und bei -80° gelagert.

Bei Versuchen mit Kortexschnitten (in vitro) wurde das Protokoll wie folgt modifiziert, um möglichst viel der enthaltenen RNA zu extrahieren: Nach Einfrieren der Proben in peqGOLD TriFAST (peqlab) wurden die Proben für 5 Minuten in einem Ultraschallbad belassen (BRANSONIC 52, Branson) und gut vermischt. Zudem wurde das wässrige RNA Präzipitat über Nacht in 500 µl Isopropanol belassen.

#### **Reverse Transkription**

Je 1 µg RNA wurden mit Hilfe des iScript-cDNA-Synthese-Kits (Bio-Rad) in einem Thermocycler (MyCycler, BioRad) entsprechend der beiliegenden Anleitung transkribiert. Die resultierende cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 6.25 ng/µl verdünnt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

#### **Real-Time PCR**

Durch diese Methode konnte die mRNA-Expression indirekt über die cDNA Menge bestimmter Zielgene bestimmt werden. Dabei binden spezifische Primer an Zielgene, also Abschnitte der cDNA, die dann in sich wiederholenden Zyklen durch eine Polymerase immer wieder amplifiziert werden. Diese Amplifizierung kann in Echtzeit während des Prozesses durch die Substanz SYBR Green (Bio Rad) evaluiert werden. Die Substanz fluoresziert beim Binden an doppelsträngige DNA und kann somit die Amplifizierung detektieren.

Je Kavität einer 96-Well Platte wurden 4 µl Probe, 5 µl nukleasefreies Wasser, 10 µl SYBR Green und 1 µl Primermix bestehend aus dem Sense- und Antisenseprimer (Biomers) des Zielgens. Der verwendete Cycler (iCycler, Biorad) wurde auf folgendes Temperaturprotokoll programmiert: einmaliges initiales Schmelzen bei 95°C für 30s; 40 Zyklen: fünf Sekunden Schmelzen bei 95°, bei ermittelter Temperatur Primeranealing für 20s; ab-

schließlich Schmelzen bei 95°C für 10s und Erstellen einer Schmelzkurve zwischen 66°C und 95°C. Durch Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der Reaktion überprüft. Die optimale Annealing Temperatur wurde für die Primer durch Temperaturgradienten ermittelt. Um die gemessene DNA Menge relativ zu quantifizieren, mussten zudem ein Referenzgen in den Proben bestimmt werden. Als Referenzgen mit stabiler Expression in dem von uns untersuchten Material wählten wir 18s ribosomale RNA. Um Verunreinigungen auszuschließen war in jedem PCR-Ansatz eine Leerkontrolle enthalten, die alle Reagenzien, aber keine Probe enthielt. Vor der Auswertung der Daten wurden diese mit Hilfe der Software CFX Maestro (Bio Rad) anhand der Expression des Referenzgens normalisiert. Nach Ausschluss von Ausreißern, wurden die Daten skaliert, indem die Datenwerte durch den Median der Kontrolle geteilt wurden.

## **2.2 Plasmid-Modell**

Um die Auswirkungen einer stark erhöhten Expression einzelner Adenosinrezeptoren beobachten zu können, wurden Kortexkulturen Plasmiden ausgesetzt, die zur Überexpression einzelner Adenosinrezeptoren führten.

### **2.2.1 Herstellung von organotypischen Kortexkulturen**

Mäuse wurden am dritten postnatalen Tag mit Isofluran (Abott, Wiesbaden, Deutschland) betäubt und danach enthauptet (Tierversuchsanzeige vom 31.10.2014: Zustandsänderung muriner kortikaler Netzwerke durch klassische Neuromodulatoren und Mediatoren von Neuroinflammation (Hentschke); Tierversuchsanzeige vom 31.08.2015: Wirksamkeit intravenöser Anästhetika bei cholinerg Krise (Antkowiak)). Mit einer Schere wurde durch Sagitalschnitte vom Foramen Magnum aus die Schädeldecke eröffnet. Durch Koronarschnitte von der Mittellinie aus zu den Augenhöhlen und an der Grenze zum Zerebellum konnte die Schädeldecke nach außen weggebrochen werden. Nach Entnahme des Gehirns wurde das Zerebellum durch einen Frontalschnitt vom Großhirn abgetrennt. Das Gehirn wurde in kalter Greys Balanced Salt Lösung (Sigma, Deutschland) einige Minuten im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Danach wurde das Gehirn mit Sekundenkleber auf einem Metallblock fixiert. Umgeben von gekühlter Greys Balanced Salt Lösung wurden dann mit einem Vibroslicer (Campden

Instruments, Loughborough, England) Schnitte mit einer Dicke von 300 µm Dicke angefertigt. Kortextstücke ähnlicher Größe wurden abgetrennt und mit einer Mischung aus 9 µl Thrombin (Sigma) und 9 µl Plasmin (Sigma) auf Objektträgern fixiert.

Zur Kultivierung wurden die Schnitte samt Objektträgern in Kulturröhrchen mit 750 µl Nährmedium überführt. Um den pH-Wert zu regulieren, wurden die Kulturröhrchen danach bei 36°C für ca. eine Stunde mit 5% Kohlenstoffdioxid angereicherter Raumluft begast. Zur Inkubation verblieben die Kulturröhrchen bei 36°C in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland), in welchem sie mit Hilfe der sogenannten "Roller-Tube-Technik" (Gahwiler, 1981) kontinuierlich zehn Mal pro Stunde gedreht wurden. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte zweimal pro Woche. Danach wurden die Schnitte nach den oben beschriebenen Bedingungen begast, um den pH-Wert einzustellen.

### 2.2.2 Plasmidtransfektion

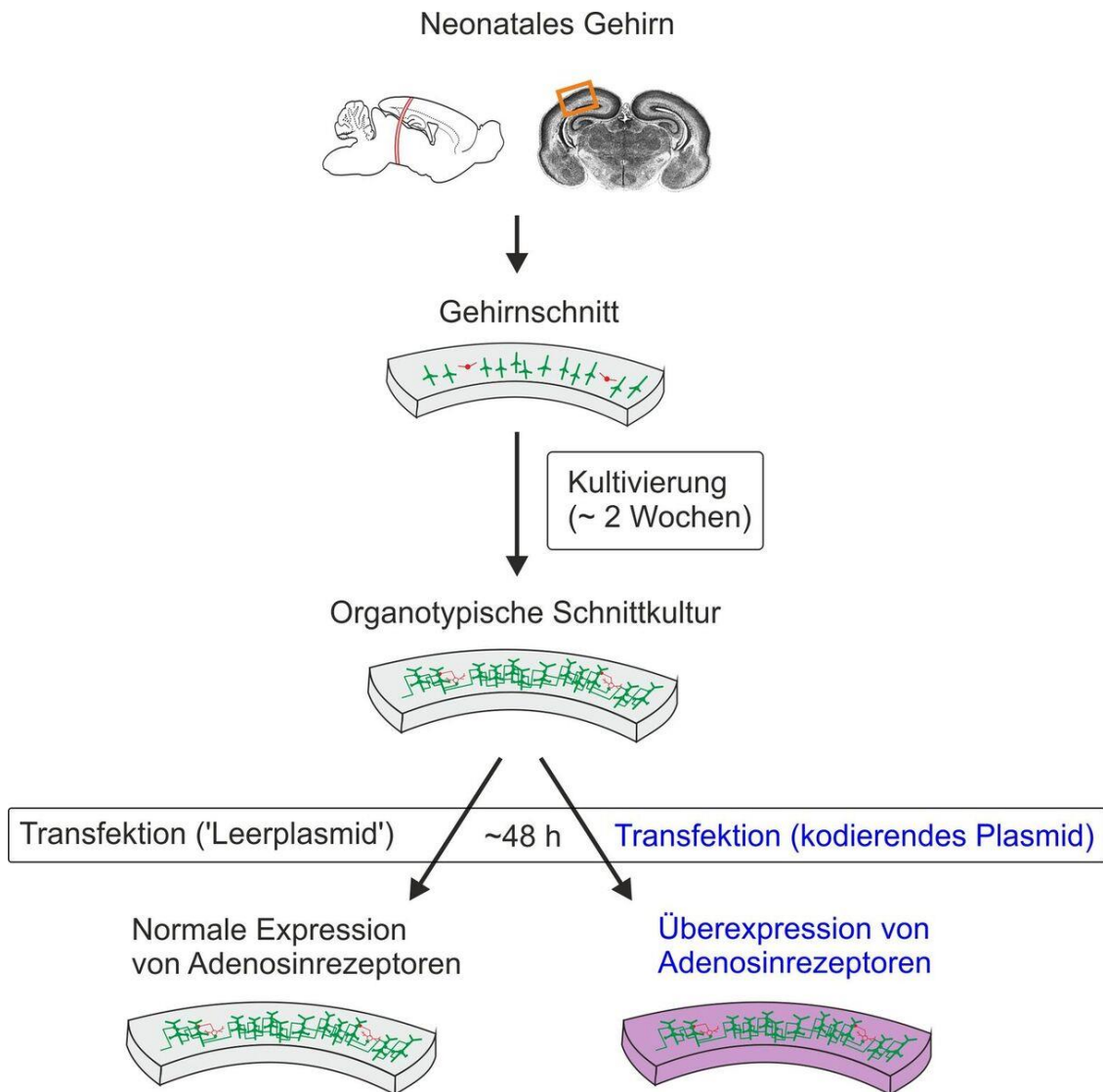
Um Adenosinrezeptorgene überzuexprimieren, verwendeten wir sogenannte Open Reading Frame Plasmide (OriGene Technologies). Diese enthalten ausschließlich den proteincodierenden Teil des Zielgens, welches in unserem Fall jeweils ein Adenosinrezeptor war. Die Kopplung mit einem pCMV6 Vektor bewirkt die Daueraktivierung der Transkription. Das Plasmid mit der Information des Adora3 Gens, das Gen das die Information für den A3-Rezeptor codiert, enthielt zusätzlich die genetische Information für ein fluoreszierendes Protein (GFP). Dadurch konnte die Methode zusätzlich durch Immunfluoreszenz überprüft werden.

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zur Vorbereitung wurde pro Kortexschnitt 1 µl Lipofectamine 2000 in 35 µl serumfreies Medium gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 0.33 µg des Plasmids in 35 µl serumfreiem Medium gelöst und mit der Lipofectamine-Serum-Mischung vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur

**Tabelle 2.1** – Zusammensetzung des Nährmediums

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





**Abbildung 2.1** – Schema Erstellung Kortexkulturen

peratur wurden die 70  $\mu\text{l}$  zu den Kortexschnitten gegeben, die zuvor in 400  $\mu\text{l}$  frisches Medium (s. Tabelle) überführt worden waren. Nach vierstündiger Inkubationszeit in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und Begasung mit 5% Kohlenstoffdioxid angereicherter Raumluft, wurde das Medium durch 750  $\mu\text{l}$  frisches Medium ersetzt. Nach der Transfektion wurden die Schnitte erneut für mindestens 48 Stunden inkubiert, bevor sie weiter verwendet wurden. Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Ablauf der Erstellung der Kortexkulturen sowie deren Transfektion.

## **Plasmid Vervielfältigung**

50 µl E. coli (Nova blue single competent-Cells-Kit, Novagen) wurden aufgetaut. Die Plasmide (s. Tabelle) wurden in 100 µl NFW aufgelöst, wodurch sich eine Konzentration von 0.1 µg/µl ergab. Nachdem das Plasmid weiter auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt wurde, wurden 1 µl den Zellen zugesetzt und nach vorsichtigem Mischen für 5min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen exakt für 30 Sekunden im Wasserbad bei 42°C inkubiert und danach direkt wieder 2 Minuten in Eis gelagert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium und kurzem Mischen wurden 50 µl auf Platten ausplattiert, die je ein Antibiotikum enthielten. Die Antibiotikumspezies passten jeweils zu den in den Plasmiden enthaltenen Resistenzen (s. Tabelle). Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 36°C inkubiert.

Danach wurde eine Vorkultur angesetzt, indem je Platte genau eine solitär wachsende Kolonie in Bouillon eingemischt wurde. Das Bouillon wurde mit 200 ml Aqua Dest. und einem Beutel TB Liquid Amp (InvivoGen) bzw. E. coli FastMedia Kan TB (invivoGen) angesetzt. Durch die enthaltenen Antibiotika konnten noch einmal spezifisch die Bakterien selektioniert werden, die das Plasmid mit der entsprechenden Resistenz enthielten. Die Vorkultur wurde dann für ca. 6 Stunden im Orbital-Schüttler (HT Infors AG) bei 37°C bei 230 RPM inkubiert. Ein Milliliter der Vorkultur wurden danach in MICROBANC-Tubes (Pro-Lab Diagnostics) pipettiert und drei- bis viermal invertiert. Die Bakterien sollten sich so an den enthaltenen Kügelchen anlagern. Die Kügelchen konnten dann einzeln entnommen und ausplattiert werden. Ein Milliliter der Vorkultur wurde außerdem weiterverarbeitet, indem er in 195 ml Bouillon, die mit den oben genannten Reagenzien angesetzt wurden. Nach einer weiteren Nacht auf dem Schüttler bei 37°C und 200 RPM wurden das so entstandene Substrat in 50 ml Falcons verteilt und bei 6000 RPM 20 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das zurückgebliebene Pellet wurde mit einem NucleoBond xtra Maxi Kit (Machery-Nagel) nach der beiliegenden Anleitung weiterverarbeitet.

Die eluierten Plasmide wurden mit 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl TE-Puffer (PanReac AppliChem) gelöst. Zum Nachweis und Überprüfung der Reinheit der Plasmide wurden die Plasmide durch eine konventionelle PCR amplifiziert und die Größe des Amplikons mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Nach einer Konzentrationsbestimmung an einem Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) wurden die

Plasmide mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 0.1 µg/µl verdünnt.

### **2.2.3 Evaluation der Adenosinrezeptorüberexpression**

#### **Real-Time PCR**

Zur Evaluation der Transfektion wurden aus drei Präparationen jeweils ca. vier Kortexschnitte transfiziert und die Expression des Zielgenes nach 48 Stunden durch RT-PCR untersucht. Die RNA-Extraktion verlief nach dem in 2.1.3 beschriebenen modifizierten Schema. Die RT-PCR wurden nach dem in 2.1.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

#### **Immunfluoreszenz**

Da das Plasmid für den A3-Rezeptor zusätzlich die genetische Information für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) enthielt, konnte das Gelingen der Transfektion zusätzlich auf Proteinebene durch Immunfluoreszenz überprüfen werden. Dazu wurden Kortexschnitte zunächst wie oben beschrieben mit dem A3R-Plasmid beziehungsweise mit einem Leerplasmid (OriGene Technologies) transfiziert. Nach der Inkubationszeit von 48h wurden die Schnitte zunächst mit 4% Paraformaldehyd für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Daraufhin wurden die Kulturen zweimal für je 5 Minuten mit kaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde Roti®-Mount FluorCare (Roth) verwendet. Untersucht wurden die Schnitte mithilfe eines Zeiss LSM 510 Mikroskop.

### **2.2.4 Elektrophysiologie**

#### **Messungen**

Die für die extrazellulären Messungen verwendeten Messelektroden wurden aus Borosilikatkapillaren (OD 1.0 mm, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit einem Puller (DMZ-Universal, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Deutschland) hergestellt. Die Spitzendurchmesser waren etwa 1 - 2 µm. Vor der Messung wurden die Messelektroden mit künstlichem Liquor (artificial cerebrospinal fluid= ACSF) befüllt. Die ACSF bestand aus in Aqua Destillata gelösten folgenden Bestandteilen: 120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> und 11 mM D-Glucose (alle Chemikalien von Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland). Damit bei allen

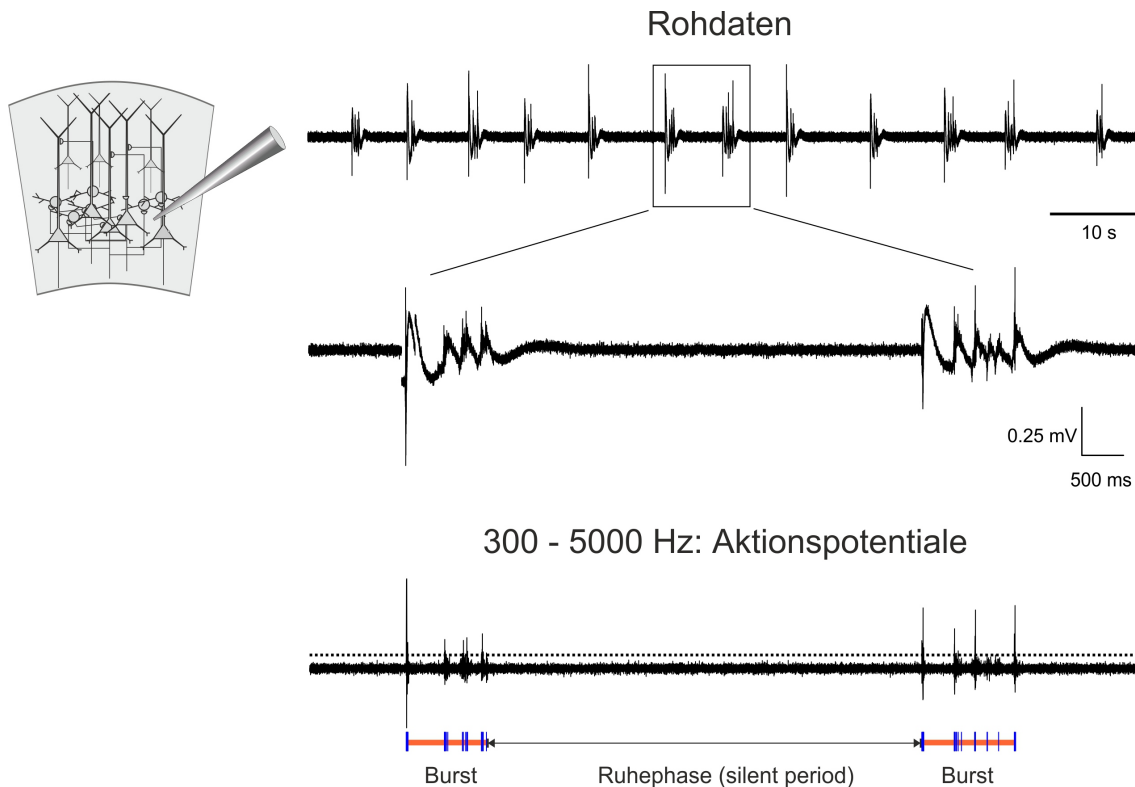
Messungen konstant ein pH-Wert von etwa 7.4 vorlag, wurde die ACSF vor den Messungen mindestens 30 Minuten lang sowie während der Messungen mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid (Carbogen 5, Westfalen AG, Münster, Deutschland) begast. Mit ACSF gefüllt hatten die Elektroden einen Widerstand zwischen zwei und fünf M $\Omega$ . Um die Elektroden in den Schnitten zu platzieren wurde zur optischen Kontrolle ein inverses Mikroskop (Axiovert 135M, Zeiss, Jena, Deutschland) benutzt. Die Messkammer bestand aus einem Metallrahmen und einem Glasboden. Um eine gleichbleibende Temperatur zwischen 34°C - 36°C während der Messungen zu gewährleisten, wurde ein Heizdraht (Philipps, Niederlande), der um den Metallrahmen angebracht war, verwendet. Die Temperatur konnte über ein Digitalthermometer (Greisinger electronic GmbH, Regensburg, Deutschland) überprüft werden. Der Kortexschnitt wurde während der Messung mit begaster ACSF umspült, für deren Zu- und Abfluss IPC-Peristaltik-Pumpen (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) sorgten. Die Durchflussrate betrug 1 ml/min.

Für die Messungen wurde zunächst ein Kortexschnitt für mindestens 30 Minuten in der Messkammer belassen. So konnten sich die Zellen an die in der Messkammer herrschenden Bedingungen gewöhnen. Währenddessen wurden zwei Messelektroden so im Gewebe platziert, dass in deren Ableitung Aktionspotenziale eindeutig vom Grundrauschen abzugrenzen waren.

Mittels eines PCs, einer analog-digitaler Wandlerkarte Digidata 1200 AD/DA sowie mit dem Computerprogramm Axoscope 9 (beide von Axon Instruments, Union City, Kalifornien, USA) wurden während den Messungen Aktionspotenziale (AP) sowie Feldpotenziale (LFP) aufgezeichnet.

### **Versuchsprotokoll**

Nach der Adaptationsphase von 30 Minuten wurde zunächst eine sechsminütige Kontrollmessung aufgezeichnet. Dann wurde für zwölf Minuten ACSF mit 0.5  $\mu$ M Adenosin oder 3  $\mu$ M DPCPX eingewaschen. Dann wurde für sechs Minuten aufgezeichnet. Danach wurde für zwölf Minuten reine ACSF Lösung eingewaschen. Es folgte abschließend eine weitere sechsminütige Messung.



**Abbildung 2.2** – Datenauswertung: Nachdem aus den Rohdaten Aktionspotentiale gefiltert wurden, wurden gruppierte Aktionspotentiale als Bursts identifiziert.

## Datenauswertung

Zur Auswertung der Rohdaten wurde Matlab Version R2008 verwendet. Abbildung 2.2 zeigt neben einer schematischen Darstellung einer Kultur schematisch die Datenauswertung. Zunächst wurden aus den Daten die Aktionspotentiale durch einen Hochpassfilter ( $>300\text{Hz}$ ,  $-3\text{dB}$  Eckfrequenz) herausgefiltert. Durch Bestimmen einer Schwelle konnten die Aktionspotentiale vom Grundrauschen unterschieden werden. Gruppierte Aktionspotentiale konnten dann als Bursts identifiziert werden. Als Bursts oder Feuersalve bezeichnet man eine Aktivitätsphase, die sich durch ein gruppiertes Auftreten von Aktionspotentialen auszeichnet. Zur Auswertung wurden die Aktionspotentialrate, die relative Zeit in Bursts, die Dauer der Ruhephasen sowie die Burstrate und die Burstlänge herangezogen. Die relative Zeit in Bursts gibt den Anteil der Zeit an, in der sich die Kulturen in Bursts befinden in Relation zur gesamten Messdauer. Die Dauer der Ruhephasen gibt die mittlere Zeit zwischen Bursts an.

## 2.3 Statistik und Grafiken

Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Die Varianzhomogenität wurde durch einen Levene-Test bestätigt. Für nicht normalverteilte Daten beziehen sich Angaben im Text auf den Median, während sich bei normalverteilten Daten Angaben auf den Mittelwert beziehen. Zur Datenbereinigung wurden Werte, deren Abstand zum oberen beziehungsweise unteren Quartil größer als ein anderthalbfacher Interquartilsabstand war, als Ausreißer behandelt.

Um zwei nicht normalverteilte Gruppen zu vergleichen, wurde ein Wilcoxon Rangsumentest berechnet. Als Effektstärkemaß wurde die „Area under the Receiver Operating Curve“ (AUROC) und die dazugehörigen 95% Konfidenzintervalle mit dem Matlab Package 'MESToolbox' (Hentschke und Stüttgen, 2011) berechnet. Die Konfidenzintervalle wurde mittels bootstrapping berechnet. Die Effektstärke ist eine dimensionslose Zahl und quantifiziert die Größe eines statistischen Effekts. Damit gibt die Effektstärke Auskunft über die praktische Relevanz eines statistischen Effektes und hilft zudem die Größe statistischer Effekte verschiedener Experimente miteinander zu vergleichen. Das Effektstärkemaß AUROC kann Werte zwischen null und eins annehmen, wobei der Effekt umso größer ist, je näher der Wert an null oder an eins liegt. Je näher der Wert an 0.5 liegt, desto kleiner ist der Effekt. AUROC drückt somit aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Wert aus Gruppe A größer ist als ein Wert aus Gruppe B. Sind alle Werte aus Gruppe A größer als die Werte aus Gruppe B ist AUROC=1 und somit die Wahrscheinlichkeit, dass ein zufälliger Wert aus Gruppe A größer ist als aus Gruppe B 100%. Sind alle Werte aus Gruppe A kleiner als Werte aus Gruppe B ist AUROC=0. Sind genau die Hälfte der Werte aus Gruppe A größer und als Werte aus Gruppe B ist AUROC=0.5

Zum Mittelwertvergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde ein Student's t-Test berechnet. Zusätzlich wurde als Effektstärkemaß Cohens d (auch als Hedges g bekannt) mit 95% Konfidenzintervall berechnet. Cohens d gibt den Abstand zweier Verteilungen in Einheiten ihrer gemeinsamen Standardabweichung an. Zur Berechnung wurde das R Package „effsize“ (Torchiano, 2017) benutzt. Dabei wurde Cohens d wurde nach der Formel

$$d = \frac{M_1 - M_2}{SD_{pooled}}$$

berechnet, wobei  $M_1$ = Mittelwert Gruppe 1,  $M_2$ = Mittelwert Gruppe 2 und  $SD_{pooled}$ =

gepoolte Standardabweichung ist. Die gepoolte Standardabweichung bezeichnet das nach Stichprobenumfang gewichtete Mittel der Standardabweichungen. Nach Cohen (1988) wird der Effekt als klein bezeichnet, wenn  $d$  Werte größer als 0.2 annimmt, mittel wenn  $d$  größer ist als 0.5 und groß ab Werten für  $d$  von 0.8.

Um Interaktionseffekte zwischen Variablen festzustellen, beispielsweise ob es eine Interaktion zwischen zwei Transfektionsarten und zwei Behandlungsarten gibt, wurde eine zwei-faktorielle ANOVA mit dem R Package „ez“ (Lawrence, 2016) berechnet. Als Effektstärkemaß wurde das partielle  $\eta^2$  mit Hilfe des R Packages „schoRsch“ (Pfister und Janczyk, 2017) berechnet. Dazu wurden 95% Konfidenzintervalle mit dem R Package „MBESS“ (Kelley, 2018) berechnet.  $\eta^2$  gibt an, welcher Anteil der Gesamtvarianz durch die untersuchte Variable erklärt wird. Dabei sind Werte zwischen null und eins möglich, wobei der Effekt umso größer ist, je näher der Wert an eins liegt. Nach (Cohen, 1988) werden Effekte ab 0.01 als klein, ab 0.06 als mittel und ab 0.14 als groß bezeichnet. Zur leichteren Interpretation werden diese Grenzwerte in den Grafiken als small (S), medium (M) und large (L) eingezeichnet. Da es für eine zwei-faktorielle ANOVA keinen entsprechenden nicht parametrischen Test gibt, wurden nicht normalverteilte Daten, bei denen Interaktionseffekte untersucht werden sollten, mittels Box-Cox Methode transformiert (Box und Cox, 1964). Im Detail wurde zunächst für jede Gruppe das optimale Lambda berechnet, wobei Lambda den Exponenten der Transformation angibt. Zur Transformation wurde dann der Mittelwert aller berechneten Lambdas genutzt. Bei transformierten Daten wurde die Datenbereinigung erst nach der Transformation durchgeführt.

Effektstärken werden im Text in der Form 'Effektstärke [Konfidenzintervall]' angegeben.

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mit (R Core Team, 2017) und mit Matlab Version R 2017a.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zymosan-Modell

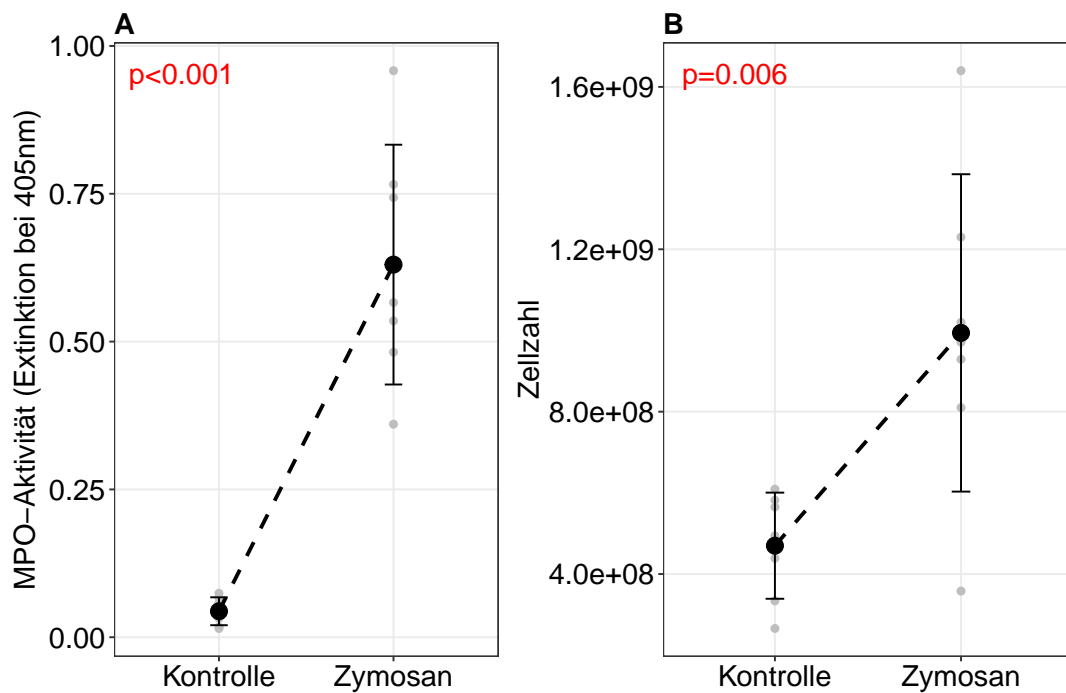
#### 3.1.1 Evaluierung der Entzündungsreaktion

Um die durch das intraperitoneal injizierte Zymosan A hervorgerufene Entzündung nachzuweisen, wurde in einem Vorexperiment nach 24 Stunden Expositionsdauer aus einer Peritoneallavage die Zellzahl sowie die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase bestimmt, das Rückschlüsse auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten und Monozyten zulässt. Die Daten sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Da die Daten normalverteilt waren, wurde ein t-Test sowie Cohens  $d$  berechnet. Die MPO-Aktivität war in der Versuchsgruppe vierzehnfach höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ; Cohens  $d = -4.061$  [-6.099, -2.0239];  $n_{\text{Zymosan}} = 7$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 7$ ). Die Zellzahl war in der Zymosangruppe doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe ( $p = 0.005$ ; Cohens  $d = -1.801$  [-3.178, -0.418];  $n_{\text{Zymosan}} = 7$ ,  $n_{\text{Kontrolle}} = 7$ ). Dies entspricht in beiden Fällen einem signifikanten, großen Effekt. Der deutliche Anstieg dieser beiden Parameter in der Versuchsgruppe zeigt das Gelingen der Entzündungsinduktion.

#### 3.1.2 Expression der Adenosinrezeptoren nach Zymosanexposition

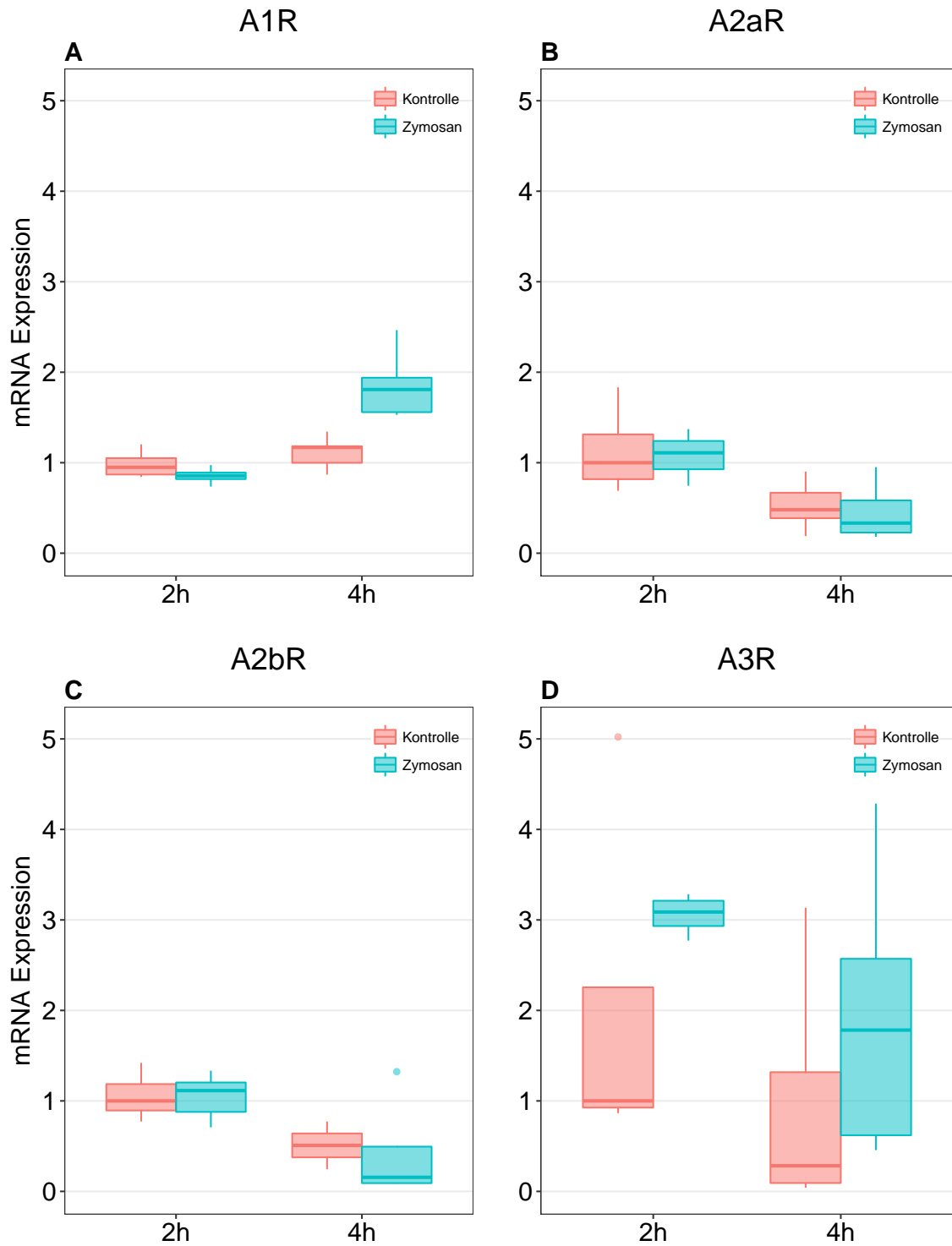
Um die Veränderung der Adenosinrezeptor-mRNA nach Zymosanexposition in neuronalem Gewebe zu untersuchen, wurden ein RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dabei wurde kortikales Gewebe zwei und vier Stunden nach Zymosanexposition untersucht. Die Daten der Zeitreihe nach Zymosan A Injektion sind in Abbildung 3.2 relativ zum Median der Kontrollgruppe nach zwei Stunden Expositionsdauer dargestellt. Ausreißer, die einen



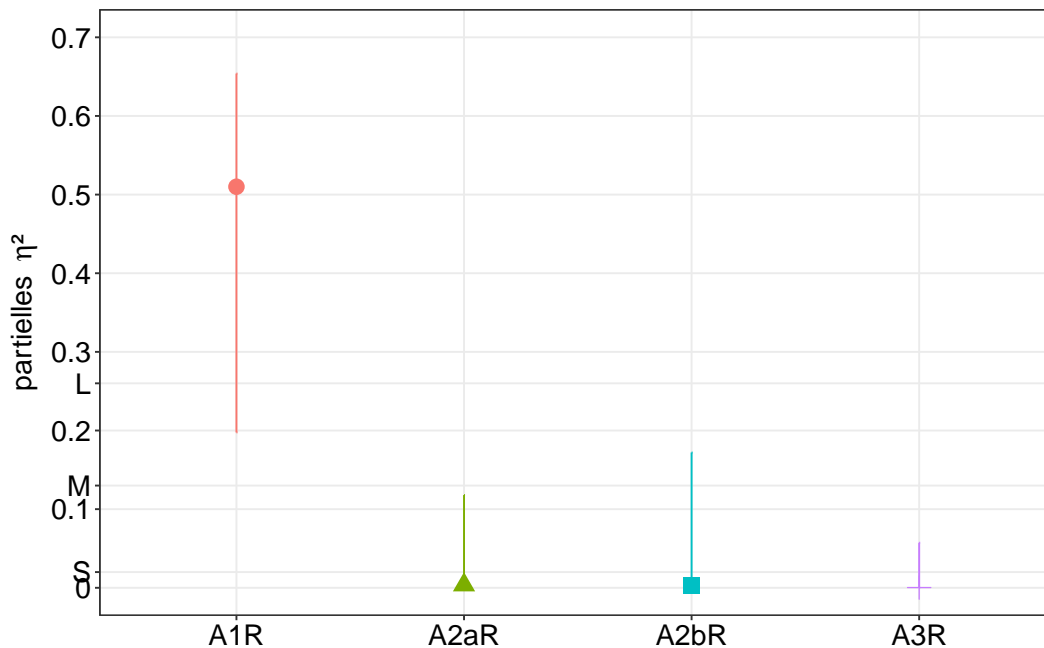


**Abbildung 3.1** – **A:**MPO-Aktivität; **B:** Zellzahl; gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Kontrolltiere im Vergleich zu 24h Zymosan behandelten Tieren.

Abstand größer als einen dreifachen Interquartilsabstand zum oberen beziehungsweise unteren Quartil haben, sind nicht dargestellt. Da die Daten nicht normalverteilt waren, beziehen sich die nachfolgende Angaben auf den Median. Während sich die Expression des A1R in der Kontrollgruppe nach vier Stunden kaum veränderte, stieg die Expression in der Versuchsgruppe nach vier Stunden um ca. 80% an. Die A2aR-Expression sank in der Kontrollgruppe um mehr als 50% und in der Versuchsgruppe um fast 70%. Die A3R-Expression war in der Zymosan exponierten Gruppe bereits nach drei Stunden fast dreimal so hoch wie in der Kontrollgruppe. Nach vier Stunden sank der Wert auf Kontrollgruppe auf ca. 30% des Ausgangswertes, während die Expression in der Versuchsgruppe auf das 1,8-fache des Wertes der Kontrollgruppe nach zwei Stunden sank. Somit scheint die durch Zymosan induzierte Entzündung in diesem Zeitraum zu einer erhöhten Expression des A1-Rezeptors zu führen, wie es auch bereits von Biber et al. (2001) beschrieben wurde. Die Versuchsgruppe liegt bei der A3-Rezeptorexpression bereits nach zwei Stunden auf einem höheren Niveau als die Kontrollgruppe, entwickelt sich nach vier Stunden aber in die gleiche Richtung. Für die Rezeptoren A2a und A2b ergab sich fast kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 3.2 – Zeitreihe Zymosanexposition; A: A1R; B: A2aR; C: A2bR; D: A3R.** Dargestellt werden die mRNA-Expressionen zu den Zeitpunkten 2h und 4h der Kontrolltiere im Vergleich zu Zymosan behandelten Tieren als Boxplots relativ zum Median der Kontrollgruppe nach 2h. Ausreißer, die einen Abstand größer als einen dreifachen Interquartilsabstand zum oberen beziehungsweise unteren Quartil haben, sind nicht dargestellt.



**Abbildung 3.3 – Interaktionseffekt Zeitreihe Zymosanexposition:** Effektstärke  $\eta^2$  mit 95% Konfidenzintervall für den Interaktionseffekt zwischen Expositionsdauer (2h oder 4h) und Expositionstyp (Natriumchlorid oder Zymosan) für A1-, A2a-, A2b und A3-Rezeptor. Zur Interpretation der Effektstärke sind folgende Grenzwerte eingezeichnet: S (=small; kleiner Effekt), M (=medium; mittlerer Effekt), L (=large; großer Effekt).

Zur weiteren Auswertung wurden die Daten transformiert (siehe Kapitel 2.3). Um mögliche Interaktionseffekte zwischen der Expositionsdauer (2h oder 4h) und der Expositionstyp (Natriumchlorid oder Zymosan) zu untersuchen, wurde eine zwei-faktorielle ANOVA berechnet. Das Effektstärkemaß für den Interaktionseffekt ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Bezüglich des Interaktionseffektes zwischen Zeit und Expositionstyp ergab sich für den A1-Rezeptor ein signifikanter großer Effekt (*partielles*  $\eta^2= 0.51$  [0.198, 0.654],  $p= <0.001$ ,  $n= 30$ ). Dabei stieg die Expression in der Versuchsgruppe um 80% an, während in der Kontrollgruppe die Expression in etwa gleich blieb. Für die anderen Rezeptoren ergaben sich nicht signifikante kleine Effekte. Somit konnte nach einer vier stündigen intraperitonealen Zymosanexposition eine starke, statistisch signifikante Erhöhung der A1-Rezeptorexpression in kortikalem Gewebe gezeigt werden.

## 3.2 Plasmid Modell

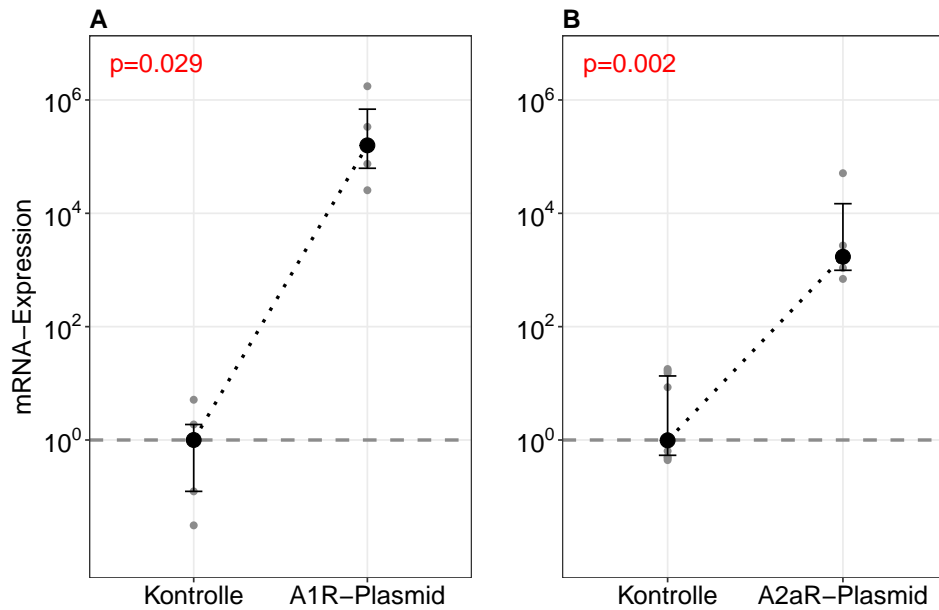
### 3.2.1 Evaluation der Überexpression von Adenosinrezeptoren

#### RT-PCR

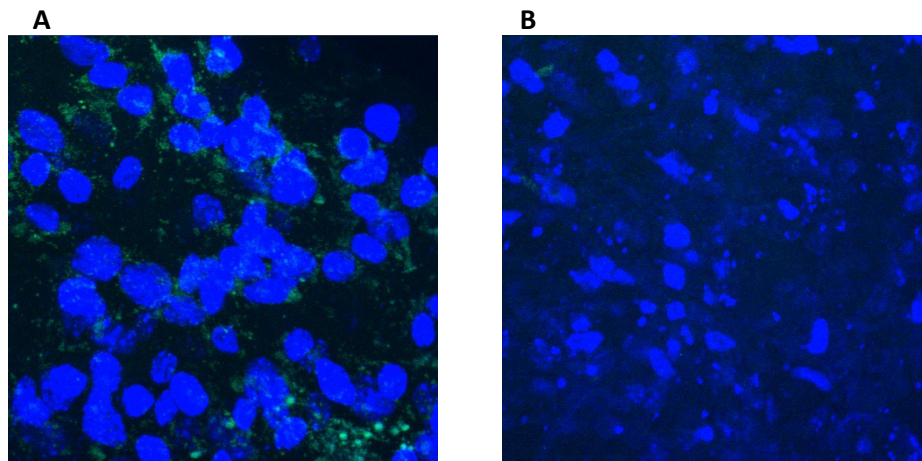
Um herauszufinden, ob sich eine erhöhte Adenosinrezeptorexpression auf die spontane Netzwerkativität im Kortex auswirkt, wurde ein Plasmid mit der genetischen Information eines Adenosinrezeptors in die kortikalen Zellen eingeschleust. Zur Evaluation des Verfahrens wurden Kulturen mittels RT-PCR untersucht, die zuvor entweder mit einem Leerplasmid oder mit einem Adenosinrezeptor-Plasmid transfiziert worden waren (Abbildung 3.4). Da die Daten nicht normalverteilt waren, beziehen sich die nachfolgenden Angaben auf den Median. Zur statistischen Auswertung wurde ein Wilcoxon Rangsummentest berechnet. Die Transfektion mit dem A1-Rezeptor Plasmid (A1-Transfektion) führte in der Versuchsgruppe zu einem Anstieg der A1-Rezeptor mRNA Konzentration auf das  $2 \cdot 10^5$ -fache des Kontrollwertes ( $p=0.029$ , AUROC=1 [1, 1],  $n_{Kontrolle}=5$ ,  $n_{A1-Transf.}=4$ ). Auch die Transfektion mit dem A2a-Rezeptor Plasmid (A2a-Transfektion) führte in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Erhöhung der A2a-Rezeptor mRNA-Konzentration auf annähernd das  $2 \cdot 10^3$ -fache ( $p=0.002$ , AUROC=1 [1, 1],  $n_{Kontrolle}=10$ ,  $n_{A2a-Transf.}=4$ ). Dadurch konnte auf mRNA-Ebene die Überexpression der Rezeptoren gezeigt werden.

#### Immunfluoreszenz

Um die gelungenen Transfektion zu visualisieren, haben wir dies für A3-Rezeptoren im Folgenden dargestellt. Die verwendeten Plasmide für den A3-Rezeptor enthalten zusätzlich die genetische Information für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP). Abbildung 3.5 zeigt Aufnahmen von Kulturen, die entweder mit dem A3R-Plasmid oder mit einem Leerplasmid transfiziert wurden. In der mit dem A3R-Plasmid transfizierten Kultur ist im Gegensatz zur Leerplasmid transfizierten Kultur GFP zu erkennen. Dieser Nachweis auf Proteinebene zeigt, dass in den transfizierten Kulturen auch eine vermehrte Biosynthese des Rezeptorproteins stattfindet.



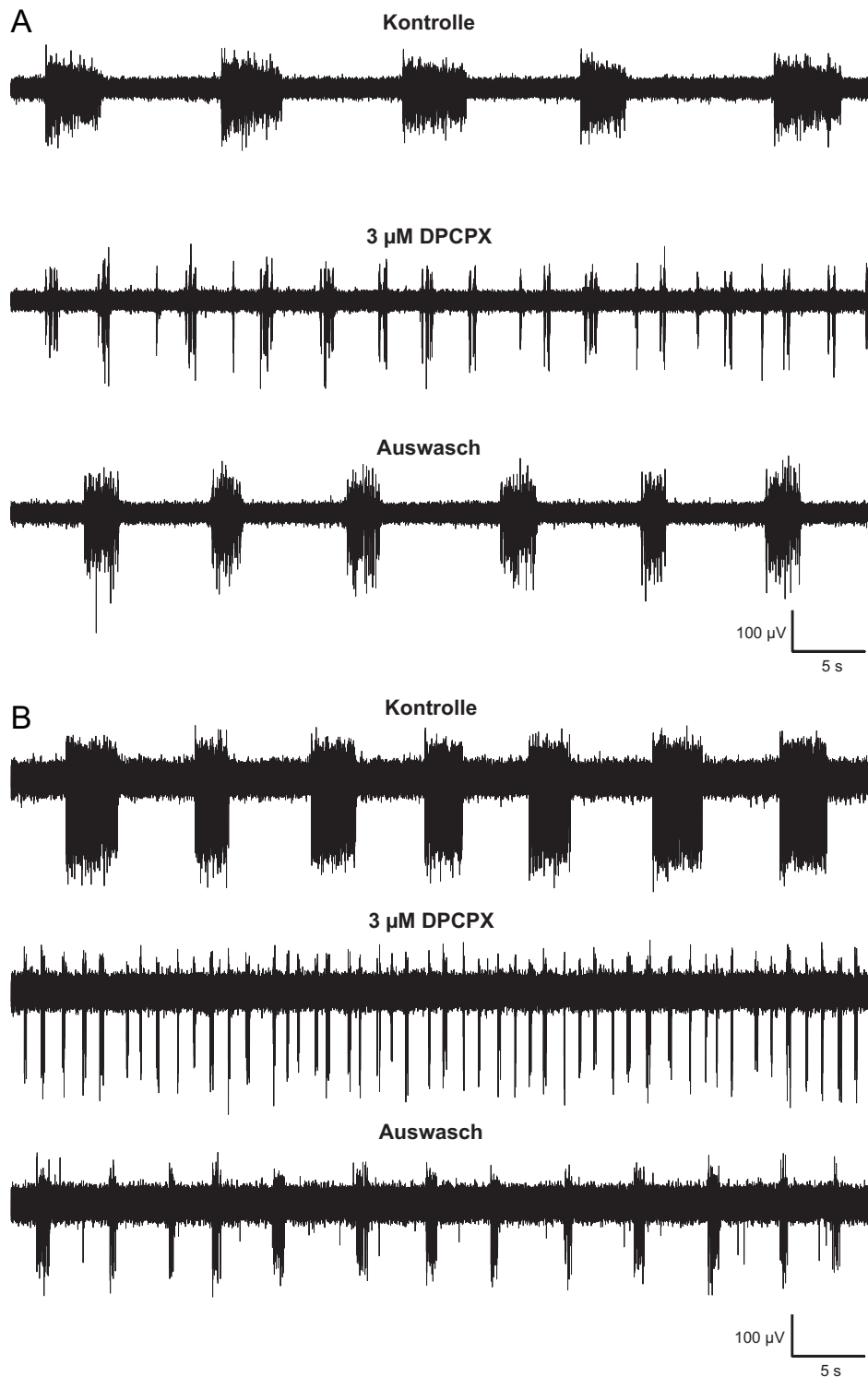
**Abbildung 3.4** – **A:** Transfektion mit A1R-Plasmid; **B:** Transfektion mit A2aR-Plasmid; Ergebnisse stammen aus vier (A1-Plasmid) bzw. drei (A2a-Plasmid) unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils vier Kortexschnitte transfiziert wurden. Daten werden relativ zur Kontrolle dargestellt; logarithmische Darstellung.



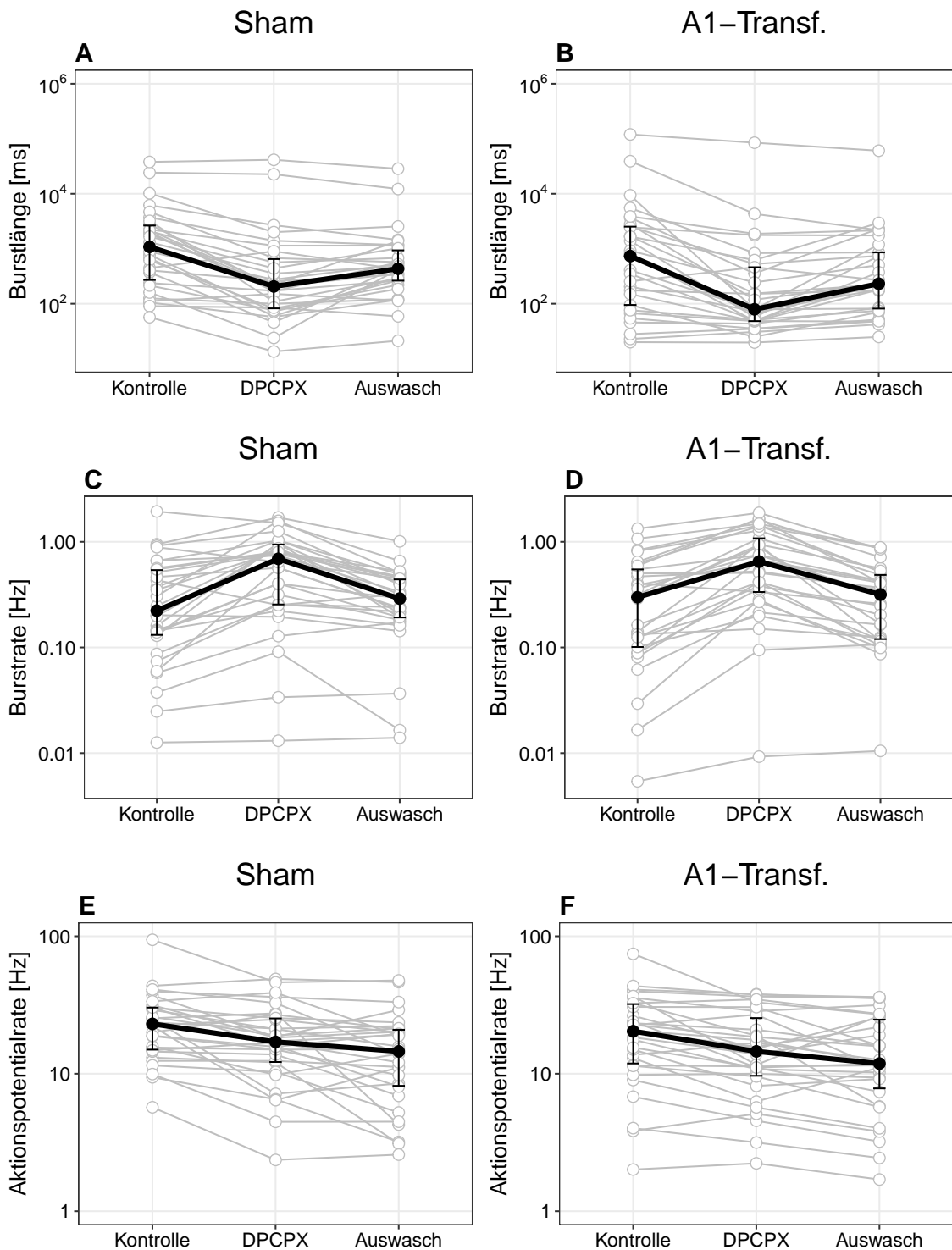
**Abbildung 3.5 – Plasmidevaluation Immunfluoreszenz;** **A:** Transfektion mit A3R-Plasmid; **B:** Transfektion mit Leerplasmid. Blau zeigt die Zellkerne, grün ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), dessen genetische Information Bestandteil des A3R-Plasmids ist.

### **3.2.2 Versuchsreihe Adenosinantagonist**

In der folgenden Versuchsreihe wurde getestet, ob die verwendeten organotypischen Kulturen des Kortex Adenosin produzieren und ob diese extrazelluläre Adenosinkonzentration funktionell bedeutsam für die spontane Aktionspotentialaktivität der Neurone ist. Hierzu wurden Messungen in kortikalen Kulturen, die entweder mit dem A1R-Plasmid oder mit einem Leerplasmid transfiziert wurden, in Gegenwart des A1R-Antagonisten DPCPX durchgeführt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 exemplarisch Rohdaten von Beispielmessungen gezeigt. Die Quantifizierung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.7 und 3.8 zusammengefasst.

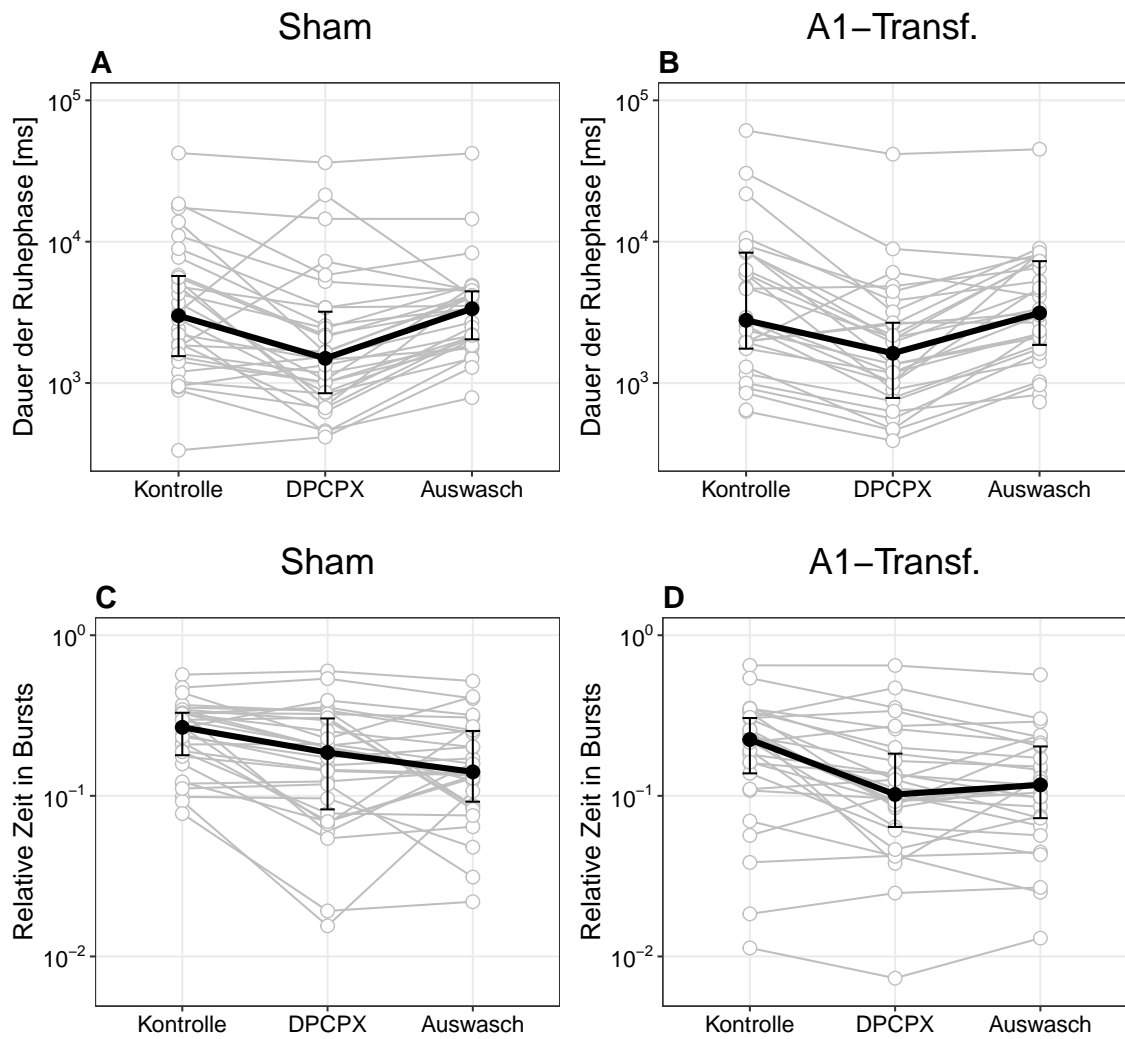


**Abbildung 3.6** – Exemplarische Darstellung eines Ausschnittes von Rohdaten der elektrophysiologischen Messung während DPCPX-Zugabe bei Kontrollkulturen (**B**) und A1R-Plasmid transfizierten Kulturen (**A**). Erste Zeile zeigt jeweils einen Ausschnitt der Messung unter Kontrollbedingungen. Bei den dargestellten Ausschnitten der Messung unter 3 μM DPCPX-Gabe in der zweiten Zeile kann sowohl bei der gezeigten Kontrollkultur als auch bei transfizierten Kultur eine verkürzte Burstlänge und eine höhere Burstfrequenz erkannt werden. Die Veränderungen können durch Auswasch der Substanz partiell aufgehoben werden, was jeweils in Zeile drei dargestellt ist.



**Abbildung 3.7 – DPCPX-Zugabe bei A1R-Plasmid transfizierten Kulturen;** Burstlänge nach Leerplasmid Transfektion (Sham) (A) und nach A1-Rezeptor-Plasmid Transfektion (A1-Transf.) (B); Burstrate Sham (C) und nach A1-Transf. (D); Aktionspotentialrate Sham (E) und nach A1-Transf. (F). Logarithmische Darstellung des Medians und des Interquartilsabstandes während der Kontrollmessung, unter DPCPX-Zugabe und während des Auswasches.





**Abbildung 3.8 – DPCPX-Zugabe bei A1R-Plasmid transfizierten Kulturen;** Dauer der Ruhephasen nach Leerplasmid Transfektion (Sham) (**A**) und nach A1-Rezeptor-Plasmid Transfektion (A1-Transf.) (**B**); relative Zeit in Bursts Sham (**C**) und nach A1-Transf. (**D**). Logarithmische Darstellung des Medians und des Interquartilsabstandes während der Kontrollmessung, unter Adenosin Zugabe und während des Auswasches.

### **Effekt durch DPCPX-Zugabe**

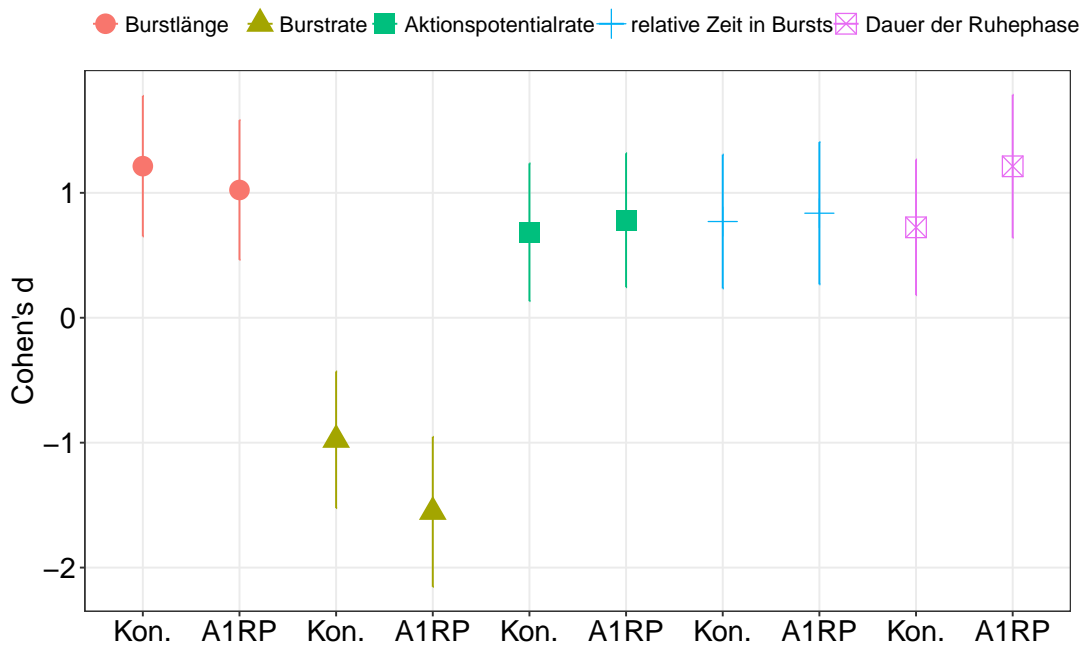
Da die Daten nicht normalverteilt sind, beziehen sich die folgenden Angaben auf den Median. Die Burstlänge verkürzte sich durch die Zugabe von DPCPX um 90% in den Kontrollkulturen und um 80% in den mit dem A1R-Plasmid transfizierten Kulturen. Die Burstrate verdoppelte sich durch DPCPX in transfizierten Kulturen, während sie sich in den Kontrollkulturen verdreifachte. In beiden Gruppen verringerte sich die Aktionspotentialrate durch DPCPX um 30% und die Dauer der Ruhephase um 50%. Die relative Zeit in Burst verkürzte sich in den Kontrollkulturen um etwa 30%, während sie sich in den A1R-Plasmid transfizierten Kulturen um über 50% verringerte. Die statistische Auswertung der Box-Cox transformierten Daten erfolgte mittels gepaartem t-Test. Bei allen Parametern konnte für beide Transfektionsarten ein signifikanter Effekt ( $p < 0.001$ ) mittlere bis großer Effektstärke (Cohens  $d > |0.684|$ ) durch die Zugabe von DPCPX gezeigt werden. Die Effektstärke des Vergleichs von Kontrollmessung zur Messung bei DPCPX Zugabe ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Die Abnahme der Burstlänge und die Zunahme der Burstrate bedeutet, dass durch DPCPX-Zugabe die Bursts kürzer und häufiger auftraten. Dazu passend wurde eine verkürzte Zeit zwischen den Bursts (Dauer der Ruhephase) beobachtet. Außerdem war der Anteil der Zeit, in denen die Kulturen Aktionspotentialsalven feuerten, verkürzt und es wurden weniger Aktionspotentiale in der Messperiode registriert. Zusammenfassend wurde eine Verringerung der spontanen Aktionspotentialaktivität beobachtet.

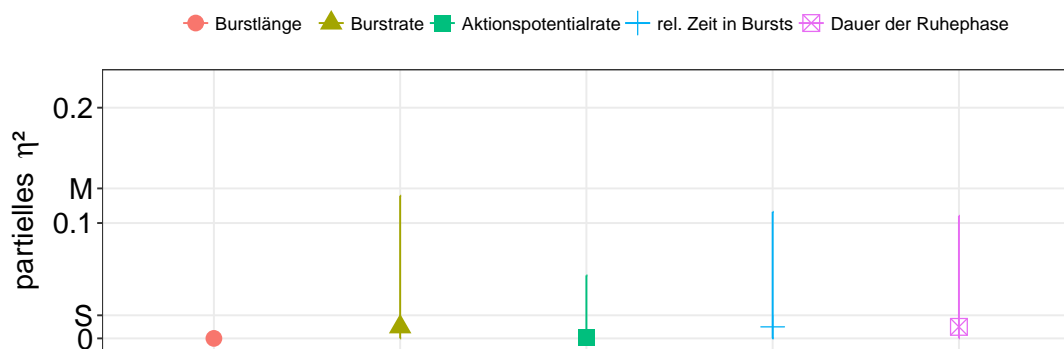
### **Analyse des Effekts durch Transfektion bei DPCPX-Zugabe**

Zur statistischen Auswertung einer Interaktion zwischen Transfektion und DPCPX-Zugabe wurde für jeden Parameter eine zwei- faktorielle ANOVA berechnet mit den Faktoren Behandlung (Kontrollmessung oder DPCPX-Zugabe) und Transfektionsart (Leerplasmid oder A1R-Plasmid). Die Effektstärke dieser Interaktion ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Es ergaben sich für alle Parameter nicht signifikante Effekte im vernachlässigbar kleinen Bereich.

Dies bedeutet, dass in den Experimenten die erhöhte Expression des A1-Rezeptors die Wirkung des Antagonisten auf die beobachteten Parameter nicht beeinflusste.



**Abbildung 3.9 – DPCPX-Zugabe bei A1R-Plasmid Transfektion:** Effektstärke (Cohen's d) mit 95% Konfidenzintervall für den Vergleich von Kontrollmessung und Messung unter DPCPX-Zugabe. Dargestellt sind Ergebnisse der Kontrollgruppe (Kon.) sowie der Versuchsgruppe, die mit einem A1-Rezeptor Plasmid (A1RP) transfiziert wurde.



**Abbildung 3.10 – Interaktionseffekt DPCPX-Zugabe bei A1R-Plasmid Transfektion:** Effektstärke  $\eta^2$  mit 95% Konfidenzintervall für den Interaktionseffekt zwischen Transfektionsart (Leerplasmid oder A1R-Plasmid) und Messbedingung (Kontrollmessung oder Messung bei DPCPX-Zugabe) für verschiedene Parameter. Zur Interpretation der Effektstärke sind folgende Hilfsgeraden eingezeichnet: S (=small; kleiner Effekt) und M (=medium; mittlerer Effekt).

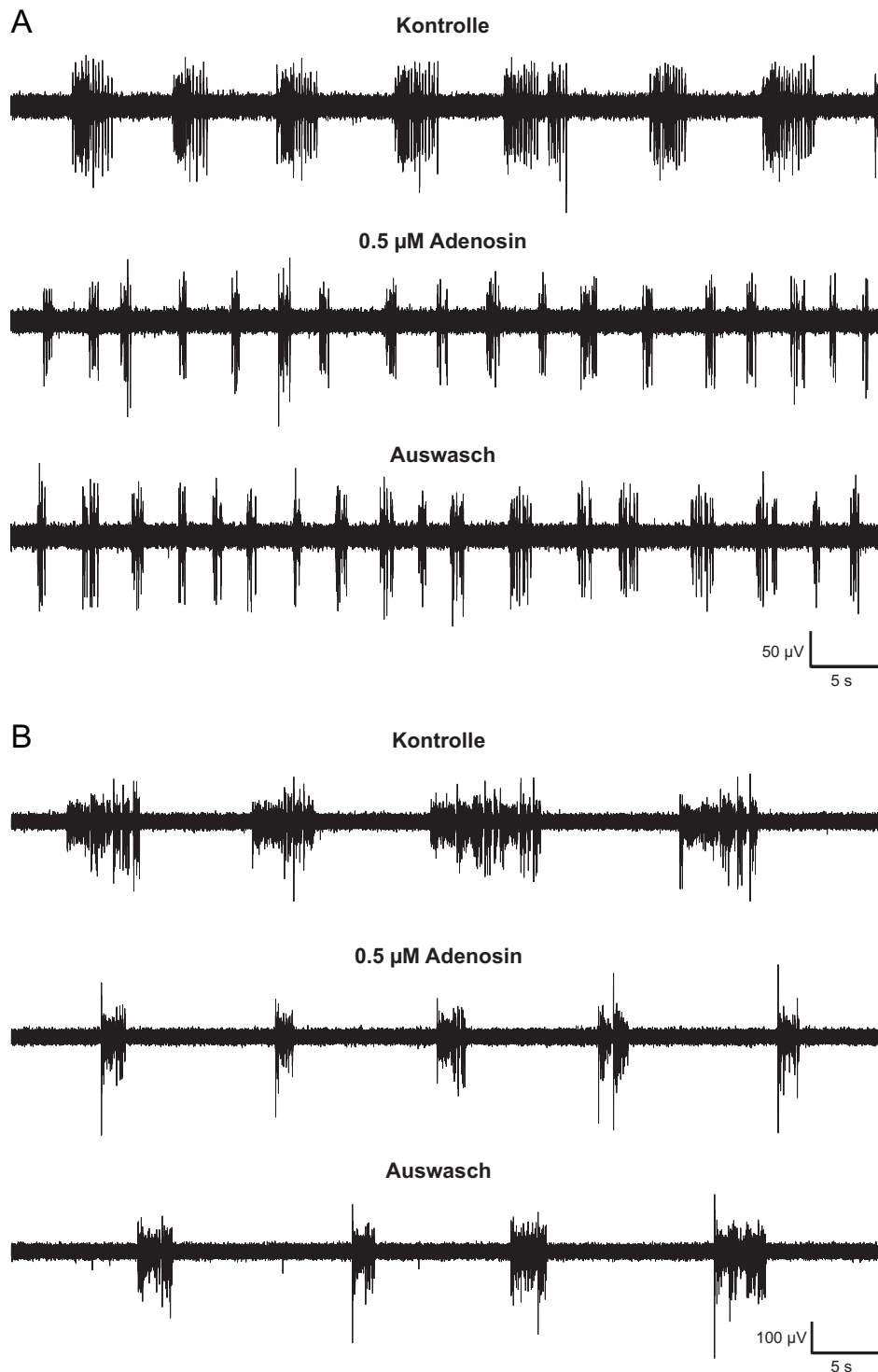
### **3.2.3 Effekte der externen Applikation von Adenosin auf die spontane Aktionspotentialaktivität**

In den im Folgenden dargestellten Versuchen wurden die Veränderungen der spontanen Aktionspotentialaktivität durch Applikation von Adenosin in organotypischen kortikalen Kulturen, die entweder mit einem Adenosinrezeptor Plasmid (A1R, A2aR) oder mit einem Leerplasmid transfiziert wurden, untersucht. Zur Veranschaulichung sind zunächst Rohdaten in Abbildung 3.11 dargestellt. Darüber hinaus sind die Daten aus den extrazellulären Messungen für das A1R-Plasmid in den Abbildungen 3.12 und 3.13 dargestellt. Die Daten zu den Messungen der mit dem A2aR-Plasmid transfizierten Kulturen sind in den Abbildungen 3.17 und 3.18 visualisiert. Die Ordinaten der Grafiken sind logarithmisch aufgeteilt. Zur statistischen Auswertung wurde eine wie in Kapitel 2.3 beschriebene Box-Cox-Transformation angewandt, da dadurch eine Normalverteilung erreicht werden konnte.

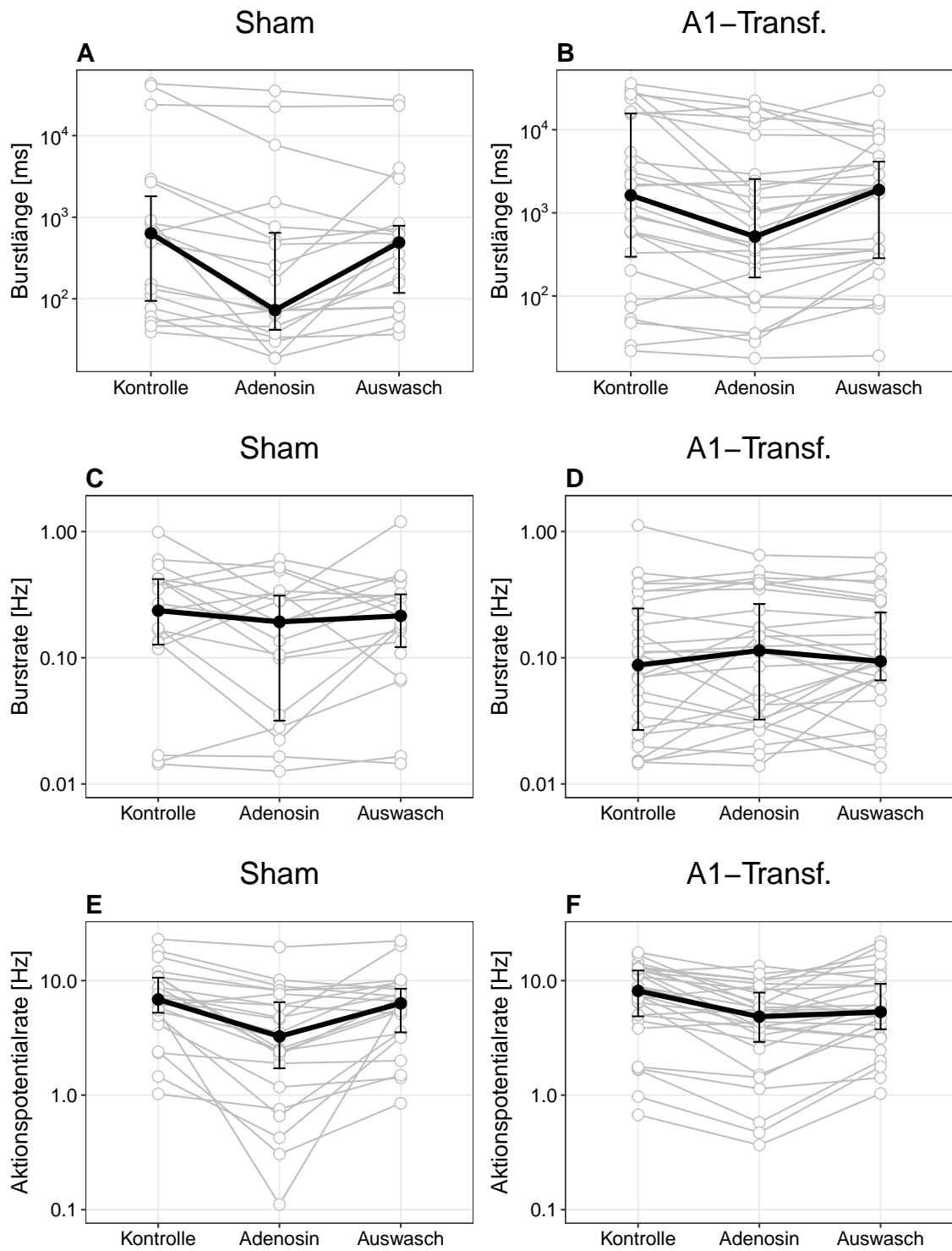
#### **Effekte durch Adenosinzugabe bei erhöhter Expression des A1-Rezeptors**

Da die Daten nicht normalverteilt waren, beziehen sich die nachfolgenden Angaben auf den Median.

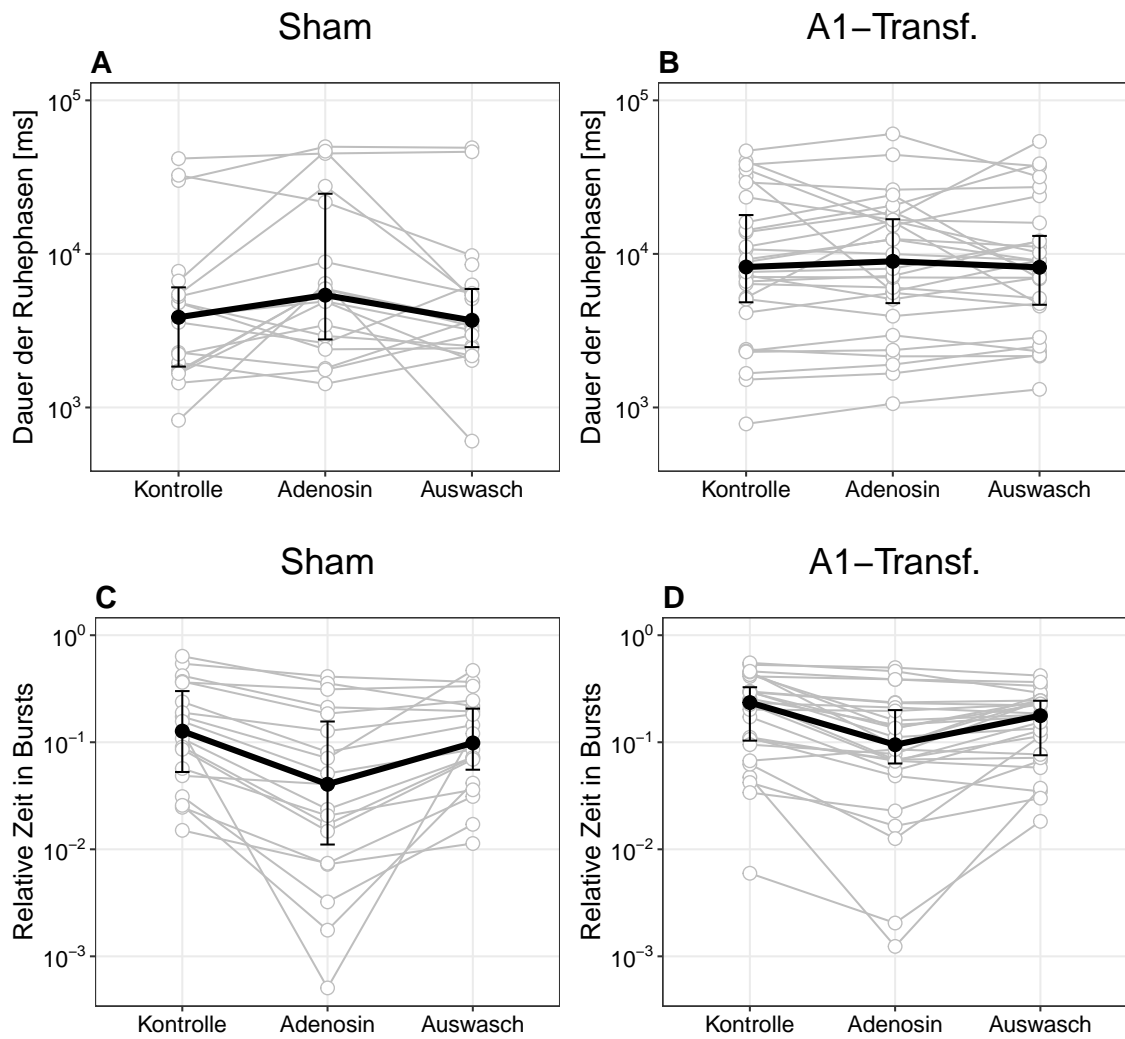
Bei Adenosin Zugabe verkürzte sich die Burstlänge der Kontrollkulturen um fast 90% und die der A1R-Plasmid transfizierten Kulturen um 70%. Während sich die Burstrate durch Adenosin in den Kontrollgruppe um etwa 20% verringerte, stieg sie in der Versuchsgruppe um fast 30% an. Die Aktionspotentialrate wiederum sank in beiden Gruppen; dabei verringerte sich die Rate der Kontrollgruppe um 50% und die der Versuchsgruppe um 40%. Die Dauer der Ruhephase stieg durch Adenosin in den Kontrollkulturen um 50% und in den A1R-Plasmid transfizierten Kulturen um knapp 10% an. Die Relative Zeit in Bursts nahm in der Kontrollgruppe um etwa 70% und in der Versuchsgruppe um 60% ab. Die statistische Auswertung der Box-Cox transformierten Daten erfolgte mittels gepaartem t-Test. Die Effektstärke des Vergleichs von Kontrollmessung und Messung bei Adenosin Zugabe ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Für die Parameter Burstlänge, Aktionspotentialrate und der relativen Zeit in Bursts ergaben sich signifikante ( $p < 0.05$ ) mittlere bis große Effekte (*Cohens d* > 0.766) für beide Transfektionsarten.



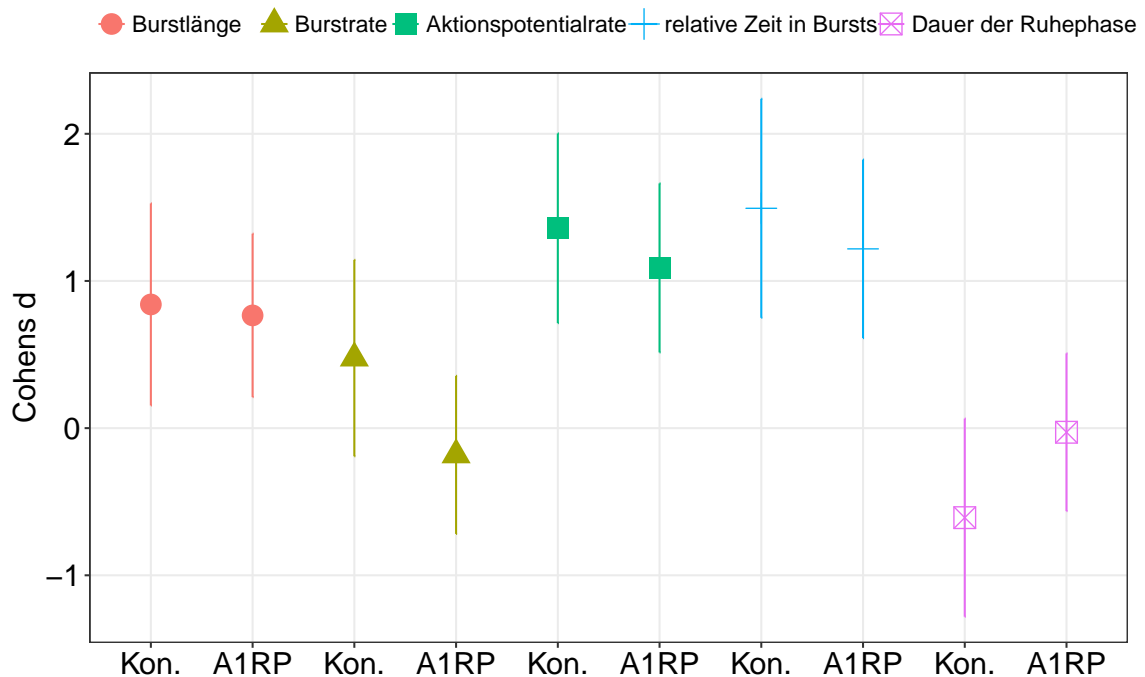
**Abbildung 3.11** – Exemplarische elektrophysiologische Rohdaten kortikaler Kulturen während Adenosin-Zugabe bei A1R-Plasmid transfizierten Kulturen (A) und Kontrollkulturen (B). Erste Zeile zeigt jeweils einen Ausschnitt der Messung unter Kontrollbedingungen. Bei den dargestellten Ausschnitten der Messung unter 0.5 μM Adenosin-Gabe in der jeweils zweiten Zeile kann sowohl bei der gezeigten Kontrollkultur als auch bei transfizierten Kultur eine verkürzte Burstlänge festgestellt werden. Zusätzlich kommt es bei der transfizierten Kultur zu einer erhöhte Burstrate. Zeile drei zeigt den Ausschnitt der Messung des Auswaschens der Substanz.



**Abbildung 3.12 – A1R-Plasmid Transfektion unter Adenosinzugabe;** Burstlänge nach Leerplasmid Transfektion (Sham) (A) und nach A1-Rezeptor-Plasmid Transfektion (A1-Transfektion) (B); Burstrate Sham (C) und nach A1-Transfektion (D); Aktionspotentialrate Sham (E) und nach A1-Transfektion (F). Logarithmische Darstellung des Medians und des Interquartilsabstandes während der Kontrollmessung, unter Adenosin Zugabe und während des Auswasches.



**Abbildung 3.13 – A1R-Plasmid Transfektion unter Adenosinzugabe;** Dauer der Ruhephasen nach Leerplasmid Transfektion (Sham) (A) und nach A1-Rezeptor-Plasmid Transfektion (A1-Transfektion) (B); relative Zeit in Bursts Sham (C) und nach A1-Transfektion (D). Logarithmische Darstellung des Medians und des Interquartilsabstandes während der Kontrollmessung, unter Adenosin Zugabe und während des Auswasches.



**Abbildung 3.14 – A1R-Plasmid Transfektion unter Adenosinzugabe:** Effektstärke (Cohens d) mit 95% Konfidenzintervall für den Vergleich von Kontrollmessung und Messung unter Adenosin-Zugabe. Dargestellt sind Ergebnisse der Kontrollgruppe (Kon.) und die Ergebnisse der Versuchsgruppe, die mit einem A1-Rezeptor Plasmid (A1RP) transfiziert wurde.

Für die Burstrate ergab sich für die Kontrollgruppe ein nicht signifikanter kleiner Effekt ( $p= 0.052$ , *Cohens d*= 0.476 [-0.191, 1.143]), während die Versuchsgruppe einen vernachlässigbar kleinen Effekt aufwies ( $p= 0.368$ , *Cohens d*= -0.182 [-0.719, 0.355]). Bei der Dauer der Ruhephase ergab sich für die Kontrollgruppe ein signifikanter Effekt mittlerer Stärke ( $p= 0.016$ , *Cohens d*= -0.608 [-1.281, 0.064]), während die Versuchsgruppe einen nicht signifikanten geringer Effekt aufwies ( $p= 0.881$ , *Cohens d*= -0.028 [-0.564, 0.508]).

Bei etwa gleich bleibender Burstrate bewirkte Adenosin somit eine Verkürzung der Bursts und somit auch der relativen Zeit in Bursts. Zudem bewirkte Adenosin eine Verminderung der Aktionspotentialrate. Im Vergleich dazu kam es in der Versuchsreihe mit dem A1R-Antagonisten DPCPX zu einem deutlichen Anstieg der Burstrate. Die Verringerung der spontanen Aktionspotentialaktivität durch Adenosin ist wahrscheinlich auf die hyperpolarisierende Wirkung durch Adenosin zurückzuführen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für Aktionspotentiale verringert wird.



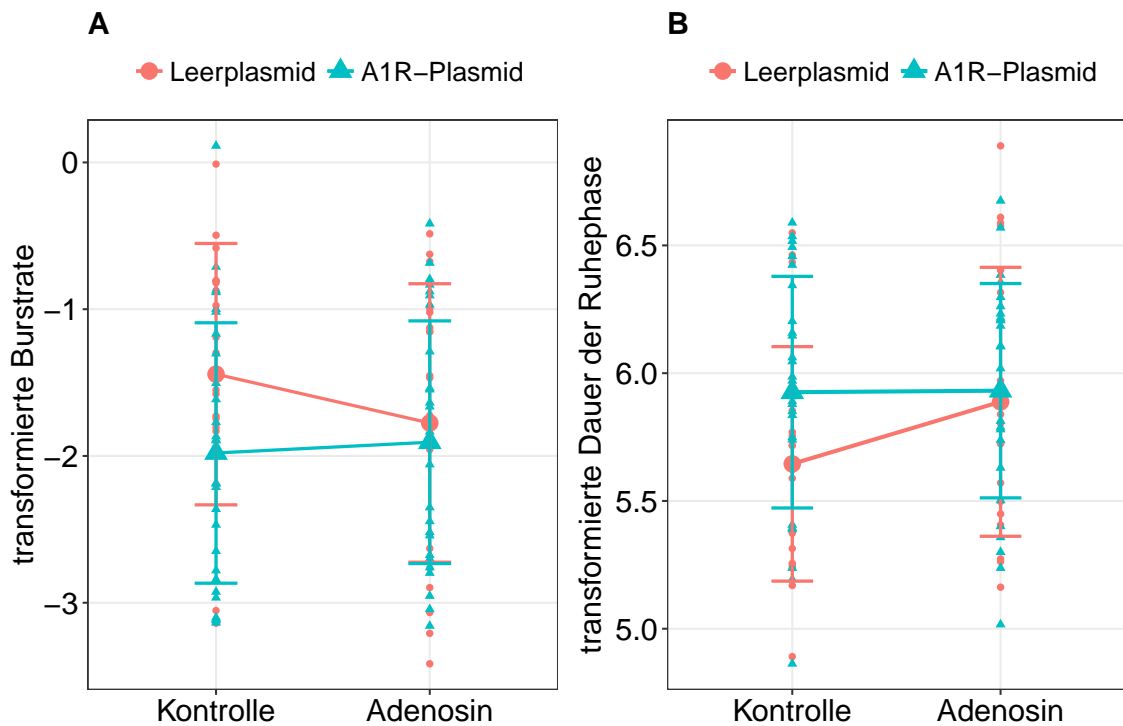
### **Interaktion zwischen erhöhter Expression des A1-Rezeptors und Adenosinabgabe**

Zur statistischen Auswertung einer Interaktion zwischen Transfektion und Adenosinapplikation wurde für jeden Parameter eine zwei-faktorielle ANOVA berechnet mit den Faktoren Behandlung (Kontrolle versus Adenosin) und Transfektionsart (Leerplasmid oder A1R/ A2aR-Plasmid). In Abbildung 3.15 ist die Effektstärke für Interaktionseffekte der Versuchsreihe mit dem A1R-Plasmid dargestellt. Für die Burstrate ergab sich ein signifikanter schwacher Interaktionseffekt ( $p=0.017$ , *partielles*  $\eta^2=0.12$  [0.003, 0.3]). Für die Dauer der Ruhephase ergab sich ein signifikanter mittlerer Effekt ( $p=0.01$ , *partielles*  $\eta^2=0.14$  [0.008, 0.321]). Die anderen Parameter wiesen nicht signifikante kleine Effekte auf. In Abbildung 3.16 ist die Interaktion der beiden signifikanten Parameter auf Grundlage der Box-Cox transformierten Daten graphisch dargestellt. Während in der Kontrollgruppe die Burstrate um gut 20% sank, stieg sie in der Versuchsgruppe um fast 5% an. Auf die Dauer der Ruhephase hat die Adenosin Zugabe in der Versuchsgruppe keinen Effekt, während die Dauer der Ruhephase in der Kontrollgruppe um etwa 5% ansteigt.

Dies bedeutet, dass in den Experimenten die erhöhte Expression des A1-Rezeptors lediglich die Wirkung von Adenosin bezüglich der Burstrate und der Dauer der Ruhephase veränderte. Bei den anderen Parametern konnte keine veränderte Wirkung von Adenosin durch die erhöhte Rezeptorexpression nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.15 – Interaktionseffekt Adenosin-Zugabe bei A1R-Plasmid Transfektion:** Effektstärke  $\eta^2$  mit 95% Konfidenzintervall für den Interaktionseffekt zwischen Transfektionsart (Leerplasmid oder A1R-Plasmid) und Messbedingung (Kontrollmessung oder Messung bei Adenosinzugabe) für verschiedene Parameter. Zur Interpretation der Effektstärke sind folgende Hilfsgeraden eingezeichnet: S (=small; kleiner Effekt), M (=medium; mittlerer Effekt).

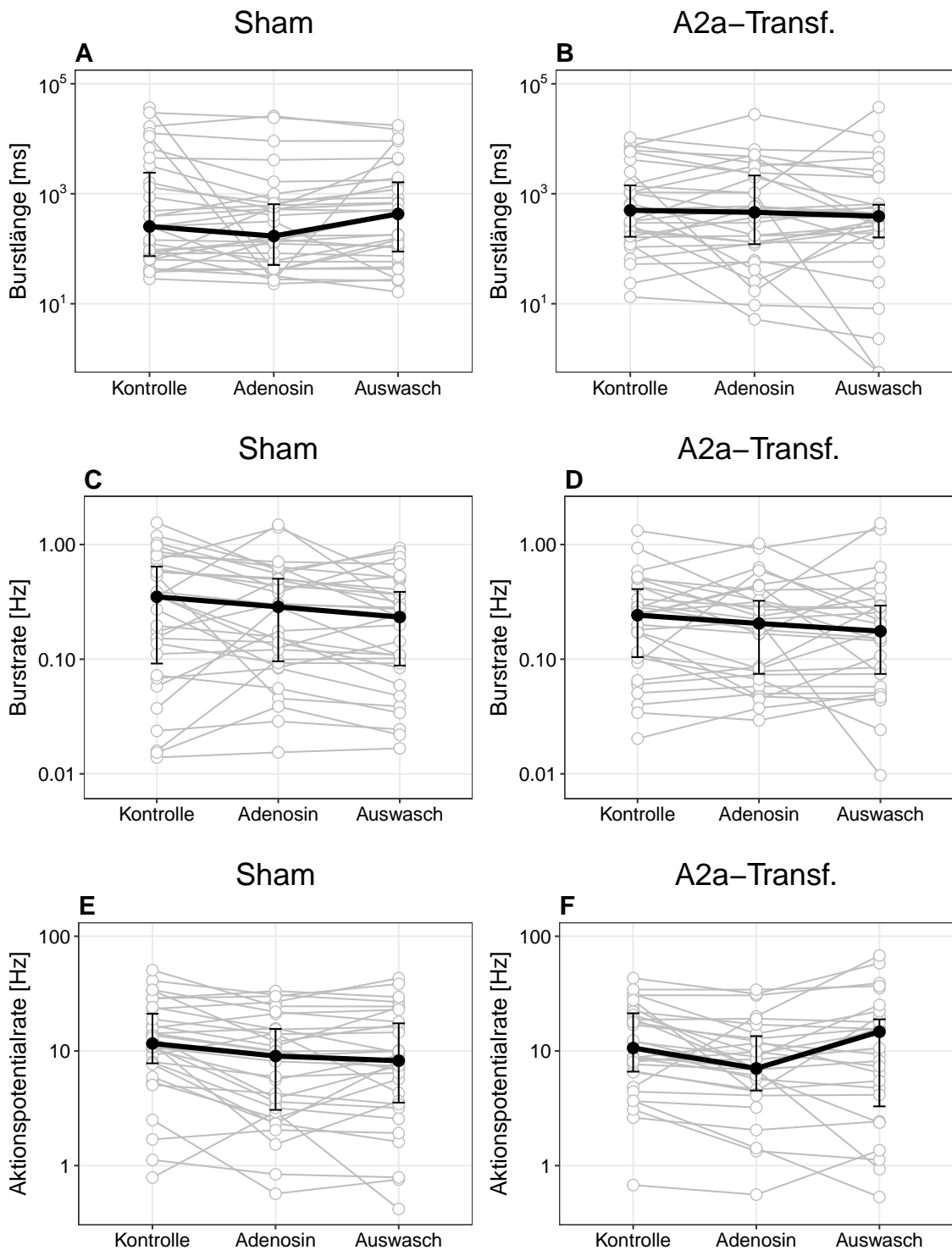


**Abbildung 3.16 – Interaktionsgrafik Adenosin-Zugabe bei A1R-Plasmid Transfektion;**  
**A:** Burstrate; **B:** Dauer der Ruhephase. Dargestellt werden der Mittelwert mit Standardabweichung der transformierten Daten (Box-Cox). Zum Vergleich werden jeweils die Daten der Kontrollgruppe (Leerplasmid) und der Versuchsgruppe (A1R-Plasmid) während der Kontrollmessung und während der Messung bei Adenosinzugabe gezeigt.

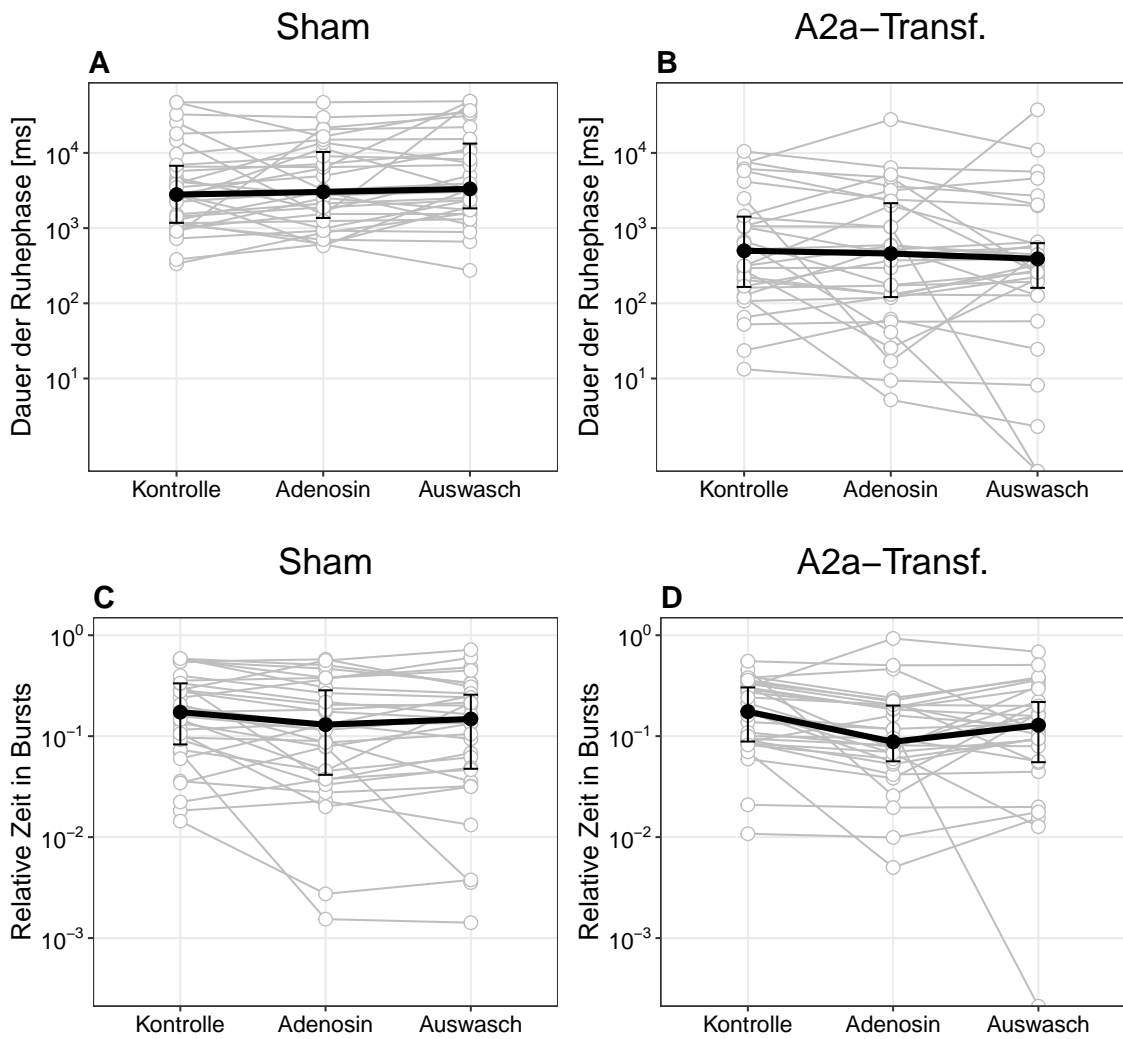
## **Effekte von appliziertem Adenosin bei erhöhter Expression von A2a-Rezeptoren**

Analog zu den elektrophysiologischen Untersuchungen mit A1R-Plasmid transfizierten Kulturen wurden auch A2aR-Plasmid transfizierte Kulturen untersucht. Da die Daten nicht normalverteilt waren, beziehen sich die folgenden Angaben auf den Median. Die Burstlänge nahm in den Kontrollkulturen um mehr als 30% ab, während sie sich bei den A2aR-Plasmid transfizierten Kulturen nur um knapp 10% verringerte. Die Burstrate nahm in beiden Gruppen um ca. 15% ab. Während sich die Aktionspotentialrate in der Kontrollgruppe bei Zugabe von Adenosin um etwa 20% reduzierte, wurde in der Versuchsgruppe eine Reduktion von etwa 30% beobachtet. Die Dauer der Ruhephase verlängerte sich in den Kontrollkulturen um ca. 10%, verringerte sich dagegen in den A2aR-Plasmid transfizierten Kulturen um etwa 10%. Auf die relative Zeit in Bursts bewirkte Adenosin in der Kontrollgruppe eine Reduktion um etwa 25% und in der Versuchsgruppe eine doppelt so hohe Reduktion um ca. 50%. Die statistische Auswertung der Box-Cox transformierten Daten erfolgte mittels gepaartem t-Test. Die Effektstärke des Vergleichs von Kontrollmessung und Messung bei Adenosin Zugabe ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Für die relative Zeit in Bursts zeigte sich durch Adenosin in der Versuchsgruppe ein signifikanter großer Effekt ( $p=0.003$ , *Cohens d*= 0.812 [0.264, 1.031]) und für die Kontrollgruppe ein signifikanter, mittlerer Effekt ( $p=0.008$ , *Cohens d*=0.515 [-0.002, 1.031]). Zudem hatte Adenosin einen signifikanten großen Effekt auf die Aktionspotentialrate der Kontrollkulturen ( $p<0.001$ , *Cohens d*= 0.87 [0.329, 1.41]) und einen mittleren Effekt auf die der A2aR-Plasmid transfizierten Kulturen ( $p=0.122$ , *Cohens d*= 0.59 [0.062, 1.118]). Für die restlichen Parameter ergaben sich für beide Gruppen nicht signifikante vernachlässigbare oder kleine Effekte.

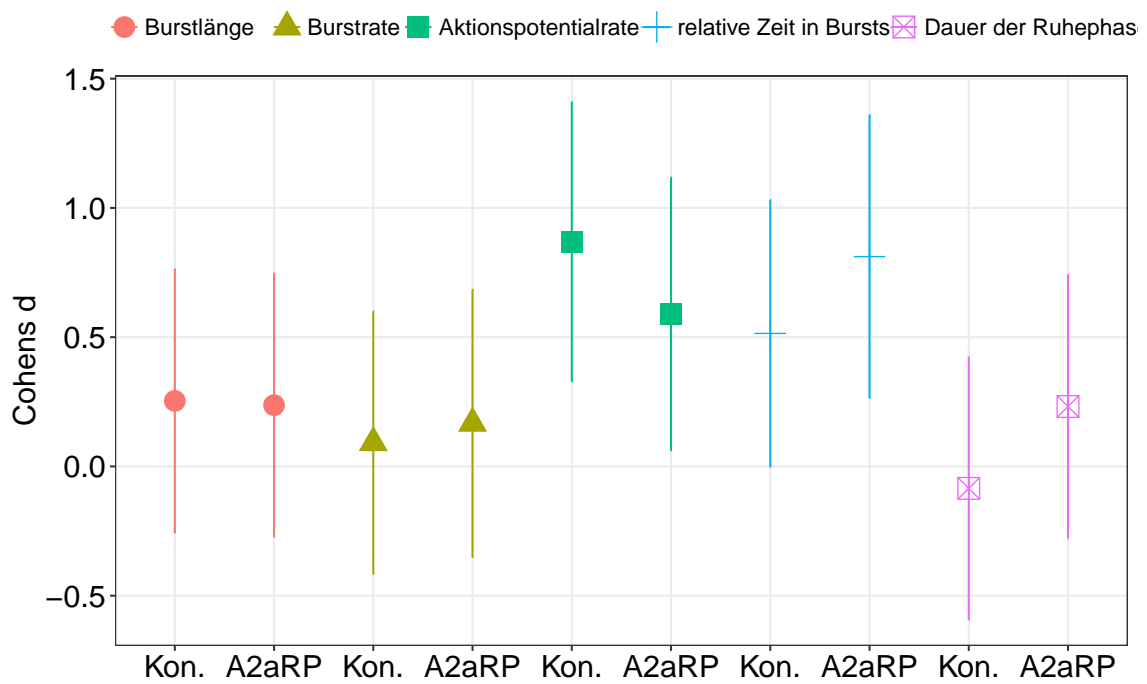
Bei etwa gleich bleibender Burstrate bewirkte Adenosin somit über eine geringe Verkürzung der Bursts eine starke Verkürzung der relativen Zeit in Bursts. Zudem wurden unter Adenosin eine Verminderung der Aktionspotentialrate beobachtet.



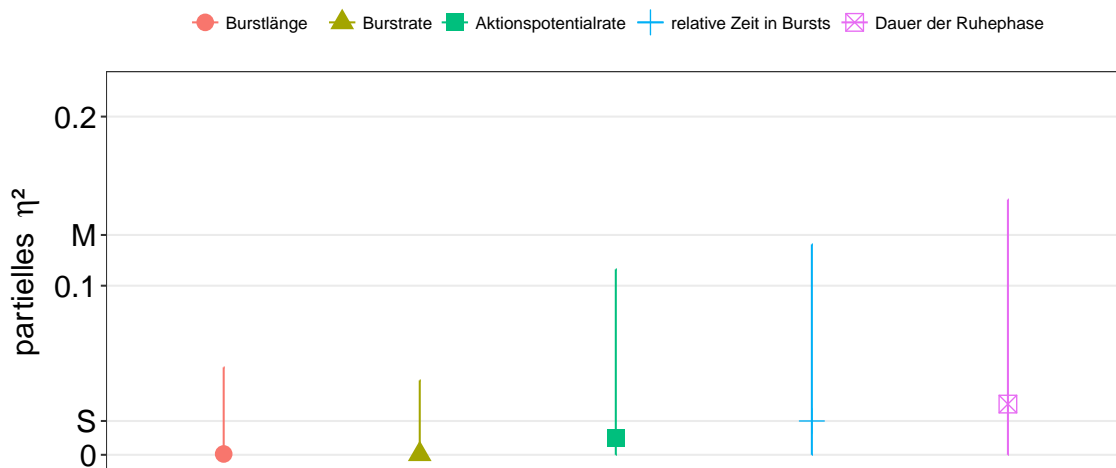
**Abbildung 3.17 – A2aR-Plasmid Transfektion unter Adenosinzugabe;** Burstlänge Kontrolle (A) und nach A2a-Rezeptor-Plasmid Transfektion (A2a-Transfektion)(B); Burstrate Kontrolle (C) und nach A2a-Transfektion (D); Aktionspotentialrate Kontrolle (E) und nach A2a-Transfektion (F). Logarithmische Darstellung des Medians und des Interquartilsabstandes während der Kontrollmessung, unter Adenosin-Zugabe und während des Auswasches.



**Abbildung 3.18 – A2aR-Plasmid Transfektion unter Adenosinzugabe;** Dauer der Ruhephase Kontrolle (A) und nach A2a-Rezeptor-Plasmid Transfektion (A2a-Transfektion) (B); relative Zeit in Bursts Kontrolle (C) und nach A2a-Transfektion (D). Logarithmische Darstellung des Medians und des Interquartilsabstandes während der Kontrollmessung, unter Adenosinzugabe und während des Auswasches.



**Abbildung 3.19 – A2aR-Plasmid Transfektion unter Adenosinzugabe:** Effekstärke (Cohens d) mit 95% Konfidenzintervall für den Vergleich von Kontrollmessung und Messung unter Adenosin-Zugabe. Dargestellt sind Ergebnisse der Kontrollgruppe (Kon.) und die Ergebnisse der Versuchsgruppe, die mit einem A2a-Rezeptor Plasmid (A2aRP) transfiziert wurde.



**Abbildung 3.20 – Interaktionseffekt Adenosin-Zugabe bei A2aR-Plasmid Transfektion:** Effektstärke  $\eta^2$  mit 95% Konfidenzintervall für den Interaktionseffekt zwischen Transfektionsart (Leerplasmid oder A2aR-Plasmid) und Messbedingung (Kontrollmessung oder Messung bei Adenosinzugabe) für verschiedene Parameter. Zur Interpretation der Effektstärke sind folgende Grenzwerte eingezeichnet: S (=small; kleiner Effekt), M (=medium; mittlerer Effekt), L (=large; großer Effekt).

### Interaktion zwischen erhöhter Expression des A2a-Rezeptors und externer Adenosinapplikation

Wie bereits für die mit dem A1R-Plasmid transfizierten Kulturen gezeigt, wurde auch für die Ergebnisse aus den Versuchen mit dem A2aR-Plasmid eine Interaktionsanalyse zwischen Adenosingabe und Transfektionsart durchgeführt. In Abbildung 3.20 ist die Effektstärke für Interaktionseffekte der Versuchsreihe mit dem A2aR-Plasmid dargestellt. In dieser Versuchsreihe ergab sich für keinen Parameter ein signifikanter Effekt. Die beobachteten Effektstärken lagen größtenteils im geringfügigen Bereich.

Dies bedeutet, dass in den Experimenten die erhöhte Expression des A2a-Rezeptors die Wirkung von Adenosin auf keinen der beobachteten Parameter veränderte.



## 4 Diskussion

Adenosin nimmt Einfluss auf die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus und der Vigilanz. In verschiedenen Entzündungsmodellen konnte im ZNS eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von Adenosin nachgewiesen werden. Deshalb könnte sich durch Inflammation auch die Expression von Adenosinrezeptoren im Kortex verändern. Dadurch könnte sich wiederum die spontane elektrophysiologische Kortexaktivität verändern. Um diese These zu überprüfen wurde in dieser Arbeit zunächst durch intraperitonealen Gabe von Zymosan eine systemische Inflammation ausgelöst und untersucht, ob sich die Expression von Adenosinrezeptoren im Kortex von Mäusen dadurch verändert. Eine signifikant erhöhte Expression des A1R nach vier Stunden in kortikalem Gewebe belegen einen Effekt von Inflammation auf die Expression von Adenosinrezeptoren im Gehirn von Mäusen. Durch eine erhöhte Rezeptordichte ist eine verstärkte Adenosinwirkung und damit eine verstärkte Änderung der spontanen Netzwerkaktivität zu erwarten. Dies wurde in einer zweiten Experimentreihe anhand eines Plasmidmodells überprüft.

Zunächste habe ich in organotypischen Kortexkulturen von Mäusen mittels Applikation eines Adenosinantagonisten gezeigt, dass intrinsisch vorhandenes Adenosin die spontane Netzwerkaktivität herabsetzt. Eine verminderte kortikale Aktivität wird auch durch verschiedene Allgemeinanästhetika, wie beispielsweise Propofol und Isofluran bewirkt. Dies konnte *in vitro* und beim Menschen durch eine verminderte kortikale Stoffwechsellaktivität während einer durch volatile Anästhetika induzierten Bewusstlosigkeit gezeigt werden. Um eine Veränderung der kortikalen Aktivität bei veränderter Rezeptordichte experimentell zu überprüfen wurde im nächsten Schritt in organotypischer Kortexkulturen mittels eines Plasmids eine stark erhöhte Rezeptorexpression verschiedener Adenosinrezeptorsubtypen erzeugt. Daraufhin wurden die Effekte von Adenosin und eines Adeno-

sinrezeptorantagonisten auf diese veränderten Kulturen untersucht. Durch die veränderte Rezeptorexpression ergaben sich nur bei wenigen elektrophysiologischen Parametern unterschiedliche Effekte. Die möglichen Gründe dafür werde ich im Folgenden diskutieren.

## **4.1 Einfluss von Inflammation auf die Adenosinrezeptorexpression**

### **4.1.1 Evaluation der Entzündungsinduktion durch Zymosan**

Im Folgenden möchte ich das verwendete Entzündungsmodell diskutieren. Durch die intraperitoneale Gabe von Zymosan, konnte zunächst eine lokale Entzündungsreaktion provoziert werden, was durch die intraperitonealen Zellzählung und der Aktivierung von Monozyten und Granulozyten nachgewiesen wurde. Diese lokale Entzündung führt dann regelhaft zu einer systematischen Inflammation, was Bastos-Pereira et al. (2014) in Ratten zeigten, indem sie drei Stunden nach peritonealer Injektion von Zymosan signifikant erhöhte Konzentrationen des Entzündungsmediators Interleukin-6 (IL-6) im Blut messen konnten. Klinisch zeigte sich eine über mehrere Stunden erhöhte Körperkerntemperatur in den Versuchstieren. Über intrazerebroventrikuläre Injektion von Antikörpern gegen Entzündungsmediatoren konnten die Autoren zudem zeigen, dass die erhöhte Körpertemperatur durch im zentralen Nervensystem freigesetzte Entzündungsmediatoren verursacht wird. Somit war bezüglich des Tiermodells gesichert, dass die periphere Entzündung das zentrale Nervensystem erreichte.

### **4.1.2 Veränderung der Adenosinrezeptorexpression im Kortex nach Induktion einer peripheren Inflammation**

#### **A1-Rezeptorexpression bei Entzündung**

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass vier Stunden nach intraperitonealer Injektion von Zymosan ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression des A1-Rezeptors induziert wurde. A1-Rezeptoren werden im Gehirn vor allem im Hippocampus, im Zerebellum und im Kortex in hoher Dichte exprimiert und haben eine hohe Affinität zu Adenosin (Dunwiddie und Masino, 2001). Die extrazelluläre Adenosinkonzentration im

zentralen Nervensystem wird durch inflammatorische Stimuli verändert. So konnten Wang und White (1999) zeigen, dass eine Exposition von aus Ratten gewonnenen Kortexkulturen mit dem bakteriellen Endotoxin LPS eine erhöhte Adenosinfreisetzung induziert. Auch während eines epileptischen Anfalls erhöht sich die Adenosinkonzentration im Gehirn. Dies konnte sowohl bei Menschen (During und Spencer, 1992) als auch im Tierrmodell gezeigt werden (Schrader et al., 1980). Bei Epilepsiepatienten konnten eine erhöhte Expression von Adenosinrezeptoren nachgewiesen werden (Angelatou et al., 1993). Des Weiteren konnten Pagonopoulou et al. (1993) im Tierversuch bei Mäusen bereits 24 Stunden nach zwei künstlich hervorgerufenen Krampfanfällen eine veränderte A1-Rezeptorexpression messen. Ähnlich wie während eines epileptischen Anfalls konnte auch in Ischämie modellen des zentralen Nervensystems eine erhöhte Adenosinkonzentrationen in verschiedenen neuronalen Geweben, zum Beispiel im Kortex (Phillis et al., 1987) oder im Hippocampus (Dale et al., 2000) gezeigt werden. Weiterhin führte eine Ischämie nach 24 Stunden zu einer Erhöhung der A1-Rezeptorexpression (Zhou et al., 2004). Die aus der Literatur entnommenen Daten lassen darauf schließen, dass es unter pathophysiologischen Stimuli des zentralen Nervensystems nicht nur zu einer Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration kommt, sondern auch zu einer verstärkten Expression der A1 Adenosinrezeptoren. Von da her war es naheliegend anzunehmen, dass es auch durch eine Inflammation zu einer Veränderung der A1-Adenosinrezeptorexpression kommt. In *in vitro* Versuchen konnten Biber et al. (2001) diese Annahme sowohl in Astrozytenkulturen als auch in organotypischen Kortexschnitten von Ratten bestätigen. Dabei zeigten die Autoren eine Erhöhung der A1R mRNA-Expression in den Versuchskulturen drei bis zwölf Stunden nach Exposition gegenüber dem Entzündungsmediator Interleukin-6. In retinalen Ganglionzellen konnten Perigolo-Vicente et al. (2014) zeigen, dass eine Exposition mit Interleukin-6 nach 24 Stunden zu einer verminderten und nach 48 Stunden zu einer erhöhten A1R mRNA-Expression führt. Eine erhöhte Expression von mRNA korreliert wiederum mit einer erhöhten Dichte von Rezeptorproteinen (Biber et al., 1997). In meinen Versuchen konnte ich somit erstmals in einem *in vivo* Modell zeigen, dass eine intraperitoneal Inflammation zu einer Erhöhung der Expression von A1-Rezeptoren führt. Eine derartig verstärkte Expression kann als Bemühen des Organismus um die Induktion einer protektiven Präkonditionierung interpretiert werden, wie sie auch nach zerebralen Ischämien beobachtet wird (Liu et al., 2009), denn A1-Rezeptoren sind an

der neuroprotektiven Präkonditionierung nach ischämischen Ereignissen beteiligt (Zhou et al., 2004).

### **A2a-Rezeptorexpression bei Entzündung**

Für den A2a-Rezeptor konnte nach Zymosanexposition zu keinem der betrachteten Zeitpunkte ein signifikanter Effekt des Expressionsmusters festgestellt werden. Der A2a-Rezeptor wird im Gehirn vor allem im Striatum und im Tuberculum olfactorium exprimiert und liegt ansonsten in einer niedrigen Dichte vor (Fredholm et al., 2000). In retinalen Ganglionzellen konnten Perigolo-Vicente et al. (2014) zeigen, dass 24 Stunden nach Stimulation mit Interleukin-6 eine erhohnte Expression und 48 Stunden nach Stimulation eine verminderte Konzentration der A2aR mRNA-Expression vorliegt. Im Striatum steigt die A2aR Expression 24 Stunden nach einer willkürlich induzierten Ischämie an (Trincavelli et al., 2008).

Dale et al. (2000) vermuteten, dass die erhohnte Rezeptorexpression ein Kompensationsmechanismus ist, um eine verminderte Anzahl an G-Proteinen auszugleichen. 1999). In den von mir durchgeführten Experimenten konnte ein derartiger Anstieg nicht beobachtet werden. Dies kann entweder dadurch bedingt sein, dass die Zeit der Messung nach Exposition (4h) zu kurz ist, oder dass eine derartige Veränderung im Kortex nicht nachweisbar ist.

### **A2b-Rezeptorexpression bei Entzündung**

In dem von mir verwendeten Inflammationsmodell konnte ich bis vier Stunden nach Zymosanexposition keine Veränderung der A2b-Rezeptor mRNA-Expression beobachten. Der A2b-Rezeptor wird im Gehirn in einer geringen Dichte exprimiert und hat eine niedrige Affinität zu Adenosin (Dunwiddie and Masino, 2001). In einem in vivo Modell führte eine chronische LPS-Infusion in den vierten Ventrikel von Ratten zu einer verminderten A2b-Rezeptorexpression im Kortex (Rosi et al., 2003). Diesen Anstieg konnte ich in dem von mir verwendeten Modell nicht beobachten. Eine wahrscheinliche Erklärung für diese vermeindliche Diskrepanz liegt in der von mir verwendeten Dauer und Stärke des inflammatorischen Stimulus. Während in dem von mir verwendeten Modell über einen Zeitraum von vier Stunden stimuliert wurde, erstreckte sich die LPS-Stimulation in den Experimenten von Rosi et al. über einen Zeitraum von 28 Tagen. Somit ist es

gut vorstellbar, dass unterschiedliche Expositionszeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Ähnlich wie der A1-Rezeptor scheint der A2b-Rezeptor an der neuroprotektiven Präkonditionierung nach ischämischen Ereignissen beteiligt zu sein (Zhou et al., 2004). Dafür spricht beispielsweise, dass die Aktivierung des A2b-Rezeptors in Astrozyten zu einer erhöhten Expression von IL-6 führt (Schwaninger et al., 1997), das an der Präkonditionierung nach ischämischen Ereignissen beteiligt ist (Westberg et al., 2007).

### **A3-Rezeptorexpression bei Entzündung**

Nach einer vierstündigen Zymosanexposition konnte ich keine Veränderung der A3-Rezeptor mRNA in kortikalem Gewebe beobachten. Der A3-Rezeptor wird im Gehirn ähnlich wie der A2b-Rezeptor in geringer Dichte exprimiert und hat eine niedrige Affinität zu Adenosin (Dunwiddie and Masino, 2001). Wie der A2b-Rezeptor ist auch der A3-Rezeptor an neuroprotektiven Mechanismen beteiligt. So konnten Chen et al. (2006) in Kortexkulturen zeigen, dass die Gabe eines A3-Rezeptor Agonisten die durch Hypoxie vermittelte Pathologie abschwächte. Weiterhin wiesen die Autoren neuroprotektive Eigenschaften durch die Aktivierung von A3-Rezeptoren in einem in vivo Versuch an Ratten und mit A3-Knockout Mäusen nach. Die Aktivierung des A3-Rezeptors in Astrozyten führte zur Ausschüttung von CC-Chemokineligand 2 (CCL2), einem neuroprotektiven Chemokin (Wittendorp et al., 2004). Neben Astrozyten und Pyramidenzellen exprimieren auch Mikrogliazellen den A3-Rezeptor (Hammarberg et al., 2003). In ruhenden Mikrogliazellen hatte die Aktivierung von A3-Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf A2a-Rezeptoren (van der Putten et al., 2009). Diese wiederum inhibieren die Zytokinausschüttung nach Toll-like Rezeptor (TLR) Aktivierung. Damit führt der A3R indirekt zu einer erhöhten Zytokinausschüttung in ruhenden Mikrogliazellen. Eine Aktivierung der TLRs von Mikrogliazellen führt nach 16 Stunden zu einer verminderten A3R Expression (van der Putten et al., 2009), was Ausdruck einer negativen Rückkopplung sein könnte. Da es auch im Zymosanmodell zu einer Aktivierung von TLRs kommt (Sato et al., 2003), würde man in den Mikrogliazellen eine verminderte A3-Rezeptor mRNA Expression erwarten. Vier Stunden könnten als Beobachtungszeitraum jedoch zu kurz sein, um diesen Effekt zu zeigen. Zudem kann keine sichere Aussage über eine veränderte Expression der Rezeptoren in Mikrogliazellen getroffen werden, da Mikrogliazellen in meinen Experimenten nicht getrennt untersucht wurden.

## **4.2 Die Rolle von Adenosinrezeptoren in neuronalen Netzwerken**

Ich möchte hier zunächst auf allgemeine Prinzipien der Entstehung und Terminierung von gruppierter Netzwerkaktivität eingehen. In kortikalen Netzwerken in vitro tritt neuronale Aktivität in Form von Phasen hoher Aktionspotentialaktivität („Bursts“) auf, die sich mit Phasen relativer Ruhe („Ruhephasen“) abwechseln. Der Übergang von Ruhephasen zu Bursts kann durch die Überlagerung von zufälligen, aktionspotentialunabhängigen, erregenden synaptischen Ereignissen erfolgen, die in einigen Neuronen zu überschwelliger Aktivität führen, welche wiederum weitere Neuronen aktivieren und so einen Burst initiieren (Chauvette et al., 2010). Es gibt jedoch auch die Vermutung, dass insbesondere in der kortikalen Schicht fünf Burst-generierende Neurone existieren, die durchgehend eine bestimmte Aktionspotentialfrequenz haben und dadurch großen Einfluss auf die Netzwerkaktivität nehmen (Wang und McCormick, 1993). Sobald ein Burst beginnt, erfolgt aufgrund des intensiven erregenden synaptischen Einstroms, und der oftmals resultierenden Aktionspotentialaktivität, ein Einstrom von Natrium- und Kalziumionen in die Neuronen. Die resultierende Depolarisation der Neurone wird durch zwei Mechanismen kontrolliert; zum einen die synaptische Inhibition, zum anderen durch Kaliumleitfähigkeiten, die durch die akkumulierenden Natrium- und Kalziumkonzentrationen aktiviert werden (Compte et al., 2003). Wird ein Schwellenwert von Natrium- und Kalziumkonzentrationen erreicht, überwiegt der hyperpolarisierende Einfluss der aktivierten Kaliumströme und der Burst endet. Nach einem Burst ist das Neuron in einer Ruhephase stark verringerter Erregbarkeit, in der die ionale Balance wiederhergestellt wird.

### **4.2.1 Intrinsisches Adenosin moduliert neuronale Netzwerkaktivität in organotypischen Kulturen des Neokortex**

Durch die Gabe des A1-Antagonisten DPCPX zeigte sich in den von mir durchgeführten Experimenten ein vermehrtes Auftreten von Bursts, messbar in der verminderten Dauer der Ruhephasen und einer erhöhten Burstrate. Dabei ließ sich eine verkürzte Burstlänge und damit einhergehend eine verminderte relative Zeit in Bursts beobachten. Außerdem zeigte sich eine verminderte Aktionspotentialrate. Durch die Blockade von Adeno-

sinrezeptoren kommt es zu einer relativen Depolarisation sowie zu einer erhöhten Rate an spontaner Transmitterausschüttung. Dies sollte sowohl die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Aktionspotentialen als auch von Bursts erhöhen. Auch in Burst-generierenden Neuronen könnte dadurch eine erhöhte Aktionspotentialrate bewirkt werden, die wiederum zu einer höheren Burstrate beitragen könnte. Zwar konnte eine erhöhte Burstrate und eine verminderte Dauer der Ruhephase beobachtet werden, die Aktionspotentialrate war insgesamt allerdings durch Blockade der A1-Rezeptoren vermindert. Zudem sind durch die Blockade des A1-Rezeptors stärkere exzitatorische Ströme zu erwarten. Stärkere exzitatorische Ströme könnten über einen vermehrten Einstrom von positiv geladenen Ionen zu einer schnelleren Beendigung der Bursts führen. Um diese These zu überprüfen, wurde die Aktionspotentialdichte während der Bursts untersucht (nicht gezeigt). Dabei stellte sich jedoch heraus, dass bei Blockade der Adenosinrezeptoren die Aktionspotentialdichte in Bursts sank. Der Grund für die verkürzte Burstlänge könnte stattdessen in der verkürzten Zeit zwischen den Bursts liegen. Durch eine kürzere Regenerationsphase könnten die Bursts durch Regulationsmechanismen früher beendet werden. In einer ähnlichen Arbeit von Wall and Richardson (2015) zeigte sich durch Blockade von A1-Rezeptoren in akuten Schnitten des Neokortex passend zu den genannten Ergebnissen eine erhöhte Burstrate. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit eine Verlängerung der Bursts. Dieser Unterschied könnte sich dadurch erklären lassen, dass in der Studie von Wall und Richardson (2015) die Kortexkulturen chemisch stimuliert wurden.

Zusätzlich zeigen die Effekte durch DPCPX, dass Adenosin in unstimulierten Kortexkulturen in Konzentrationen vorliegt, die Adenosinrezeptoren aktivieren können. Dies entspricht der Erkenntnis von früheren Arbeiten (Kerr et al. (2013), Dunwiddie et al.(1994), Dunwiddie (1980)). Die Autoren konnten zeigen, dass Adenosin in reifen Kortexzellen von Ratten ohne Stimulation in ausreichenden Konzentrationen vorliegt, um permanent synaptische Potentiale zu modulieren. Auch spontane Transmitterausschüttungen werden tonisch durch Adenosin gehemmt (Bannon et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Blockade von Adenosin A1-Rezeptoren zu einer verminderten Aktionspotentialrate und zu einer verminderten Burstlänge führte, während die Burstrate anstieg. Dies wird wahrscheinlich durch die verminderte Hemmung durch Adenosin ausgelöst, wodurch sich die Dauer der Ruhephase verkürzt und die Zellen dadurch eine verkürzte Erholungsphase haben. Dies führt zu einer schnelle-

ren Beendigung der Bursts. Dieser dämpfende Einfluss von Adenosin wirkt tonisch auf Neurone.

#### **4.2.2 Externe Zugabe von Adenosin hemmt neokortikale Netzwerkaktivität**

Durch die Gabe von Adenosin zeigte sich sowohl in A1-Plasmid transfizierten Kulturen als auch in Kontrollkulturen eine verminderte Aktionspotentialrate, eine kürzere Burstlänge und damit einhergehend eine verminderte relative Zeit in Bursts. Die Dauer der Ruhephasen stieg in den Kontrollkulturen an und blieb in der Versuchsgruppe nahezu unverändert. Auch in der Versuchsreihe mit dem A2a-Plasmid transfizierten Kulturen zeigte sich eine verminderte Aktionspotentialrate und eine verminderte Zeit in Bursts. Die Burstlänge wurde dagegen kaum beeinflusst. Die Burstrate blieb in beiden Versuchsreihen nahezu unverändert. Durch eine verstärkte Aktivierung von Adenosinrezeptoren ist eine stärkere Hyperpolarisation und eine verminderte Rate an spontaner Transmitterausschüttung, sowie eine verlängerte Zeit bis zum Erreichen des Schwellenwertes für einen Burst zu erwarten. Lediglich in der A1R-Plasmid Versuchsreihe zeigte sich in der Kontrollgruppe nach Adenosinzugabe eine verlängerte Dauer der Ruhephase. Weder in der A1-transfizierten Gruppe, noch in der Versuchsreihe mit dem A2a-Plasmid kam es zu einem signifikanten Effekt.

Des Weiteren ist zu erwarten, dass eine stärkere Aktivierung von Adenosinrezeptoren durch die Gabe von Adenosin exzitatorische Ströme stärker hemmt. Dies sollte mit einer verminderten Aktionspotentialrate einhergehen. Dies konnte in beiden Versuchsreihen unter allen Transfektionsbedingungen gezeigt werden. Wie auch bei den Experimenten mit dem Adenosinantagonist konnte in der Versuchsreihe mit dem A1R-Plasmid sowohl bei Kontroll- und Versuchstieren eine kürzere Burstlänge und damit einhergehend eine verminderte relative Zeit in Bursts beobachtet werden. Auch in der Versuchsreihe mit dem A2aR-Plasmid konnte bei Kontrolltieren und transfizierten Tieren eine nicht signifikante Verkürzung der Burstlänge und eine signifikante Verminderung der relativen Zeit in Bursts beobachtet werden. Dies könnte durch die Hemmung exzitatorischer Ströme bedingt sein. Dadurch könnten inhibitorische Ströme das Membranpotential schneller wieder repolarisieren. In der Studie von Wall and Richardson (2015) konnte durch die Zugabe von Adenosin bei Kortexkulturen in Übereinstimmung mit den beschriebenen Er-



gebnissen eine Verkürzung der Burstlänge beobachtet werden. Dagegen konnte die von den Autoren beschriebene signifikant verminderte Burstrate in keinem der Experimente beobachtet werden.

Adenosin hat generell eine dämpfende Wirkung auf Neuronen. Diese Wirkung wird sowohl durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran (Bannon et al., 2014) als auch durch eine verminderte Ausschüttung von erregenden Transmittern vermittelt (Brundege und Dunwiddie, 1996). Adenosin kann in verschiedenen Hirnregionen eine Hyperpolarisation bewirken, beispielsweise im Hippocampus (Dunwiddie und Fredholm, 1989) und auch im Kortex (van Aerde et al. (2015), Bannon et al. (2014)). Eine Hyperpolarisation vermindert die Wahrscheinlichkeit von Aktionspotentialen. Durch weniger Aktionspotentiale in der Ruhephase von neuronalen Netzwerken sollte die Dauer verlängert werden, bis die Schwelle erreicht ist, in dem ein Netzwerk in einen Burst übergeht. Zudem ist durch Hyperpolarisation das Schwellenpotential erhöht, das erreicht werden muss, um einen Burst auszulösen. Auch die spontane Ausschüttung von Transmittern, die zur Entstehung von Bursts beiträgt, wird durch Adenosin gehemmt (Scanziani et al., 1992). Dieser Effekt wird über A1-Rezeptoren vermittelt (Bannon et al., 2014).

Aktivierung von präsynaptischen Adenosinrezeptoren hemmt exzitatorische Ströme (Brundege und Dunwiddie (1996), Yoon und Rothman (1991)). Dies geschieht durch eine Hemmung der Freisetzung exzitatorischer Transmitter wie Glutamat (Kerr et al. (2013), Dunwiddie und Haas (1985)). Zudem gibt es einen postsynaptischen Effekt auf NMDA-Rezeptoren. So konnten de Mendonca et al. (1995) in Neuronen des Hippocampus zeigen, dass durch die Aktivierung von postsynaptischen A1-Rezeptoren die NMDA-Rezeptor vermittelten exzitatorischen Ströme vermindert sind. Die Hemmung durch Adenosin ist über A1-Rezeptoren vermittelt und ist konzentrationsabhängig (Bannon et al., 2014). Inhibitorische Ströme werden nur in bestimmten Regionen gehemmt. Im Hippocampus und bestimmten Schichten des Kortexes scheint es zu keiner Hemmung inhibitorischer Ströme zu kommen ( (Brundege und Dunwiddie (1996), Yoon und Rothman (1991), Lambert und Teyler (1991)). In bestimmten Schichten des Neokortex konnte jedoch in Pyramidenzellen eine Hemmung inhibitorischer Ströme gezeigt werden (Zhang et al., 2015). Dabei beobachteten die Autoren, dass bei Adenosinkonzentrationen  $<10\mu M$  die Hemmung inhibitorischer Synapsen überwiegt, während ab einer Konzentration von  $>10\mu M$  eine Hemmung exzitatorischer Synapsen überwiegt. Da die Hemmung inhibitorischer Ströme

nur in einem kleinen Anteil der Zellen vorkommt, ist insgesamt eine überwiegende Hemmung von exzitatorischen Strömen zu erwarten. Prinzipiell scheint Adenosin so jedoch in bestimmten Zellen sowohl exzitatorische, als auch inhibitorische Ströme hemmen zu können.

Eine verminderte kortikale Aktivität wird auch durch verschiedene Allgemeinanästhetika, wie beispielsweise Propofol und Isofluran bewirkt (Antkowiak (1999), Antkowiak und Helfrich-Forster (1998)). Dabei wirken Allgemeinanästhetika intrakortikal über die Verstärkung der GABA-A-Rezeptor vermittelte Inhibition (Hentschke et al., 2005b). Auch bei Menschen wurden bei Bewusstlosigkeit durch volatile Anästhetika eine Verminderung der kortikalen Stoffwechselaktivität von bis zu 50% nachgewiesen, was auf eine verminderte kortikale Aktivität hinweist (Alkire et al. (1997), Alkire et al. (1999)).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in beiden Versuchsreihen über alle Transfektionsbedingungen hinweg durch Adenosin eine signifikante Verminderung der Aktionspotentialrate ausgelöst wurde. Dieser Effekt wird vermutlich über eine Hyperpolarisation der Zellmembran und eine verminderte Ausschüttung exzitatorischer Transmitter vermittelt, wodurch die Wahrscheinlichkeit für ein Aktionspotential sinkt. Zudem hat sich die relative Zeit in Bursts signifikant verkürzt.

### **4.3 Einfluss einer erhöhten Expression von Adenosinrezeptoren auf neuronale Netzwerke**

Die Transfektion mit den A1R- bzw. A2aR-Plasmid führte zu einer erhöhten mRNA Expression. Dies konnte durch RT-PCR belegt werden. Biber et al. (1997) konnten zeigen, dass die mRNA Expression mit der Rezeptorexpression korreliert. Um die Transfektion auf Proteinebene zu evaluieren, wurde ein A3-Rezeptor-Plasmid, das mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelt war, genutzt. In der Immunfluoreszenz konnte nach Transfektion das fluoreszierende Protein nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass auch das Rezeptorprotein exprimiert wird. Trotz erhöhter Rezeptorexpression zeigte sich in den Experimenten mit den A2aR-Plasmid transfizierten Kulturen kein veränderter Effekt bei Gabe von Adenosin. Auch in der Versuchsreihe mit dem A1R-Plasmid beeinflusste die erhöhte Rezeptorexpression nicht die Wirkung des A1-Rezeptor Antagonisten DPCPX. Bei erhöhter A1-Rezeptor mRNA zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei

der Wirkung von Adenosin im Vergleich zur Kontrolle bei den Parametern Burstrate und Dauer der Ruhephase. Dabei wurden die Kontrollkulturen mit unveränderter Expression des A1-Rezeptors stärker von Adenosin beeinflusst als die Kulturen mit erhöhter Expression.

Da die dämpfende Wirkung von Adenosin hauptsächlich durch A1-Rezeptoren vermittelt wird, ist durch eine erhöhte Expression funktionaler A1-Rezeptoren eine stärkere Dämpfung durch Adenosin beziehungsweise eine stärkere Enthemmung durch den Adenosinantagonisten zu erwarten. In der Versuchsreihe mit dem A1R-Plasmid konnten bei Gabe des A1R-Antagonisten DPCPX keine Veränderung durch die Transfektion beobachtet werden. Bei Zugabe des Antagonisten ergaben sich bei den scheintransfizierten Kulturen ähnliche Effekte wie bei den A1R-Plasmid transfizierten Kulturen. Dagegen ergaben sich signifikante Interaktionseffekte zwischen der Transfektion und Adenosinzugabe bei der Burstrate und der Dauer der Ruhephase. Während die Burstrate durch Adenosinzugabe in den Kontrollkulturen tendenziell eher sank, stieg sie in den A1R-Plasmid transfizierten Kulturen leicht an. Die Dauer der Ruhephase veränderte sich bei den A1R-Plasmid transfizierten Gruppen durch Adenosinzugabe kaum, während sie in den scheintransfizierten Kulturen anstieg. Die Versuchsreihe mit dem A1-Antagonisten zeigen, dass die basale Konzentration von Adenosin in den Kortexkulturen ausreicht um A1-Rezeptoren zu aktivieren. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten (Kerr et al. (2013), Dunwiddie et al. (1994), Dunwiddie (1980)). Die basale Adenosinkonzentration könnte durch die erhöhte Expression der Adenosinrezeptoren bereits während der Kontrollmessung einen größeren Effekt auf die A1R-Plasmid transfizierten Kulturen haben. Dies würde die Unterschiede in den Kontrollmessungen erklären. Die A1R-Plasmid transfizierten Kulturen haben bereits in der Kontrollmessung eine niedrigere Burstrate und eine längere Dauer der Ruhephase im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Eine zusätzliche Gabe von Adenosin hat fast keinen Effekt auf die transfizierten Kulturen. Die scheintransfizierten Kulturen dagegen nähern sich durch die Adenosingabe den Werten an, die die A1R-Plasmid transfizierten Kulturen bereits in der Kontrollmessung eingenommen haben. Eventuell könnten noch höhere Adenosinkonzentrationen stärkere Effekte bei der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auslösen.

Für die anderen Parameter wurde nach Transfektion mit dem A1R-Plasmid kein Interaktionseffekt zwischen Adenosingabe und Transfektion beobachtet.

Eine Aktivierung des A2a-Rezeptors hat wahrscheinlich eine erregende Wirkung auf kortikale Neurone (Lopes et al., 2002). Somit ist durch eine erhöhte Expression des A2a-Rezeptors eine verminderte Hemmung durch Adenosin zu erwarten. Nach Transfektion mit dem A2aR-Plasmid ließen sich jedoch keine Interaktionseffekte zwischen Adenosin und Transfektion zeigen. Dies könnte daran liegen, dass die Wirkung von A2a-Rezeptoren durch die Modulation von A1-Rezeptoren vermittelt zu sein scheint. Darauf deutet die Tatsache hin, dass sich Effekte von A2aR-Agonisten nicht in Abwesenheit von Adenosin oder bei Blockade von A1-Rezeptoren beobachten lassen (Zhang et al. (2015), Bannon et al. (2014)). Darüber hinaus konnten Ciruela et al. (2006) mit verschiedenen Methoden nachweisen, dass A1R und A2aR in Heterodimeren vorliegen können. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass die Aktivierung von A2aR die Affinität von A1R für Agonisten vermindert. In dem oben beschriebenen Plasmidmodell wurde nur die Expression des A2aR erhöht. Die neueren Erkenntnisse zum A2aR deuten jedoch darauf hin, dass A2aR vor allem über die Modulation von A1R wirken und dies mindestens teilweise nach Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren geschieht. Ob es im Rahmen der plasmidbedingten erhöhten Expression des A2aR auch zu einer Heterodimerisierung kommt, wurde nicht untersucht. Dementsprechend könnte eine ausbleibende Heterodimerisierung der Rezeptoren mit A1R die Erklärung sein, warum die erhöhte A2aR-Expression keinen Effekt auf die Wirkung von Adenosin und DPCPX in den Experimenten hatte.

Die geringen Effekte durch die erhöhte Adenosinrezeptorexpression könnten auch auf eine verminderte Funktionalität der exprimierten Rezeptoren hinweisen. Ob die durch die Plasmidtransfektion exprimierten Rezeptoren funktional waren, wurde in den hier vorgestellten Versuchen nicht überprüft. In einem ähnlichen Plasmidmodell konnten Serchov et al. (2012) jedoch zeigen, dass Adenosinagonisten bei Kulturen mit einer erhöhten Expression von A1-Rezeptoren spannungsgesteuerter Kalziumkanäle stärker hemmen, als scheintransfizierte Kulturen. Zudem zeigten Neurone mit einer erhöhten A1R Expression eine höhere Überlebensrate bei Stimulation mit hohen Glutamatkonzentrationen. Somit scheint es prinzipiell möglich zu sein, die Expression funktionaler Adenosinrezeptoren durch eine Plasmidtransfektion zu erreichen. Allerdings gibt es Belege für Heterodimerisierung von Adenosinrezeptoren mit anderen Rezeptoren (Ferre et al., 2007). Ob es im Plasmidmodell auch zu einer solchen Heterodimerisierung kommt, ist nicht bekannt. Eine fehlende Heterodimerisierung mit verschiedensten Rezeptoren für Neurotransmitter

könnte die fehlenden Effekte durch die erhöhte Expression zumindest teilweise erklären.

Eine andere Erklärung für den geringen Effekt könnte die Signalweiterleitung nach Adenosinrezeptoren Aktivierung betreffen. Adenosinrezeptoren sind mit G-Proteinen gekoppelt (Dunwiddie und Masino, 2001). Eine zu geringe Anzahl an G-Proteinen kann erklären, warum nur ein Teil der exprimierten Rezeptoren funktional ist. Zudem gibt es Hinweise auf im Gehirn regional unterschiedliche G-Proteine, die wiederum zu unterschiedlich starken Bindung von Adenosin an Adenosinrezeptoren führen können (Fastbom und Fredholm, 1990). Von den G-Proteinen ist weiterhin bekannt, dass deren Konzentration durch pathophysiologische Veränderungen moduliert werden kann. Trincavelli et al. (2008) konnten an Ratten zeigen, dass die Konzentration an G-Proteinen in einem Ischämiemodell abnahm. Dies zog eine verminderte Kopplung von A2a-Rezeptoren und G-Proteinen nach sich. Dabei erhöhte sich die A2a-Rezeptordichte. Die Funktionalität der A2a-Rezeptor Kaskade blieb insgesamt jedoch unverändert, was die Autoren anhand des Einflusses auf das G-Protein gesteuerte Enzym Adenylatzyklase zeigten. Daher vermuteten die Autoren, dass eine Veränderung der Konzentration an G-Proteinen durch eine gegensätzliche Veränderung der Expression an Rezeptorproteinen kompensiert wurde. Dieser Kompensationsmechanismus ist auch umgekehrt denkbar. Deshalb wäre es plausibel, dass die durch die Plasmide erhöhte Rezeptorproteindichte im Sinne dieses Kompensationsmechanismus eine verminderte G-Protein Konzentration zur Folge hat. Dies würde einer veränderten Funktionalität der Rezeptor-Signal-Kaskade entgegensteuern, ähnlich wie im von Trincavelli et al. beschriebenen Ischämiemodell. Die mit den Adenosinrezeptoren gekoppelten G-Proteine sind essentiell für die Rezeptor-Signal-Kaskade. Um die Veränderungen durch die Transfektion mit den Adenosinrezeptorplasmiden besser zu verstehen, könnte deshalb eine Untersuchung der G-Proteinkonzentration vor und nach der Transfektion sinnvoll sein. Diese könnte zeigen, ob es zu dem oben beschriebenen Kompensationsmechanismus kommt. Darüber hinaus könnten Patchclamp-Versuche Aufschluss geben, ob die exprimierten Rezeptorproteine funktional sind. Auch eine quantitative Bestimmung der Rezeptorproteine könnte hilfreich sein, um die Reaktionen in den kortikalen Zellen durch die Transfektion besser zu verstehen. Darüber hinaus könnte auch eine geringe Transfektionseffizienz für die geringen Effekte verantwortlich sein. Serchov et al. berichteten in ihrem Plasmidmodell je nach Zellart und Transfektionsprotokoll eine Transfektionseffizienz von 10-60%. Dabei war ein dem von mir verwendeten

Transfektionsprotokoll ähnliches Vorgehen erfolgreicher. Trotzdem könnte eine stark erhöhte Rezeptorexpression in einigen wenigen Zellen zu den beobachteten Ergebnissen bei der Plasmidevaluation führen, ohne sich stark auf die Elektrophysiologie aller Zellen der Kultur auszuwirken.

Somit konnte ich in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine systemische Inflammation zu einer vermehrten Expression kortikaler A1-Adenosinrezeptoren führt, welche zumindest in organotypischen Kortexkulturen durch intrinsisch vorhandenes Adenosin dämpfend auf die spontane Netzwerkaktivität wirken. Damit könnte der Effekt von Inflammation auf die Adenosin A1-Rezeptorexpression im Kortex ein wichtiger Teil der Erklärung für die bei septischen Patienten regelhaft auftretenden Vigilanzminderung sein. Diese Vigilanzminderung wiederum könnte eine Wirkungsverstärkung der hypnotischen Wirkung von Allgemeinanästhetika mitbedingen. Daher leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Grundlagenverständnis der Anästhetikawirkung während inflammatorischen Zuständen.

## 5 Zusammenfassung

Es konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass eine zu tiefe Narkose mit einem schlechteren Outcome nach chirurgischen Eingriffen korreliert. Die Patienten sind durch die Operation inflammatorischen Stimuli ausgesetzt. Derartige systemische inflammatorische Stimuli können die Blut-Hirn-Schranke überwinden und zu einer Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration im Gehirn führen. Der Neurotransmitter Adenosin ist an der Regulation des Schlaf-Wachzyklus maßgeblich beteiligt und modifiziert die Erregbarkeit der Neurone im Kortex.

In der vorliegenden Arbeit habe ich untersucht, ob eine periphere Entzündung die Expression von Adenosinrezeptoren im Kortex von Mäusen verändert. Hierzu wurde Mäusen intraperitoneal Zymosan A injiziert. Zymosan ist ein Aktivator des Komplementsystems und wirkt so als Pyrogen und mikrobielles Toxin. Dadurch werden Symptome einer Sepsis induziert. In den von mir untersuchten Kortexpräparaten wurden vier Stunden nach intraperitonealer Injektion A1-Adenosinrezeptoren signifikant vermehrt exprimiert. Dies galt jedoch nicht für A2a-, A2b- und A3-Rezeptoren. Im zweiten Teil der Arbeit habe ich ein *in vitro* Modell für die Wirkung von Adenosin in kultivierten kortikalen Kulturen etabliert. Hierzu habe ich zunächst die Effekte von extrazellulärem Adenosin auf die Spontanaktivität in diesen neuronalen Netzwerken getestet. In einem weiteren Schritt habe ich dann mittels eines Plasmidmodells eine stark erhöhte Adenosinrezeptorexpression in kortikalen Kulturen erzeugt und die Auswirkungen mittels Elektrophysiologie untersucht. In den organotypischen Kortexkulturen erzeugte die Applikation des A1-Rezeptor Antagonisten DPCPX eine Aktivierung der spontanen Netzwerkaktivität, was für das Vorhandensein von intrinsischem Adenosin, das über A1-Rezeptoren die spontane Aktionspotentialaktivität moduliert, spricht. Die Überexpression von A1-Rezeptoren erzeugte hingegen he-

terogene Ergebnisse. Die im Modell erhöhte Adenosinrezeptorexpression wirkte sich nur auf wenige der gemessenen elektrophysiologischen Parameter aus. Dafür könnten eine fehlende Heterodimerisierung der künstlich exprimierten Adenosinrezeptoren ursächlich sein, ohne die nicht das volle Wirkspektrum der Rezeptoren erreicht werden könnte. Zudem könnte eine fehlende Erhöhung der für die nachgeschaltete Signalkaskade nötigen Proteine zu nicht funktionalen Rezeptoren führen.

In den von mir durchgeführten Versuchen konnte ich somit zeigen, dass eine intraperitoneale Injektion mit Zymosan A über eine systemische Inflammation zu einer vermehrten Expression von A1-Adenosinrezeptoren im Kortex von Mäusen führt. Da bekannt ist, dass Adenosin über A1-Rezeptoren physiologischerweise die Aktivität im Kortex dämpft, kann dies ein wichtiger Faktor zur Erklärung der bei septischen Patienten regelhaft auftretenden Vigilanzminderung sein.

Weiterhin kann hierdurch die hypnotische Wirkung von Allgemeinanästhetika verstärkt werden, die auch zu einer Verminderung der kortikalen Aktivität führen. Folgeuntersuchungen sollen nun klären, in wieweit sich die Sensitivität von septischen Mäusen gegenüber Allgemeinanästhetika verändert.



# Literaturverzeichnis

- Alkire MT, Haier RJ, Shah NK, Anderson CT (1997) Positron emission tomography study of regional cerebral metabolism in humans during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 86:549–57.
- Alkire MT, Pomfrett CJ, Haier RJ, Gianzero MV, Chan CM, Jacobsen BP, Fallon JH (1999) Functional brain imaging during anesthesia in humans: effects of halothane on global and regional cerebral glucose metabolism. *Anesthesiology* 90:701–9.
- Allaouchiche B, Duflo F, Tournadre JP, Debon R, Chassard D (2001) Influence of sepsis on sevoflurane minimum alveolar concentration in a porcine model. *Br J Anaesth* 86:832–6.
- Angelatou F, Pagonopoulou O, Maraziotis T, Olivier A, Villemeure JG, Avoli M, Kostopoulos G (1993) Upregulation of  $\alpha 1$  adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci Lett* 163:11–4.
- Antkowiak B (1999) Different actions of general anesthetics on the firing patterns of neocortical neurons mediated by the gaba(a) receptor. *Anesthesiology* 91:500–11.
- Antkowiak B, Helfrich-Forster C (1998) Effects of small concentrations of volatile anesthetics on action potential firing of neocortical neurons in vitro. *Anesthesiology* 88:1592–605.
- Avramescu S, Wang DS, Lecker I, To WT, Penna A, Whissell PD, Mesbah-Oskui L, Horner RL, Orser BA (2016) Inflammation increases neuronal sensitivity to general anesthetics. *Anesthesiology* 124:417–27.
- Bannon NM, Zhang P, Ilin V, Chistiakova M, Volgushev M (2014) Modulation of synaptic transmission by adenosine in layer 2/3 of the rat visual cortex in vitro. *Neuroscience* 260:171–84.
- Bastos-Pereira AL, Fraga D, Ott D, Simm B, Murgott J, Roth J, Zampronio AR (2014) Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. *J Appl Physiol* (1985) 116:1220–9.
- Biber K, Klotz KN, Berger M, Gebicke-Harter PJ, van Calker D (1997) Adenosine  $\alpha 1$  receptor-mediated activation of phospholipase c in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci* 17:4956–64.

- Biber K, Lubrich B, Fiebich BL, Boddeke HW, van Calker D (2001) Interleukin-6 enhances expression of adenosine a(1) receptor mrna and signaling in cultured rat cortical astrocytes and brain slices. *Neuropsychopharmacology* 24:86–96.
- Bjerring PN, Dale N, Larsen FS (2015) Acute hyperammonemia and systemic inflammation is associated with increased extracellular brain adenosine in rats: a biosensor study. *Neurochem Res* 40:258–64.
- Bollen PJ, Nielsen BJ, Toft P (2007) Influence of endotoxin-induced sepsis on the requirements of propofol-fentanyl infusion rate in pigs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:192–6.
- Box GEP, Cox DR (1964) An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 26:211–252.
- Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW (2012) Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev* 92:1087–187.
- Brundege JM, Dunwiddie TV (1996) Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 16:5603–12.
- Chan MT, Cheng BC, Lee TM, Gin T, Group CT (2013) Bis-guided anesthesia decreases postoperative delirium and cognitive decline. *J Neurosurg Anesthesiol* 25:33–42.
- Chauvette S, Volgushev M, Timofeev I (2010) Origin of active states in local neocortical networks during slow sleep oscillation. *Cereb Cortex* 20:2660–74.
- Chen GJ, Harvey BK, Shen H, Chou J, Victor A, Wang Y (2006) Activation of adenosine a3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents. *J Neurosci Res* 84:1848–55.
- Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortes A, Canela EI, Lopez-Gimenez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferre S, Franco R (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine a1-a2a receptor heteromers. *J Neurosci* 26:2080–7.
- Cohen J (1988) *Statistical power analysis for the behavioral sciences (2nd Ed.)* Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ.
- Compte A, Sanchez-Vives MV, McCormick DA, Wang XJ (2003) Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) and wave propagations in a cortical network model. *J Neurophysiol* 89:2707–25.
- Dale N, Pearson T, Frenguelli BG (2000) Direct measurement of adenosine release during hypoxia in the ca1 region of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 526 Pt 1:143–55.
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1995) Inhibition of nmda receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine a1 receptor activation. *Neuroreport* 6:1097–100.

- Douglas CL, Baghdoyan HA, Lydic R (2002) Prefrontal cortex acetylcholine release, EEG slow waves, and spindles are modulated by m2 autoreceptors in c57bl/6j mouse. *J Neurophysiol* 87:2817–22.
- Drexler B, Roether CL, Jurd R, Rudolph U, Antkowiak B (2005) Opposing actions of etomidate on cortical theta oscillations are mediated by different gamma-aminobutyric acid type A receptor subtypes. *Anesthesiology* 102:346–52.
- Dunwiddie TV (1980) Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia* 21:541–8.
- Dunwiddie TV, Diao L (1994) Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther* 268:537–45.
- Dunwiddie TV, Fredholm BB (1989) Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 249:31–7.
- Dunwiddie TV, Haas HL (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol* 369:365–77.
- Dunwiddie TV, Hoffer BJ (1980) Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 69:59–68.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31–55.
- During MJ, Spencer DD (1992) Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol* 32:618–24.
- Eger EI n (2001) Age, minimum alveolar anesthetic concentration, and minimum alveolar anesthetic concentration-awake. *Anesth Analg* 93:947–53.
- Elmenhorst D, Meyer PT, Winz OH, Matusch A, Ermert J, Coenen HH, Basheer R, Haas HL, Zilles K, Bauer A (2007) Sleep deprivation increases A1 adenosine receptor binding in the human brain: a positron emission tomography study. *J Neurosci* 27:2410–5.
- Fastbom J, Fredholm BB (1990) Regional differences in the effect of guanine nucleotides on agonist and antagonist binding to adenosine A1-receptors in rat brain, as revealed by autoradiography. *Neuroscience* 34:759–69.
- Ferre S, Ciruela F, Quiroz C, Lujan R, Popoli P, Cunha RA, Agnati LF, Fuxe K, Woods AS, Lluís C, Franco R (2007) Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorldJournal* 7:74–85.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International union of pharmacology. xxv. nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–52.

- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:364–74.
- Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83–133.
- Fredholm BB, Fried G, Hedqvist P (1982) Origin of adenosine released from rat vas deferens by nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 79:233–43.
- Fredholm BB, Hedqvist P (1980) Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem Pharmacol* 29:1635–43.
- Gahwiler BH (1981) Nerve cells in organotypic cultures. *JAMA* 245:1858–9.
- Gill R, Martin C, McKinnon T, Lam C, Cunningham D, Sibbald WJ (1995) Sepsis reduces isoflurane MAC in a normotensive animal model of sepsis. *Can J Anaesth* 42:631–5.
- Grasshoff C, Drexler B, Hentschke H, Thiermann H, Antkowiak B (2007) Cholinergic modulation of sevoflurane potency in cortical and spinal networks in vitro. *Anesthesiology* 106:1147–55.
- Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B (2005) Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept. *Curr Opin Anaesthesiol* 18:386–91.
- Hammarberg C, Schulte G, Fredholm BB (2003) Evidence for functional adenosine A<sub>3</sub> receptors in microglia cells. *J Neurochem* 86:1051–4.
- Hasko G, Pacher P, Vizi ES, Illes P (2005) Adenosine receptor signaling in the brain immune system. *Trends Pharmacol Sci* 26:511–6.
- Heinke W, Fiebach CJ, Schwarzbauer C, Meyer M, Olthoff D, Alter K (2004) Sequential effects of propofol on functional brain activation induced by auditory language processing: an event-related functional magnetic resonance imaging study. *Br J Anaesth* 92:641–50.
- Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B (2005a) Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* 21:93–102.
- Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B (2005b) Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* 21:93–102.
- Hentschke H, Stüttgen MC (2011) *MBESToolbox: Matlab Toolbox 'Measures of Effect Size'*.
- Ishizaki K, Yoon DM, Yoshida N, Yamazaki M, Arai K, Fujita T (1995) Intrathecal administration of n-methyl-D-aspartate receptor antagonist reduces the minimum alveolar anaesthetic concentration of isoflurane in rats. *Br J Anaesth* 75:636–8.

- Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B, Rudolph U (2003) General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the gaba(a) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 17:250–2.
- Kaputlu I, Sadan G, Ozdem S (1998) Exogenous adenosine potentiates hypnosis induced by intravenous anaesthetics. *Anaesthesia* 53:496–500.
- Katoh T, Ikeda K (1998) The effects of fentanyl on sevoflurane requirements for loss of consciousness and skin incision. *Anesthesiology* 88:18–24.
- Kelley K (2018) *MBESS: The MBESS R Package* R package version 4.4.3.
- Kerr MI, Wall MJ, Richardson MJ (2013) Adenosine a1 receptor activation mediates the developmental shift at layer 5 pyramidal cell synapses and is a determinant of mature synaptic strength. *J Physiol* 591:3371–80.
- Kertai MD, Pal N, Palanca BJ, Lin N, Searleman SA, Zhang L, Burnside BA, Finkel KJ, Avidan MS, Group BUS (2010) Association of perioperative risk factors and cumulative duration of low bispectral index with intermediate-term mortality after cardiac surgery in the b-unaware trial. *Anesthesiology* 112:1116–27.
- Kertai MD, Palanca BJ, Pal N, Burnside BA, Zhang L, Sadiq F, Finkel KJ, Avidan MS, Group BUS (2011) Bispectral index monitoring, duration of bispectral index below 45, patient risk factors, and intermediate-term mortality after noncardiac surgery in the b-unaware trial. *Anesthesiology* 114:545–56.
- Kikuchi T, Wang Y, Sato K, Okumura F (1998) In vivo effects of propofol on acetylcholine release from the frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats. *Br J Anaesth* 80:644–8.
- Kocsis JD, Eng DL, Bhisitkul RB (1984) Adenosine selectively blocks parallel-fiber-mediated synaptic potentials in rat cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6531–4.
- Kreuer S, Schreiber JU, Bruhn J, Wilhelm W (2005) Impact of patient age on propofol consumption during propofol-remifentanyl anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol* 22:123–8.
- Laalou FZ, de Vasconcelos AP, Oberling P, Jeltsch H, Cassel JC, Pain L (2008) Involvement of the basal cholinergic forebrain in the mediation of general (propofol) anaesthesia. *Anesthesiology* 108:888–96.
- Laalou FZ, Egard M, Guillot M, Noll E, Taglang G, Pain L (2010) Influence of preoperative cognitive status on propofol requirement to maintain hypnosis in the elderly. *Br J Anaesth* 105:342–6.
- Lambert NA, Teyler TJ (1991) Adenosine depresses excitatory but not fast inhibitory synaptic transmission in area ca1 of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 122:50–2.
- Lawrence MA (2016) *ez: Easy Analysis and Visualization of Factorial Experiments* R package version 4.4-0.

- Lenmarken C, Bildfors K, Enlund G, Samuelsson P, Sandin R (2002) Victims of awareness. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:229–31.
- Leslie K, Sessler DI, Schroeder M, Walters K (1995) Propofol blood concentration and the bispectral index predict suppression of learning during propofol/epidural anesthesia in volunteers. *Anesth Analg* 81:1269–74.
- Lin AS, Uhde TW, Slate SO, McCann UD (1997) Effects of intravenous caffeine administered to healthy males during sleep. *Depress Anxiety* 5:21–8.
- Liu XQ, Sheng R, Qin ZH (2009) The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin* 30:1071–80.
- Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA (2002) Adenosine a(2a) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic a(1) receptor inhibition. *Neuroscience* 112:319–29.
- Louie GL, Prokocimer PG, Nicholls EA, Maze M (1986) Aminophylline shortens thiopental sleep-time and enhances noradrenergic neurotransmission in rats. *Brain Res* 383:377–81.
- Luk WP, Zhang Y, White TD, Lue FA, Wu C, Jiang CG, Zhang L, Moldofsky H (1999) Adenosine: a mediator of interleukin-1beta-induced hippocampal synaptic inhibition. *J Neurosci* 19:4238–44.
- Luo T, Leung LS (2011) Involvement of tuberomammillary histaminergic neurons in isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 115:36–43.
- Monk TG, Saini V, Weldon BC, Sigl JC (2005) Anesthetic management and one-year mortality after noncardiac surgery. *Anesth Analg* 100:4–10.
- Pagonopoulou O, Angelatou F, Kostopoulos G (1993) Effect of pentylentetrazol-induced seizures on a1 adenosine receptor regional density in the mouse brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 56:711–6.
- Perigolo-Vicente R, Ritt K, Goncalves-de Albuquerque CF, Castro-Faria-Neto HC, Paes-de Carvalho R, Giestal-de Araujo E (2014) Il-6, a1 and a2ar: a crosstalk that modulates bdnf and induces neuroprotection. *Biochem Biophys Res Commun* 449:477–82.
- Pfister R, Janczyk M (2017) *schoRsch: Tools for Analyzing Factorial Experiments* R package version 1.4.
- Phillis JW, Walter GA, O'Regan MH, Stair RE (1987) Increases in cerebral cortical perfusate adenosine and inosine concentrations during hypoxia and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:679–86.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276:1265–8.

- Portas CM, Thakkar M, Rainnie DG, Greene RW, McCarley RW (1997) Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 79:225–35.
- Prince DA, Stevens CF (1992) Adenosine decreases neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8586–90.
- R Core Team (2017) *R: A Language and Environment for Statistical Computing* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainnie DG, Grunze HC, McCarley RW, Greene RW (1994) Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for eeg arousal. *Science* 263:689–92.
- Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O’Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, Hadingham KL, Hutson PH, Belelli D, Lambert JJ, Dawson GR, McKernan R, Whiting PJ, Wafford KA (2003) Sedation and anesthesia mediated by distinct gaba(a) receptor isoforms. *J Neurosci* 23:8608–17.
- Rosenberg PA, Li Y (1995) Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic amp accumulation, cyclic amp transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. *Brain Res* 692:227–32.
- Rosi S, McGann K, Hauss-Wegrzyniak B, Wenk GL (2003) The influence of brain inflammation upon neuronal adenosine a2b receptors. *J Neurochem* 86:220–7.
- Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y, Kuroki Y (2003) Direct binding of toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced nf-kappa b activation and tnf-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein a. *J Immunol* 171:417–25.
- Scanziani M, Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM (1992) Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9:919–27.
- Schliebs R, Arendt T (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in alzheimer’s disease. *J Neural Transm (Vienna)* 113:1625–44.
- Schrader J, Wahl M, Kuschinsky W, Kreutzberg GW (1980) Increase of adenosine content in cerebral cortex of the cat during bicuculline-induced seizure. *Pflugers Arch* 387:245–51.
- Schwaninger M, Neher M, Viegas E, Schneider A, Spranger M (1997) Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J Neurochem* 69:1145–50.
- Sebel PS, Bowdle TA, Ghoneim MM, Rampil IJ, Padilla RE, Gan TJ, Domino KB (2004) The incidence of awareness during anesthesia: a multicenter united states study. *Anesth Analg* 99:833–9, table of contents.

- Segerdahl M, Ekblom A, Sandelin K, Wickman M, Sollevi A (1995) Peroperative adenosine infusion reduces the requirements for isoflurane and postoperative analgesics. *Anesth Analg* 80:1145–9.
- Seitz PA, ter Riet M, Rush W, Merrell WJ (1990) Adenosine decreases the minimum alveolar concentration of halothane in dogs. *Anesthesiology* 73:990–4.
- Serchov T, Atas HC, Normann C, van Calker D, Biber K (2012) Genetically controlled upregulation of adenosine a(1) receptor expression enhances the survival of primary cortical neurons. *Mol Neurobiol* 46:535–44.
- Short TG, Leslie K, Chan MT, Campbell D, Frampton C, Myles P (2015) Rationale and design of the balanced anesthesia study: A prospective randomized clinical trial of two levels of anesthetic depth on patient outcome after major surgery. *Anesth Analg* 121:357–65.
- Sodickson DL, Bean BP (1998) Neurotransmitter activation of inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal ca3 neurons: interactions among multiple receptors. *J Neurosci* 18:8153–62.
- Solt K, Forman SA (2007) Correlating the clinical actions and molecular mechanisms of general anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol* 20:300–6.
- Sonner JM, Zhang Y, Stabernack C, Abaigar W, Xing Y, Laster MJ (2003) Gaba(a) receptor blockade antagonizes the immobilizing action of propofol but not ketamine or isoflurane in a dose-related manner. *Anesth Analg* 96:706–12, table of contents.
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10:2541–59.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679–85.
- Tai SK, Ma J, Leung LS (2014) Medial septal cholinergic neurons modulate isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 120:392–402.
- Takigawa T, Alzheimer C (1999) G protein-activated inwardly rectifying k+ (girk) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. *J Physiol* 517 ( Pt 2):385–90.
- Tanase D, Baghdoyan HA, Lydic R (2003) Dialysis delivery of an adenosine a1 receptor agonist to the pontine reticular formation decreases acetylcholine release and increases anesthesia recovery time. *Anesthesiology* 98:912–20.
- Torchiano M (2017) *effsize: Efficient Effect Size Computation* R package version 0.7.1.
- Torp R, Hoover F, Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1997) Differential distribution of the glutamate transporters glt1 and reacl1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. *Anat Embryol (Berl)* 195:317–26.



- Trincavelli ML, Melani A, Guidi S, Cuboni S, Cipriani S, Pedata F, Martini C (2008) Regulation of a(2a) adenosine receptor expression and functioning following permanent focal ischemia in rat brain. *J Neurochem* 104:479–90.
- van Aerde KI, Qi G, Feldmeyer D (2015) Cell type-specific effects of adenosine on cortical neurons. *Cereb Cortex* 25:772–87.
- van der Putten C, Zuiderwijk-Sick EA, van Straalen L, de Geus ED, Boven LA, Kondova I, AP IJ, Bajramovic JJ (2009) Differential expression of adenosine a3 receptors controls adenosine a2a receptor-mediated inhibition of tlr responses in microglia. *J Immunol* 182:7603–12.
- Van Dort CJ, Baghdoyan HA, Lydic R (2009) Adenosine a(1) and a(2a) receptors in mouse prefrontal cortex modulate acetylcholine release and behavioral arousal. *J Neurosci* 29:871–81.
- Volman TJ, Hendriks T, Goris RJ (2005) Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock* 23:291–7.
- Wall MJ, Richardson MJ (2015) Localized adenosine signaling provides fine-tuned negative feedback over a wide dynamic range of neocortical network activities. *J Neurophysiol* 113:871–82.
- Wang YS, White TD (1999) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide causes rapid inappropriate excitation in rat cortex. *J Neurochem* 72:652–60.
- Wang Z, McCormick DA (1993) Control of firing mode of corticotectal and corticopontine layer v burst-generating neurons by norepinephrine, acetylcholine, and 1s,3r-acpd. *J Neurosci* 13:2199–216.
- Westberg JA, Serlachius M, Lankila P, Penkowa M, Hidalgo J, Andersson LC (2007) Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via il-6 signaling. *Stroke* 38:1025–30.
- Wittendorp MC, Boddeke HW, Biber K (2004) Adenosine a3 receptor-induced ccl2 synthesis in cultured mouse astrocytes. *Glia* 46:410–8.
- Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204–12.
- Yang JN, Chen JF, Fredholm BB (2009) Physiological roles of a1 and a2a adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H1141–9.
- Yoon KW, Rothman SM (1991) Adenosine inhibits excitatory but not inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 11:1375–80.
- Zhang P, Bannon NM, Ilin V, Volgushev M, Chistiakova M (2015) Adenosine effects on inhibitory synaptic transmission and excitation-inhibition balance in the rat neocortex. *J Physiol* 593:825–41.

Zhang Y, Laster MJ, Hara K, Harris RA, Eger EI n, Stabernack CR, Sonner JM (2003) Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 96:97–101, table of contents.

Zhou AM, Li WB, Li QJ, Liu HQ, Feng RF, Zhao HG (2004) A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal ca1 region of rats. *Neurosci Res* 48:397–404.

# Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Universitätsklinikum Tübingen für Anästhesiologie und Intensivmedizin unter Betreuung von Herrn Professor Christian Grasshoff durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Grasshoff und Herrn Doktor Harald Hentschke.

Bei den Versuchsschritten mit lebenden Tieren assistierte ich Herrn Doktor Hentschke. Alle weiteren Versuche und Messungen wurden nach Einarbeitung durch Herrn Doktor Hentschke von mir mit Unterstützung durch Frau Claudia Holt, Frau Ina Papp und Frau Ariane Streißenberger durchgeführt. Insbesondere die Etablierung und Evaluation des Plasmid-Modells erfolgte eigenständig durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Herrn Doktor Hentschke durch mich.

Die Abbildungen wurden von mir nach Anleitung durch Herrn Doktor Hentschke eigenständig erstellt. Ausgenommen davon sind die Abbildungen 2.1 und 2.2, die mir freundlicherweise von Herrn Doktor Hentschke zur Verfügung gestellt wurden, sowie die Abbildungen 3.6 und 3.11, welche von mir und Herrn Doktor Hentschke gemeinsam erstellt wurden.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Herrn Doktor Hentschke und Herrn Professor Grasshoff verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Karlsruhe, den

# Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Christian Grashoff für die Möglichkeit der Promotion und für die tatkräftige und stets verlässliche sowie zeitnahe Unterstützung bei der Durchführung herzlichst bedanken.

Zudem möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Doktor Harald Hentschke herzlichst bedanken, der mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand und mich dadurch sowohl fachlich als auch moralisch entscheidend unterstützte.

Weiter danke ich den Mitarbeitern des Labors, insbesondere allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Anästhesiologie für die herzliche Einarbeitung und die bedeutende Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich auch bei meiner Familie und meiner Partnerin für die großartige Unterstützung während meines gesamten Studiums und insbesondere während meiner Promotion bedanken.