"EXPRESSION UND FUNKTIONELLE RELEVANZ VON ZWEI-POREN K⁺-KANÄLEN DER TASK-FAMILIE IN THALAMISCHEN SCHALTNEURONEN"

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von	Dr. med. Sven Meuth						
	(akad. Grad, V	Grad, Vorname, Name/Geburtsname)					
geb. am	16.03.1977	in	Limburg				
Gu	tachter:	Prof. Dr. rer.	nat. Hans-Christian Pape				
		(akademischer Grad, Vorname, Name)					
		Prof. Dr. med. Dr. phil. Jürgen Daut					
	(akademischer Grad, Vorname, Name)						
(akademischer Grad, Vorname, Name)							
eingereicht am: Oktober 2006							

verteidigt am: <u>22.02.2007</u>

Bibliographische Beschreibung:

Meuth, Sven:

"EXPRESSION UND FUNKTIONELLE RELEVANZ VON ZWEI-POREN K⁺-KANÄLEN DER TASK-FAMILIE IN THALAMISCHEN SCHALTNEURONEN"

- 2006. -97 Bl.: 20 Abb., 5 Tab., 0 Anl.

- Magdeburg, Universität, Diss.

Die vorliegende Dissertation beruht auf experimentellen Daten, die am Institut für Physiologie der Otto-von-Guericke Universität (Institutsleiter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape) unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape und unter der Mitbetreuung durch Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Budde erstellt wurden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Expression und funktionellen Relevanz der neu-klonierten Familie der Zwei-Poren K⁺-Kanäle (TASK Unterfamilie) in thalamischen Schaltneuronen:

Thalamische Schaltneurone zeigen zwei grundlegend verschiedene Aktivitätsmodi: eine niederfrequente, oszillatorische Aktivität (auch Salvenaktivität genannt) findet sich während des Schlafs, bei tiefer Anästhesie und bei bestimmten Arten epileptischer Anfälle. Davon abzugrenzen sind eine hochfrequente, oszillatorische Aktivität im Gammabereich und eine tonische Aktivität bei Wachheit. Grundlage dieser Aktivitätszustände ist das Membranruhepotenzial, dessen molekulare Natur allerdings bis heute nicht vollumfänglich verstanden ist. Allgemein akzeptiert ist die Vorstellung, dass das Membranruhepotenzial durch Leitfähigkeiten, welche unterhalb der Feuerschwelle der Zellen aktiv sind, determiniert wird. Dabei scheinen eine K⁺-Leckleitfähigkeit und der durch HCN-Kanäle getragen I_h von besonderer Bedeutung zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression, Modulation und Funktion von Ionenkanälen der Zwei-Poren K⁺-Kanäle (TASK Unterfamilie) in thalamischen Schaltneuronen an Einzellzellen und im Hirnschnittpräparat untersucht. Mittels elektrophysiologischer Messungen, PCR-Techniken, *in situ* Hybridisierung, Immunhistochemie und Computersimulationen konnte die Expression der TASK-, sowie HCN-Kanäle nachgewiesen werden. Dabei scheinen TASK-Kanäle für einen deutlichen Anteil der vorbeschriebenen K⁺-Leckleitfähigkeit verantwortlich und durch Transmitter des aufsteigenden Hirnstammsystems beeinflussbar zu sein.

Funktionell vermitteln diese Kanäle weitestgehend zeit- und spannungsunabhängige K^+ -Hintergrundströme mit einer deutlichen Auswärtsgleichrichtung und einem Umkehrpotenzial nahe dem errechneten K^+ -Gleichgewichtspotenzial. Sie sind - gerade in der funktionellen Interaktion mit HCN-Kanälen - massgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Membranruhepotenzials beteiligt. Eine Beeinflussung dieser Interaktion, z.B. durch Pharmaka, durch ein *knock out* Konstrukt für HCN2 oder durch eine äquivalente Parameteranpassung im Computermodell, führt zu einer deutlichen Verschiebung des Membranpotenzials und dadurch bedingt, zu einem Wechsel des Aktivitätsmodus der Zellen.

Die gewonnenen Daten liefern einen Einblick in die Rolle von K_2P in thalamokortikalen Schaltneuronen und tragen damit zu einem besseren Verständnis der Thalamusphysiologie und der Informationsverarbeitung auf zellulärer Ebene bei. Sie können als Grundlage für Arbeiten über pathophysiologische Vorgänge im genannten Kontext dienen.

<u>Stichworte</u>: Thalamus, thalamokortikale Schaltneurone, Hirnschnittpräparate, Zwei-Poren-K⁺-Kanäle, TASK-Kanäle, Leckleitfähigkeiten, HCN-Kanäle, Acetylcholin-Rezeptoren, Halothan, Muskarin, Bupivacain, pH-Wert, Spermin, Elektrophysiologie, *voltage clamp, current clamp*, tonisches Feuerverhalten, Salvenaktivität, Immunzytochemie, *computer modelling, in situ* Hybridisierung, Polymerasekettenreaktion (PCR)

Allen gewidmet, von denen ich lernte

Finis coronat opus! (Ovid)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einl	eitung		5			
	1.1	Der T	halamus als "Schaltzentrale" zwischen Peripherie und Kortex .	5			
	1.2	Konst	itution des Membranruhepotentials - Intrinsische Eigenschaften				
		thalamischer Neurone					
	1.3	Beeint	flussung der thalamischen Leckleitfähigkeit	7			
	1.4	Mitgli	eder der Zwei-Poren Domänen K^+ -Kanal (K_2P) Familie	8			
	1.5	HCN-	Kanäle	9			
	1.6	Funkt	ionelle Relevanz der Modulation von K ₂ P- bzw. HCN-Kanälen .	10			
	1.7	Frages	stellung und experimenteller Ansatz	11			
2	Mat	terial u	nd Methode	13			
	2.1	Elektr	cophysiologische Untersuchungen	13			
		2.1.1	Präparation der Hirnschnittpräparate	13			
		2.1.2	Präparation akut-isolierter Einzelzellen	14			
		2.1.3	Patch-clamp Ableitungen an Einzelzellen	15			
		2.1.4	Patch-clamp Ableitungen im Hirnschnittpräparat	15			
		2.1.5	Darstellung der Ergebnisse	16			
	2.2	In situ	ı Hybridisierung	17			
		2.2.1	Präparation des Gewebes	17			
		2.2.2	Inkubation und Färbung	17			
		2.2.3	Prüfung der Spezifität und Auswertung	18			
	2.3	Polym	nerasekettenreaktion (PCR)	18			
		2.3.1	Präparation des Probenmaterials	18			
		2.3.2	Umschreibung und Amplifikation	18			
		2.3.3	Verwendete Primer	19			
	2.4	Semiq	uantitative RT-PCR	20			
		2.4.1	Präparation des Probenmaterials - Laserdissektionsmikroskopie	20			
		2.4.2	Umschreibung und Amplifikation	21			
		2.4.3	Auswertung	22			
	2.5	Fluore	eszenzimmunzytochemie	23			

1

		2.5.1 Präparation der dissoziierten thalamischen Zellkulturen	23
		2.5.2 Fixierung und Färbung	23
	2.6	Computersimulationen mit NEURON	24
3	Erge	bnisse	27
	3.1	Expression von TASK Kanälen, einwärts-gleichrichtenden K ⁺ -Kanälen	
		und mACh-Rezeptor Subtypen	27
	3.2	Pharmakologische Charakterisierungen der Leckleitfähigkeit	29
	3.3	Beteiligung von TASK-Kanälen am K ⁺ -getragenen Auswärtsstrom	31
	3.4	Halothan-sensitive Ströme in thalamischen Neuronen	34
	3.5	Metabotrope ACh Rezeptor-vermittelte Modulation der K ⁺ - Leckleitfähigkeit	36
	3.6	Spezifische Effekte von extrazellulären divalenten Kationen und Spermin	38
	3.7	Einfluss der K ⁺ -Leckleitfähigkeit auf das Feuerverhalten thalamischer Neurone	40
	3.8	Koexpression von HCN- und TASK-Kanal Isoformen im dCGL	42
	3.9	Charakterisierung pH-sensitiver Rampenströme	44
	3.10	Interaktion von TASK- und HCN-Kanälen	46
	3.11	Simulation der Interaktion von TASK- und HCN-Kanälen $\ \ . \ . \ .$	49
4	Disk	ussion	53
	4.1	Methodenkritische Aspekte: thalamische Einzelzellen und Neurone im	
		Hirnschnittpräparat	53
	4.2	Beitrag von TASK-Kanälen an der Leckleitfähigkeit von TC-Neuronen	54
	4.3	Beteiligung verschiedener TASK-Kanal Subtypen	56
	4.4	Halothan und mACh-Rezeptor vermittelte Effekte	56
	4.5	Mögliche funktionelle Implikationen der TASK-Kanal Modulation	57
	4.6	Effekte von divalenten Kationen und Spermin in thalamischen Schalt-	
		neuronen	58
	4.7	Interaktion I_h und I_{TASK} : pH-sensitive Membranströme in thalami- schen Neuronen	59
	4.8	Interaktion I_{TASK} und I_h : Funktionelle Bedeutung	61
	4.9	Pathophysiologische Implikationen	62
	4.10	Zusammenfassendes Modell: ein Ausblick	64
5	Zusa	ammenfassung	67
	5.1	Deutsche Zusammenfassung	67
	5.2	Englische Zusammenfassung - Summary	68
6	Lite	raturverzeichnis	71
7	Dan	ksagung	83

8	Erklärung	85
9	Darstellung des Bildungsweges/Publikationsliste	87
Α	Anhang A.1 Rezepte A.1.1 Elektrophysiologie A.1.2 Zellkultur A.1.3 Immunzytochemie auf dissoziierten thalamischen Zellen	95 95 95 95 96

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AD	Analog-Digital
4-AP	4-Aminopyridin
ARAS	aufsteigendes retikuläres Aktivierungssystem
ATP	Adenosin-Triphosphat
Ba^{2+}	Bariumionen
BAPTA	$1,2\underline{-Bis}(2\underline{-aminophenoxy}) ethane {-N,N,N',N'-tetraacetic\ acid}$
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Kalziumionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGLd/dCGL	dorsaler Anteil des Corpus geniculatum laterale
\mathbf{C}_m	Membrankapazität
CNB	Bindungsstelle für zyklische Nukleotide
$\rm CO_2$	Kohlendioxid
DC	direct current (Gleichstrom)
$\mathrm{dH}_2\mathrm{O}$	destilliertes Wasser
dLGN	dorsal lateral geniculate nucleus
DMEM	$\underline{D}ulbecco's \ \underline{m}odified \ \underline{e}agle \ \underline{m}edium$
E19	embryonaler Tag 19

EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	<u>e</u> thylene <u>g</u> lycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N',- <u>t</u> etraacetic
	$\underline{a}cid$
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glyseraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GD	Gyrus dentatus
GTP	Guanosin 5'-Triphosphat
HBSS	$\underline{H}ank's \ \underline{b}alanced \ \underline{s}alt \ \underline{s}olution$
HCN	$\underline{h}y perpolarization-activated\ \underline{c}y clic\ \underline{n}u cleotid\ regulated\ ion\ channels$
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
Hz	Hertz
IE	internationale Einheit
\mathbf{I}_h	hyperpolarisations-aktivierter Strom, Schrittmacherstrom
I_{Inject}	Injektionsstrom
I_{KIR}	einwärts-gleichrichtender K ⁺ -Strom ($\underline{i}nwardly \underline{r}ectifying$)
I_{KL}	K ⁺ -Leckleitfähigkeit
IK_{SO}	anhaltender Auswärtsstrom, <u>standing o</u> utward
I_T	T-Typ Kalziumstrom
I/V	Strom-Spannungsbeziehung
K^+	Kaliumion
K_2P	Zwei-Poren Domänen K ⁺ -Kanäle
mAChR	metabotrope Acetylcholin-Rezeptoren
$\mu { m m}$	Mikrometer
$M\Omega$	Mega-Ohm
mM	Millimol
Min	Minute

ms	Millisekunde
NA	Noradrenalin
Na^+	Natriumion
Nkl	Nukleus
NRT	Nukleus reticularis thalami
O_2	Sauerstoff
p5, p10	postnatal (5. Tag, 10. Tag, \dots)
PBS	$\underline{p}hosphate \ \underline{b}uffered \ \underline{s}aline$
PCR	$\underline{p}olymerase \ \underline{c}hain \ \underline{r}eaction$ (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	piperazine-N, N'-bis(ethan sulphonic acid)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	sodium citrate
TASK	<u><i>T</i></u> <i>WIK</i> -related <u>a</u> cid <u>sensitive</u> <u><i>K</i></u> ⁺ -channel
TC	$\underline{t}halamo\underline{c}ortical$, thalamokortikal
TEA-Cl	Tetraethyl-Ammoniumchlorid
TTX	Tetrodotoxin
VB	Nkl. ventrobasalis thalami
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Thalamus als "Schaltzentrale" zwischen Peripherie und Kortex

Das thalamokortikale Netzwerk wird durch zwei fudamental unterschiedliche Aktivitätszustände charakterisiert [113, 117]: niederfrequente (< 15 Hz) oszillatorische Akitvität findet sich während des natürlichen Schlafs, tiefer Anästhesie und bei bestimmten epileptischen Anfällen, während eine hochfrequente, oszillatorische Aktivität im Gammabereich und tonische Aktivität bei Wachheit nachweisbar sind (Abb. 1.1)



Abb. 1.1 Aktivitätsmuster im thalamokortikalen Netzwerk bei Schlaf und Wachheit. Das Netzwerkschema (Mitte) zeigt zwei synaptische Schaltkreise, die rekurrente Netzwerkoszillationen fördern: a) Axone thalamischer Schaltneurone erreichen den zerebralen Kortex; Axone kortikaler Neurone projizieren zurück in den Thalamus; b) Axonkolaterale thalamischer Schaltneurone und

kortikofugaler Neurone innervieren Neurone des Nukleus retikularis thalami, der über GABAerge synaptische Verbindungen rekurrente Hemmung in den Schaltneuronen vermittelt. Darüber hinaus sind lokale Interneurone in die Schaltkreise eingebunden (+, exzitatorische Verbindungen; -, inhibitorische Verbindungen). Die Originalmessungen zeigen Elektroenzephalogramm (EEG) und intrazelluläre Ableitungen der elektrischen Aktivität eines Schaltneurons im Corpus geniculatum laterale pars dorsalis (CGLd, Hauptstation der primären Sehbahn im Thalamus) der Ratte *in vivo* und in einem Schnittpräparat *in vitro*. Hyperpolarisation der Schaltneurone induziert oszillatorische Entladungssalven ("Burst"-Modus), die im thalamokortikalen Netzwerk synchronisiert werden, in den typischen Schlafwellen des EEG zum Ausdruck kommen und die reduzierte, sensorische Antwortbereitschaft während dieser Stadien begründen. Depolarisation induziert tonische Serien von Aktionspotenzialen ("Schalt"-Modus), die eine direkte Übertragung eintreffender, sensorischer Signale zum Kortex während der Wachheit ermöglichen [96].

Auf zellulärem Level ist die langsame, oszillatorische Aktivität mit der rhythmischen Generierung von Aktionspotenzialsalven (*bursts*) assoziiert, während die tonische Aktivität durch Sequenzen einzelner Aktionspotenziale charakterisiert wird. Dabei unterliegt die tonische Aktivität dem wahrheitsgetreuen Transfer von Sinnesinformationen aus der Peripherie zu nachgeschalteten kortikalen Arealen [113]. Aus diesem Grund wird der Thalamus auch als "das Tor zum Bewusstsein" bezeichnet [96]. Der Wechsel zwischen den beiden beschriebenen Aktivitätsmodi ist mit einer Depolarisation der Membran verbunden und wird unter anderem durch die Freisetzung von Neurotransmittern aus den Terminalen des aufsteigenden Hirnstammsystems während des Aufwachens bedingt [66]. Dabei spielen Acetylcholin (ACh), Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) eine wichtige Rolle. Diese Transmitter werden aus Neuronen der cholinergen Hirnstammkerne, dem Locus coeruleus und den Raphekernen freigesetzt.

1.2 Konstitution des Membranruhepotentials -Intrinsische Eigenschaften thalamischer Neurone

Aktuelle Erkenntnisse zur Funktion des Thalamus stammen aus Untersuchungen zu den Grundlagen der Entstehung des Membranruhepotenzials von thalamokortikalen Schaltneuronen. Bisher ist trotz seiner fundamentalen Rolle für die Funktion zentraler Neurone, nur wenig über die am Membranruhepotenzial beteiligten Ionenkanäle bekannt. Generell wird vermutet, dass dem Membranruhepotenzial Leitfähigkeiten zugrunde liegen, die unterhalb der Schwelle für die Generierung von Aktionspotenzialen aktiv sind, wobei K⁺-Leckleitfähigkeiten (I_{KL}, siehe 1.3) und Schrittmacherkanälen (siehe 1.5) eine wichtige Rolle zugesprochen wird. Die Modulation dieser Ionenkanäle ist von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Erregbarkeit und Funktionalität von Neuronen [37].

Wie bisher dargestellt wurde, zeigen thalamische Schaltneuronen große, vom individuellen Verhaltenszustand abhängige Änderungen des Membranruhepotenzials. Daher sind diese Zellen als Modellsystem geeignet, solche modulierbaren Leckleitfähigkeiten zu untersuchen.

Hilfreich für die Untersuchungen war die Klonierung von vier Mitgliedern der HCN-Kanalfamilie (HCN1-4; auch als Schrittmacherkanäle bezeichnet), welche dem Hyperpolarisations-aktivierten Kationenstrom (I_h) unterliegen (siehe 1.5), sowie die molekulare Identifikation der großen Familie von Zwei-Poren-Domänen-K⁺-Kanälen (K_2P -Kanäle), die weitgehend zeit- und spannungsunabhängige K⁺-Hintergrundströme vermitteln. Über Sequenzhomologien und aufgrund ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber physikochemischen Parametern und Modulatoren, konnten die K_2P -Kanäle in eine Reihe von Untergruppen aufgeteilt werden [49, 57]. Hierzu gehören die pH-sensitiven TASK-Kanäle (<u>T</u>WIK-related <u>a</u>cid-<u>s</u>ensitiv <u>K</u>⁺-channels), die durch Acetylcholin und Lokalanästhetika inhibiert, sowie durch Inhalationsnarkotika aktiviert werden (siehe 1.4).

1.3 Beeinflussung der thalamischen Leckleitfähigkeit

Ein entscheidender Schritt zur Depolarisation thalamischer Schaltneurone ist die Abnahme der K⁺-Leckleitfähigkeit (I_{KL}) zum Beispiel durch die Aktivierung von muskarinergen ACh-Rezeptoren oder α -adrenergen Rezeptoren [71, 72]. Zusätzlich konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Inhalationsnarkotika das Membranruhepotenzial hyperpolarisieren können und damit die neuronale Erregbarkeit thalamokortikaler Zellen hemmen. Dies geschieht durch die Erhöhung einer K⁺-Leitfähigkeit, die zum Kurzschluss anderer Leitfähigkeiten führt [108, 107]. Bis heute ist die genaue molekulare Natur der Ionenkanäle, die der K⁺-Leckleitfähigkeit in thalamischen Nervenzellen unterliegen, unbekannt. Dennoch kann man sagen, dass die K⁺-Leckleitfähigkeit eine zentrale Rolle in der Stabilisierung des Membranruhepotenzials in den meisten Neuronen des zentralen Nervensystems einnimmt. Erst kürzlich konnte mit der Entdeckung einer neuen Familie von K⁺-Kanälen, den sogenannten Zwei-Poren Domänen K⁺-Kanälen (K₂P), das molekulare Korrelat der K⁺-Leckleitfähigkeit in einer Reihe verschiedener Zelltypen identifiziert werden [33].

Neben den K₂P tragen eine Reihe weiterer Leitfähigkeiten zum stehenden Auswärtsstrom (IK_{SO}, standing outward current) bei. So spielen persisitierende Na⁺-Kanäle, einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle, nicht-inaktivierende K⁺-Kanäle und verschiedene Schrittmacherkanäle eine wichtige Rolle [79].

1.4 Mitglieder der Zwei-Poren Domänen K⁺-Kanal (K₂P) Familie

Der Name der Kanalfamilie bezieht sich auf die einzigartige Membrantopologie der Kanaluntereinheiten: zwei Poren-formende P-Domänen werden von vier Transmembranregionen flankiert, die wiederum als Tandem arrangiert sind (Abb. 1.2).



Abb. 1.2 Familie der Zwei-Poren Domänen K^+ -Kanäle (K_2P) . (A) Membrantopologie der Kanäle mit zwei Poren-formenden P-Domänen (P1, P2) und vier im Tandem organisierten Transmembranregionen (M1-M4). (B) Phylogenetischer Stammbaum der 15 human identifizierten K_2P . Dabei bilden die Kanäle TASK1, TASK3 und TASK5 aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber extrazellulärer pH-Wert Verringerung und ihrer Sequenzhomologien eine eigene Unterfamilie.

Funktionell vermitteln die meisten K_2P weitgehend zeit- und spannungsunabhängige K⁺-Hintergrundströme mit unterschiedlichsten Eigenschaften. Ihnen wird ein wichtiger Beitrag an der K⁺-Leckleitfähigkeit zugesprochen [7, 58, 100] und sie tragen somit entscheidend zur Aufrechterhaltung des Membranruhepotenzials bei. Die 15 human identifizierten K_2P Kanalproteine werden aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften und ihrer Sequenzhomologien in sechs Unterfamilien eingeteilt [102]. Die K_2P Untereinheiten formieren sich sowohl als Dimere [104] als auch als Heterodimere. Während einige Kanaluntereinheiten zeit- und spannungsunabhängige K⁺-Leckströme vermitteln, erhöht sich bei anderen Subtypen (z.B. TASK-Kanäle) die Offenwahrscheinlichkeit mit zunehmender Depolarisation. Die meisten K_2P können aktiv reguliert werden. Verschiedene Neurotransmitter bzw. Neuromodulatoren sind in der Lage, über G-Protein gekoppelte Rezeptoren K_2P zu verschließen und somit zur Depolarisation der Zelle beizutragen. In thalamischen Zellen ist diese Depolarisation mit einem Wechsel von oszillatorischer Aktivität hin zu tonischen Aktivität verbunden [77, 81, 123]. Darüber hinaus wird die Kanalaktivität durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel Temperatur, pH, Phospholipide, Anästhetika etc. reguliert.

Basierend auf ihrer Sensitivität gegenüber extrazellulären pH-Wert Änderungen konnten fünf Kanalspezies als Säure-sensitive (TASK1-5, acid-sensitive) Kanäle klassifiziert werden [7, 50]. In drei neuronalen Zelltypen des zentralen Nervensystems konnte der Transmitter-sensitive Ruhestrom bereits mit TASK1- [81, 123] und zusätzlich mit TASK3-Kanälen [35, 129] in Verbindung gebracht werden. In der Ganzzell-Konfiguration der *patch-clamp* Technik zeigen Ströme durch TASK1- oder TASK3-Untereinheiten bei physiologischen K⁺-Konzentrationen eine Auswärtsgleichrichtung und sie werden durch verringerte extrazelluläre pH-Werte inhibiert. In rekombinanten Expressionssystemen und unter in vivo Bedingungen können TASK1 und TASK3 Heterodimere bilden, sofern die entsprechenden Zellen beide Gene in ausreichendem Maße exprimieren [1, 2, 16, 47]. Andererseits können sie auch als Homomere funktionell aktiv sein, falls TASK1 oder TASK3 die Expression dominieren [14, 17]. Aufgrund der (1) überlappenden Genexpressionsmuster, (2) der Ahnlichkeiten in den Ganzzellströmen durch einzelne Kanaluntereinheiten und (3) durch die Bildung von heterodimeren Kanälen mit z.T. intermediären Eigenschaften wird die Untersuchung des molekularen Ursprungs nativer Leckströme erschwert. Knock out Mäuse sind in diesem Zusammenhang ein willkommenes Mittel, um *in vitro* und *in vivo* die funktionelle Rolle bestimmter K₂P untersuchen zu können.

Zum Beispiel konnte die Diversität von K_2P in adulten, zerebellären Körnerzellen in einer kürzlich erschienen Arbeit mittels einer TASK1 knock out Maus (TASK1^{-/-}) weiter aufgeschlüsselt werden [1]. Körnerzellen exprimieren vier K_2P Gene: TASK1, TASK3, die TREK2c Splicevariante und THIK2. In der TASK1^{-/-} blieb der IK_{SO} unverändert. Das Membranruhepotenzial war im Vergleich zu den Kontrolltieren zwar unverändert, aber der Strom wurde Zn²⁺-sensitiv. Diese Befunde legen nahe, dass die meisten TASK Kanäle in Körnerzellen als TASK1/TASK3 Heterodimere vorliegen und es in TASK1-defizienten Tieren zur Bildung von TASK3 Homomeren kommt. Die fehlende Abnahme der IK_{SO} Amplitude könnte durch einen gegenregulierenden Effekt der verbleibenden K₂P erklärt werden.

1.5 HCN-Kanäle

Der Hyperpolarisations-aktivierte Kationenstrom wurde vor über 20 Jahren zunächst in Herz- und dann in Nervenzellen entdeckt und aufgrund seiner interessanten biophysikalischen Eigenschaften als I_f ("<u>f</u>unny"), I_q ("<u>q</u>ueer") oder I_h ("<u>hyperpolariza-</u> tion-activated") bezeichnet [109].

Dabei werden die dem Strom unterliegenden Kanäle durch die HCN- ("<u>hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated</u>") Kanalfamilie (HCN1-4) kodiert. Jede HCN-Untereinheit setzt sich aus sechs Transmembransegmenten zusammen, wobei Segment 4 (S4-Untereinheit) in Analogie zu Depolarisations-aktivierten Kanälen den Spannungssensor darstellt und positiv geladen ist. Zusätzlich zeigen HCN Kanäle eine Poren-formende Region, die eine Glycin-Tyrosin-Glycin (GYG)-Sequenz enthält, wie sie auch in K⁺-selektiven Kanälen gefunden wird. Außerhalb dieses Motivs variiert die Aminosäuresequenz zwischen HCN- und K⁺-Kanälen, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass HCN-Kanäle auch Na⁺-Ionen passieren lassen. Ein weiteres Charakteristikum der HCN-Isoformen ist die 120 Aminosäuren lange Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD; "<u>cyclic nucleotide-binding domain</u>") am Carboxyterminalen Ende. Diese besteht aus einem C-Linker, der anschließenden β -Region, sowie einer C-Helix und vermittelt die Reaktion der Kanäle gegenüber cAMP [128]. Ein Histidinrest in Position 321 nahe dem zytoplasmatischen S4-S5-Linker stellt den pH-Sensor der HCN-Kanäle dar.

Alle vier HCN Isoformen konnten im Gehirn von Säugetieren nachgewiesen werden, wobei eine regional unterschiedliche Expression gefunden wird [82, 83]. Während HCN2 in weiten Bereichen des Gehirns stark exprimiert ist, zeigt HCN3 eine allgemein schwache Expression. Darüber hinaus gilt HCN1 als die corticale und HCN4 als die thalamische Isoform.

In elektrophysiologischen Experimenten stellt I_h einen gemischten Kationenstrom dar, der ausgehend von depolarisierten Werten durch Spannungssprünge zu Membranpotenzialen negativer als -50 bis -60 mV aktiviert wird. Die Kinetiken der Aktivierung durch Hyperpolarisation bzw. die Deaktivierung nach Repolarisation sind komplex (zur Übersicht: [92]. In thalamischen Schaltneuronen verläuft die Aktivierung sehr langsam, so dass es einige Sekunden dauert, bis ein konstantes Niveau ("*steady state"*) erreicht wird. Aus verschiedensten experimentellen Ansätzen konnten letztlich vier physiologische Funktionen des beschriebenen Stroms abgeleitet werden: 1.) die Kontrolle der Schrittmacheraktivität in Herz- und Nervenzellen, 2.) die Stabilisierung des Membranruhepotenzials, 3.) die Beteiligung an der Kontrolle des Membranwiderstands und der dendritischen Integration, sowie 4.) die Regulation der synaptischen Transmission [109].

1.6 Funktionelle Relevanz der Modulation von K₂Pbzw. HCN-Kanälen

Thalamokortikale Schaltneurone bieten ein gutes Zellmodell zur Untersuchung der am Membranruhepotenzial beteiligten Leitfähigkeiten, da dieser Zelltyp große Verschiebungen im Membranpotenzial zeigen kann, die mit einem Wechsel des vorherschenden Aktivitätsmodus (rhythmische Salvenaktivität bei Hyperpolarisation versus tonische Aktionspotentialgenerierung bei depolarisierteren Membranwerten) einhergehen [117]. Wichtig innerhalb dieses Systems ist dabei die Beobachtung, dass das depolarisations-induzierte Sistieren der Salvenaktivität über eine Inhibition der K⁺-Leckleitfähigkeit erreicht werden kann (siehe auch 1.3). Das molekulare Korrelat konnte allerdings bis heute nicht identifiziert werden (siehe 1.4). Darüber hinaus konnte weiterhin belegt werden, dass der beschriebene Aktivitätsmodus thalamischer Zellen weiterhin von der Zunahme des I_h abhängt und über Transmitter des aufsteigenden Hirnstamms beeinflussbar ist [66]. Somit stellt sich also die Frage welchen Anteil beide Leitfähigkeiten innerhalb des beschriebenen Systems haben und/oder in wieweit sich beide Ströme gegenseitig beeinflussen. Weiterhin bleibt unklar welchen Einfluss Transmitter des aufsteigenden Hirnstamms auf beide Leitfähigkeiten ausüben und zu welchen funktionellen Konsequenzen diese Beeinflussung im Hinblick auf den Aktivitätszustand thalamischer Zellen führt.

1.7 Fragestellung und experimenteller Ansatz

In der vorgelegten Arbeit wurden Hirnschnittpräparationen und Einzelzellen des dCGL aus Ratten und Mäusen verwendet. Dabei bietet das dCGL als Modellsystem für thalamische Schaltkern des Thalamus die folgenden Vorteile: 1.) die Zellen des dCGL (Schalt- und Interneurone) sind bezüglich ihrer intrinisischen Eigenschaften bereits gut vorcharakterisiert, so dass neue Ergebnisse gut eingeordnet werden können. 2.) das dCGL ist der thalamische Schaltkern des gut untersuchten visuellen Systems; dadurch können neue Ergebnisse im funktionellen Zusammenhang interpretiert werden, 3.) thalamische Schaltneurone des dCGL exprimieren unter den K_2P -Kanälen besonders TASK1 und TASK3 und eigenen sich daher gut für die zu untersuchende Fragestellung.

In der vorliegenden Arbeit wurden elektrophysiologische, molekularbiologische, biochemische und Computermodellierungstechniken angewandt, um den Beitrag der TASK-Kanalfamilie zur K⁺-Leckleitfähigkeit in thalamischen Schaltneuronen zu untersuchen. Dabei stellt sich zunächst die Frage, ob TASK-Kanäle das molekulare Korrelat des lange zuvor beschriebenen I_{KL} thalamischer Schaltneurone darstellt. Neben den biophysikalischen Eigenschaften der Leitfähigkeit (z.B. Umkehrpotential, Auswärtsgleichrichtung usw.) sollte ein pharmakologisches Profil der Kanäle erarbeitet werden (z.B. Aktivierung mit dem systemischen Inhalationsnarkotikum Halothan, Blockade durch Bupivacain, pH-Wert Verringerung, Einfluss von divalenten Kationen, Inhibition durch Spermin usw.). So stellt sich z.B. auch die Frage, ob innerhalb der TASK-Kanalfamilie einzelne Untereinheiten pharmakologisch unterschieden werden können. Darüber hinaus sollte die funktionelle Interaktion der TASK-Kanäle mit HCN-Kanälen sowie der möglicherweise daraus resultierende stabilisierende Effekt auf das Membranruhepotenzial der Zellen näher charakterisiert werden. Hierbei stellt sich ebenfalls die Frage in wieweit Transmitter des aufsteigenden Hirnstamms die beiden Leitfähigkeiten beeinflussen und so über die Veränderung des Membranpotentials der Zellen eine Beeinflussung der Aktionspotenzialgenerierung bewirken können.

Dazu sollte zunächst mittels molekularbiologischer Methoden die Expression der TASK-Kanäle im dCGL auf Gewebeniveau untersucht und anschließend in Kombination mit immunzytochemischen Verfahren auf Einzelzellebene beschrieben werden. Im nächsten Schritt sollte unter Verwendung der Spannungsklemme der patch-clamp Technik überprüft werden, ob der Kanalexpression auch eine Stromantwort unterliegt, wobei die für TASK-Kanäle typischen pharmakologischen Eigenschaften ausgenutzt wurden (siehe oben). Dabei stellte sich die Frage, inwieweit die blocker-sensitiven Stromkomponenten – vermeintlich durch TASK-Kanäle getragen – die typischen Eigenschaften, wie etwa eine signifikante Auswärtsgleichrichtung und ein für reine K⁺-Ströme charakteristisches, negatives Umkehrpotenzial zeigen. Die funktionelle Relevanz der Kanäle für die Vermittlung der Effekte durch freigesetzte Transmitter aus Terminalen des aufsteigenden Hirnstammsystems sollte mit Muskarin als ACh-Rezeptor-aktivierende Substanz gezeigt werden. Der Theorie zur Folge, sollte die Modulation der massgeblich an der Aufrechterhaltung des Membranruhepotenzials beteiligten K⁺-Leckleitfähigkeit zu einer Beeinflussung des Aktivitätsmodus der untersuchten Zellen führen. Daher sollte mittels der Stromklemme der *patch-clamp* Technik die mögliche Verschiebung des Membranruhepotenzials durch TASK-Kanalmodulatoren, sowie der damit verbundene Einfluss auf das Feuerverhalten (Salvenaktivität versus tonische Aktionspotenzialgenerierung) charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte neben diesen grundlegenden Charakterisierungen die Interaktion der TASK-Kanäle mit einer weiteren, für die Aufrechterhaltung des Membranruhepotenzials wichtigen, durch HCN-Kanäle vermittelten Leitfähigkeit (I_h) beschrieben werden. Dazu sollte wiederum auf Gewebeebene und für Einzelzellen die Koexpression beider Kanalfamilien aufgezeigt werden. Die Untersuchung der funktionellen Interaktion und der damit verbundene Einfluss auf das Membranpotenzial und das Feuerverhalten der Zellen wurde mittels pharmakologischer Beeinflussung im Hirnschnittpräparat von Long Evans Ratten, mittels einer für HCN2-Kanäle defizienten knock out Maus, sowie mittels eines single compartment Computermodells einer thalamischen Zelle vorgenommen.

2 Material und Methode

Eine detaillierte Auflistung einzelner, verwendeter Lösungen ist zusätzlich im Anhang aufgeführt.

2.1 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.1.1 Präparation der Hirnschnittpräparate

Die in der vorgelegten Arbeit für elektrophysiologische Ableitungen verwendeten Versuchstiere (Long Evans Ratten, C75Bl6 Mäuse) wurden zwischen dem 12. und 20. postnatalen Tag (p12-20) tief mit dem systemischen Anästhetikum Halothan betäubt und dekapitiert. Nach dem Eröffnen der Schädelkalotte konnte *in situ* ein circa 8-10 mm starker, das dCGL beinhaltender, Gewebeblock präpariert werden, der im Anschluss in eine eisgekühlte physiologische Salzlösung überführt wurde. Diese Lösung beinhaltete die folgenden Substanzen (in mM): Sukrose, 200; PIPES, 20; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 10; CaCl, 0.5; Dextrose, 10. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,35 eingestellt. Zur Versorgung des Gewebes wurde die Lösung mit Sauerstoff begast.

Im Anschluss an die Präparation erfolgte der Transfer des Gewebeblocks auf ein Vibratom (Modell 1000, Ted Pella, Redding, CA, USA) mit dem koronare, circa 300 μ m dicke Präparate geschnitten werden konnten. Zur besseren Handhabung wurden die erhaltenen Hirnschnitte noch einmal in der Mitte geteilt, so dass jeweils 2, das dCGL beinhaltende Präparate pro Schnitt für die späteren Messungen zur Verfügung standen. Insgesamt erhielt man mit dieser Vorgehensweise 4-6 geeignete Schnitte pro Versuchstier. Die Hirnschnittpräparate wurden danach zur Aufbewahrung in eine Haltekammer überführt. Diese enthielt eine Bikarbonat-gepufferte Lösung (standardisierte ACSF - *artificial cerebrospinal fluid*) der folgenden Zusammensetzung (in mM): NaCl, 125; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 24; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; Dextrose, 10. Die Versorgung mit Sauerstoff und die Aufrechterhaltung eines pH-Werts von 7,35 erfolgten durch die Begasung mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂. In diesem Medium wurden die Präparate zunächst für 20 Min. bei 30°C inkubiert und danach für die Dauer der Versuche bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die exakte Temperatur wurde über ein umgebendes Wasserbad sichergestellt. Insgesamt sollte eine Adapta-

tionsphase von einer Stunde gewährleistet sein, bevor mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen wird.



Abb. 2.1 Koronare Hirnschnittpräparation von Ratten. (A) Gehirn *in situ*. (B) Schematische Darstellung eines koronaren Hirnschnittpräparates mit grau eingefärbtem dCGL. 1 - Kortex, 2
- Hippokampus, 3 - dCGL, 4 - Nkl. ventrobasalis thalami.

2.1.2 Präparation akut-isolierter Einzelzellen

Um aus den oben beschriebenen Hirnschnittpräparaten akut-isolierte Einzelzellen zu erhalten, wurden die Schnitte in einer spinner flask mit PIPES-haltigem Inkubationsmedium (siehe Anhang) überführt. Dort wurden eine kontinuierliche Versorgung mit O₂ und eine konstante Temperatur sichergestellt. Die Temperatur wurde zunächst auf 10°C eingestellt und dann sukzessive (alle 5 Min. um 5°C) auf 30°C erhöht. Zur Isolierung der Einzelzellen wurden die Gewebe für 25-30 Min. mit dem Enzym Trypsin (Sigma Typ XI, 1mg/ml) behandelt. Die Wirkung des Enzyms wurde nach Beendigung der Verdauung nicht durch Antagonisten oder Inhibitoren, sondern durch "unendliche Verdünnung", also durch Auswaschen mit enzymfreier PIPES-Lösung erreicht. Die enzymatisch-behandelten Schnitte wurden im Anschluss durch drei beschichete und feuerpolierte Pasteurpipetten (Sigmacote, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) abnehmenden Spitzendurchmessers gezogen, so dass sich einzelne Neurone herauslösen ließen. Die dadurch gewonnenen Zellen wurden in die Messkammer auf ein sich am Boden befindendes, Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen überführt (Poly-L-Lysin, 1:3 verdünnt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die dann vorliegenden Zellen konnten aufgrund ihrer Morphologie eindeutig unterschieden werden. Alle in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Messungen erfolgten an großen (15-25 μ m Durchmesser), multipolar verzweigten thalamischen Schaltneuronen [31, 32, 36]. Alle verwendeten Pharmaka wurden über ein schnelles Applikationssystem und eine entsprechende Applikationspipette in die unmittelbare Umgebung der zu charakterisierenden Zelle eingebracht.

2.1.3 Patch-clamp Ableitungen an Einzelzellen

Nach der Präparation wurden die gewonnenen Einzelzellen in die Messkammer eines inversen Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss, Jena, Deutschland) überführt und konnten dort für circa 20 Min. auf den Boden der Kammer absinken, bevor mit den Messungen begonnen wurde. Alle durchgeführten elektrophysiologischen Experimente erfolgten mittels der *patch-clamp* Technik und wurden in der Ganzzellkonfiguration (whole cell) gemessen [34]. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (21-23 °C) durchgeführt. Um die Zellen elektrophysiologisch charakterisieren zu können, wurden Pipetten aus Borosilikatglas hergestellt (GC150TF-10, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Großbritannien) und über einen chlorierten Silberdraht mit einem EPC-7 Verstärker (E.S.F. Electronics, Friedland, Deutschland) verbunden. Der typische Elektrodenwiderstand lag bei 2-5 M Ω , während der Eingangswiderstand zwischen 3-8 M Ω bestimmt wurde. Die Möglichkeit den Serienwiderstand am Verstärker zu kompensieren wurde routinemäßig genutzt ($\geq 40\%$). Entsprechend der einzelnen Fragestellungen wurden von einem Haltepotenzial ausgehend (zumeist -50 mV) verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet (pClamp Software, Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Als AD-Wandler wurde ein Digidata 1200 verwendet (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Für die Messungen der Ca²⁺-Ströme wurden die folgenden Lösungen (in mM; [80] verwendet: (1) Extrazelluläre Lösung: NaCl, 112; CsCl, 4; KCl, 1; HEPES, 10; Glukose, 10; MgCl₂, 1; CaCl₂, 5.0; TTX, 0.001; TEA-Cl, 20; 4-AP, 6; pH 7.35 mit NaOH eingestellt. (2) Intrazelluläre Lösung: Cs-Glukonat, 85; Cs₃-Citrat, 10; NaCl, 10; KCl, 1; EGTA, 1.1; CaCl₂, 0.1; MgCl₂, 0.25; HEPES, 10; TEA-Cl, 15; Mg-ATP, 3; Na₂-GTP, 0.5; pH 7.25 mit CsOH eingestellt. Zur Charakterisierung der schnellen, transienten Na⁺-Ströme [12] wurden die folgenden Lösungen gewählt (in mM): (1) Extrazelluläre Lösung: NaCl, 80; CsCl, 5; 4-AP, 5; TEA-Cl, 15; HEPES, 10; CaCl₂, 1; MgCl₂, 3; KCl, 1; Glukose, 10; pH 7.35. (2) Intrazelluläre Lösung: Cs₃-Glukonate, 85; NaCl, 10; KCl, 1; EGTA, 11; CaCl₂, 1; MgCl₂, 1; HEPES, 10; TEA-Cl, 10; pH 7.25 wurde mit CsOH eingestellt. Unmittelbar vor jedem Experiment wurden der internen Lösung 2 mM Mg-ATP und 0,5 mM Na-GTP zugesetzt.

2.1.4 Patch-clamp Ableitungen im Hirnschnittpräparat

Alle Ableitungen wurden an thalamokortikalen Schaltneuronen innerhalb des dCGL bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurden die Hirnschnittpräparate in einer Lösung gehalten, die die folgende Zusammensetzung hatte (in mM): NaCl, 120; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; HEPES, 30; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; Glukose, 10. Der pH Wert wurde in Abhängigkeit von den benötigten Messbedingungen entsprechend auf 7,2 (Kontrolle) bzw. 6,4 oder 6,0 Einheiten mittels HCl (1 molare Stocklösung) eingestellt. Einzelne Zellen innerhalb des Hirnschnitts konnten mit Hilfe der differentiellen Interferenzkontrastmikroskopie [24] dargestellt werden. Die elektrophysiologischen Signale wurden mit Borosilikatglas Pipetten (GC150T-10, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Großbritannien), die über einen chlorierten Silberdraht mit einem EPC-10 Verstärker (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) verbunden waren, aufgezeichnet. Die Pipetten wurden mit einer internen Lösung der folgenden Zusammensetzung gefüllt (in mM): K-Glukonat, 95; K₃-Citrat, 20; NaCl, 10; HEPES, 10; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.5; BAPTA, 3; Mg-ATP, 3; Na-GTP, 0.5. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,25 Einheiten eingestellt, die Osmolalität lag bei 295 mOsm/kg. Einige Experimente wurden in nominell Na⁺-freier Lösung durchgeführt (in mM): (1) Extrazelluläre Lösung: NMDG-Cl, 100; KCl, 2.5; KH₂PO₄, 1.25; HEPES, 30; MgSO₄, 3.5; CaCl₂, 0.5; Glukose, 10; TEA-Cl, 20; 4-AP, 6; pH 7,2 oder 6,4/6,0 mit HCl eingestellt; (2) Interne Lösung: K-Glukonat, 95; K₃-Citrat, 20; NMDG-Cl, 10; HEPES, 10; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.5; BAPTA, 1; Mg-ATP, 3. Die interne Lösung wurde mit KOH auf einen pH Wert von 7,25 gesetzt, die Osmolalität betrug 295 mOsm/kg. In allen Messungen, die in nominell Ca²⁺-freier Lösung durchgeführt wurden, wurde die Anzahl der divalenter Kationen über eine Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration von 2 auf 4 mM konstant gehalten.

Für die *current clamp* Experimente wurde eine Pipettenlösung mit 5 mM EGTA und 0.5 mM CaCl₂ verwendet. Der typische Elektrodenwiderstand lag bei 2-3 M Ω , der Serienwiderstand in einem Bereich von 5-15 M Ω . Der Serienwiderstand wurde in allen Experimenten um mehr als 40% kompensiert. Alle Experimente wurden über das Pulse-Softwarepaket (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) auf einem IBM-kompatiblen PC durchgeführt. Das *liquid junction potential* konnte bei 8 ± 1 mV (n = 6) bestimmt werden und wurde entsprechend korrigiert [89].

2.1.5 Darstellung der Ergebnisse

Alle gewonnenen Ergebnisse sind in der vorliegenden Arbeit als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit einem für kleine Stichproben modifizierten *student's* T-Test überprüft sobald von einer Gaus'schen Normalverteilung ausgegangen werden konnte ([23]; Origin Software). Darüber hinaus wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney Test verwendet (Graph Pad Prism Software). Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p < 0,05 betrachtet. Soweit nicht anders angegeben lagen jedoch Signifikanzen mit p < 0,01 vor.

Zur Auswertung der erhobenen Daten aus den Einzelzellmessungen wurden die Programme pClamp, Clampfit (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) und Origin (Microcal[®]) benutzt. Die Messungen im Hirnschnittpräparat wurden mit den Programmen "PULSEFIT" (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) und Origin (Microcal[®]) analysiert.

2.2 In situ Hybridisierung

2.2.1 Präparation des Gewebes

Die Tiere wurden wie zuvor beschrieben präpariert (siehe 2.1.1) und die kompletten Gehirne in Isopentan bei circa -50°C eingefroren. Auf einem Gefriermikrotom (Gala Instrumente, Bad Schwalbach, Deutschland) wurden 14 μ m dicke, das dCGL beinhaltende Hirnschnitte angefertigt, die im Anschluss auf beschichtete Objektträger überführt und bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

2.2.2 Inkubation und Färbung

Digoxigenin-markierte sense- und antisense-Proben wurden durch in vitro Transkription von Ratten-cDNA für TASK1- (korrespondierend zu den Basenpaaren 574-1242) und TASK3-Kanäle (korrespondierend zu den Basenpaaren 502-1431) beinhaltende Vektoren generiert (dankenswerterweise von Prof. A. Karschin, Insitut für Physiologie, Universität Würzburg, Deutschland, zur Verfügung gestellt). Die in situ Hybridisierung wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen (jeweils 5 Min.) und anschließend in 4% PFA fixiert. Danach folgte die Acetylierungsreaktion sowie die Prähybridisierung bei 55°C (2 Stunden). Die zur Vorhybridisierung verwendete Lösung beinhaltete 50% Formamid, 5-fach SSC, 1x Denhardt's Lösung, 0,5 mg/ml Hefe-tRNA und 1,0 mg/ml komplette Hefe-RNA. Für die Hybridisierungsreaktion wurden die Schnitte mit 50% Formamid, 1x Denhardt's Lösung, 0,1 mg/ml Hefe-tRNA und 0,1 mg/ml komplette Hefe-RNA, 10% Dextransulfat, 0,125% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM ED-TA und 300 mM NaCl behandelt. Im Anschluss wurden die Digoxigenin-markierten RNA-Proben zugegeben (Endkonzentration 20 ng/ml Prä-Hybridisierungspuffer) und die Hirnschnitte für 16-18h bei 55°C inkubiert. Für alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden RNAse-freie Lösungen und sterile six-well-Platten verwendet. Nach der Hybridisierungreaktion wurden die Schnittpräparate nach folgendem Prozedere gewaschen: 2 x SSC bei Raumtemperatur (1 x 15 Min.), 50% Formamid/2 x SSC bei 70°C (2 x 60 Min.), 2 x 50% Formamid/0.2 x SSC bei 70°C (2 x 60 Min.), 0.1 x SSC bei 70°C (1 x 60 Min.). Die markierten Zellen konnten nun mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) detektiert werden. An diesem Antikörper befindet sich eine alkalische Phosphatase, so dass die Färbungsreaktion mit 4-Nitroblau Tetrazoliumchlorid und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolat Phosphat als Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) durchgeführt werden konnte.

2.2.3 Prüfung der Spezifität und Auswertung

Die Spezifität der angewendeten Methode wurde durch den Ersatz der markierten *antisense*-Proben durch vormarkierte *sense*-Proben verfiziert. Unter diesen Bedingungen konnten keine positiven Signale detektiert werden. Die Dichte positiv-markierter Zellen wurde mittels des "NeuroLucida"-Systems (MicroBright Field Inc., VT, USA) bestimmt.

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.1 Präparation des Probenmaterials

Um Aussagen über spezifische Gewebe treffen zu können, wurden Hirnschnittpräparate (siehe 2.1.1) unter RNAse-freien Bedingungen präpariert. Aus diesen Materialien konnten dann unter einem Stereomikroskop einzelne Hirnregionen mit Hilfe von Skalpellschnitten isoliert werden. Die Poly(A) messenger RNA (mRNA) wurde mittels einer Extraktion mit Trizol in Anlehnung an die Herstellerinformationen (Oligotex, Qiagen, Deutschland) aus dem Material isoliert.

2.3.2 Umschreibung und Amplifikation

Die cDNA wurde unter Verwendung des SuperScript II Enzyms (Invitrogen Life Technologies, Deutschland) aus 0,5 - 1 μg mRNA mit Oligo(dT)-Primern bei 42°C über 50 Min. synthetisiert. Im Rahmen der PCR wurden für die Amplifikation der HCN-Kanäle 30 μ l Reaktionslösung und 0,75 IE Taq Polymerase (Qiagen, Deutschland) verwendet. Die Amplifikation der TASK-Kanäle erfolgte ebenfalls mit 30 μ l Reaktionslösung in Verbindung mit 0,75 IE HotStarTag Polymerase (Qiagen, Deutschland). Dabei beinhaltete die Reaktionslösung in beiden Fällen: 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM jedes dNTPs und 50 pmol jedes Primers. Die Protokolle der angewendeten Zyklen beeinhalteten für HCN-Kanäle: 3 Min bei 94°C, 35 Zyklen; 30 Sek bei 94°C; 1 Min bei 58°C; 1 Min bei 72°C; für TASK-Kanäle: 15 Min bei 95°C, 35 Zyklen; 30 Sek bei 94°C; 1 Min bei 58°C; 1 Min bei 72°C; 10 Min bei 72°C. Alle einwärtsgleichrichtenden K⁺-Kanäle, die *housekeeping*-Gene β -Aktin und GAPDH, sowie die muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (mAchR) wurden nach dem gleichen Protokoll wie die TASK-Kanäle behandelt (siehe oben). Die jeweilige Schmelztemperatur wurde für jedes verwendete Primer-Paar anhand des G/C-und A/T-Gehalts der Primer in jeder Reaktion berechnet. Die Normalisierung der cDNA wurde mittels spezifischer Primer für die *housekeeping*-Gene β -Aktin und GAPDH durchgeführt.

2.3.3 Verwendete Primer

Zielstruktur	Nukleotide	Zugangs-	Primer	
	$(\mathrm{von}\dots\mathrm{bis})$	nummer	(v: vorwärts, r: rückwärts)	
β -Aktin	253-1080	NM031144	v: ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC AAT	
			r: CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG C	
GAPDH	561-1012	AB017801	v: ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	
			r: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
HCN1	1462-1750	AF247450	v: CTC TCT TTG CTA ACG CGG AT	
			r: TTG AAA TTG TCC ACC GAA	
HCN2	1059-1428	AF247451	v: GTG GAG CGA ACT CTA TTC GT	
			r: GTT CAC AAT CTC CTC ACG CA	
HCN3	1713-1945	AF247452	v: GCA GCA TTT GGT ACA ACA CG	
			r: AGC GTC TAG CAG ATC GAG C	
HCN4	1871-2042	AF247453	v: GCA GCG CAT CCA CGA CTA C	
			r: CGT CAC AAA GTT GGG GTC TGC	
TASK1	220-735	AB048823	v: CAC CGT CAT CAC CAC AAT CG	
			r: TGC TCT GCA TCA CGC TTC TC	
TASK2	330-959	AF259395	v: TGG GCG CCT CTT CTG TGT CTT CTA	
			r: TCC CCT CCC CCA CTT GTT TTC ATT	
TASK3	188-602	AF192366	v: ATG AGA TGC GCG AGG AGG AGA AAC	
			r: ACG AGG CCC ATG CAA GAA AAG AAG	
TASK5	137-700	AF294353	v: GAG CCT GGG CGA GCG TCT GAA C	
			r: CGG GCC AGT CTG TCT GG	
K _{ir} 2.3	623-952	X87635	v: CAG GCC CAC GTG CCC AGG CGG A	
			r: TAC ATG CAT GAT ACA CGG TTT G	
K _{ir} 3.1	124-436	U01141	v: TCG TCC AGC GGT TCG GGC TTG CAG	
			r: GAG TGT AGT TGC CGA CAT GGG C	
K _{ir} 3.2	121-390	X83583	v: GAC CTG CCA AGA CAC ATC AGC C	
			r: CGA GGG GTC CTC TAT GTG GTC CA	
K _{ir} 3.3	522-1058	L77929	v: CAC CTG GAG GAC ACC GCG TG	
			r: GTC GTC CCT CTC GAG GGC GC	
K _{ir} 3.4	358-888	X83584	v: CAC GTG GGT GAC CAA GAG TG	
			r: CTG CTC CAG TTG AGC ACG AG	
mAChR2	1133-1501	J03025	v: CAA GAC CCA GTA TCT CCA AGT CTG	
			r: CGA CGA CCC AAC TAG TTC TAC AGT	
mAChR3	854-1414	M16407	v: ACA GAA GCG GAG GCA GAA AAC TTT	
			r: CTT GAA GGA CAG AGG TAG AGT AGC	

Tab. 2.1 Auflistung der in der vorgelegten Arbeit verwendeten Primer-Paare mit Angabe der Zielstruktur, der Nukleotidsequenz und der Zugangsnummer.

2.4 Semiquantitative RT-PCR

2.4.1 Präparation des Probenmaterials -Laserdissektionsmikroskopie

Thalamische Einzelzellen wurden unter RNAse-freien Bedingungen nach dem beschriebenen Protokoll (siehe 2.1.2) isoliert und auf Membran-beschichteten Objektträgern positioniert (PALM Membrane Slides, P.A.L.M Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland). Nach dem Transfer auf die Objektträger konnten die Zellen für 60 Minuten absinken, um sich an der Membran anzulagern. Im Anschluss wurden die Objektträger in den Kreuztisch eines Laserdissektionsmikroskops (P.A.L.M Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) eingespannt und einzelne Neurone konnten gewonnen werden. Zunächst wurde der Laserfokus auf die Folienebene des beschichteten Objektträgers gerichtet und mittels Laserstrahl die Folie um die jeweilige Zelle zerschnitten (70% der maximalen Energie).



Abb. 2.2 Laserdissektionsmikroskopie und anschließende RT-PCR Technik. Thalamische Einzellzellen konnten unter RNAse-freien Bedingungen isoliert werden (linker Abbildungsteil). Aufgrund etablierter morphologischer Kriterien wurde zwischen großen, multipolaren Schalt- und kleineren bipolaren Interneuronen unterschieden. Die Laserdissektionsmikroskopie erlaubt nun, einzelne identifizierte Zellen über einen Photonenstrahl in ein für die RT-PCR geeigentes Reaktionsgefäß zu "schießen". Die schematische Darstellung der RT-PCR (rechter Abbildungsteil) erfolgt im Anschluß wie beschrieben (siehe 2.4.2 und 2.4.3).

Wichtig ist hierbei, dass sich möglichst wenig Flüssigkeit um die Zellen befindet. Im zweiten Schritt wird die Fokusebene unterhalb der Folie gewählt. Durch die Einwirkung des Laserstrahls kommt es in der obersten Objektträgerschicht zur Umwandlung des Glasmaterials in Plasma, was mit einer Volumenausdehnung assoziiert ist. Diese Ausdehnung wirft wiederum eine Welle auf, die das ausgeschnittene Membranstück und die darauf befindliche Zelle in ein entsprechend positioniertes Reaktionsgefäß katapultiert. Dabei wurden jeweils 10-15 identifizierte Zellen pro Reaktionsgefäß *gepooled* und vor der weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Für die quantitativen Analysen wurden stets gleiche Zellzahlen verwendet.

2.4.2 Umschreibung und Amplifikation

Die semiquantitativen RT-PCR Analysen wurden auf Gewebeebene oder mit isolierten Einzelzellen durchgeführt. Die Gesamt-RNA aus dem Gewebe wurde über eine Trizol-Extraktion den Herstellerangaben folgend aus frischem Material isoliert (RNeasy Lipid Tissue, Qiagen, Deutschland). Die Einzelstrang cDNA wurde mit oligo(dT)18 Primern (Roche, IN, USA) aus 0,5 - 1 μ g mRNA mittels des SuperScript II Enzyms (Invitrogen Life Technologies, Deutschland; 42°C für 50 Min.) hergestellt. Die mRNA der isolierten Einzelzellen wurde unter Verwendung des Sensiskript RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit oligo(dT)18 Primern (Roche, IN, USA) in cDNA umgeschrieben. Die Hybridisierungsproben für die RT-PCR Reaktionen wurden von Applied Biosystems bezogen:

Zielstruktur	Zugangsnr.	Beschreibung
β_2 - Mikro-	NM_012512.1	Assay Location: 75
globulin		Rn00560865_m1
		GTGCTTGCCATTCAGAAAACTCCCC
GAPDH	P/N 4308313	Rodent GAPDH Control Reagents
HCN1	NM_053375.1	Assay Location: 885
		Rn00584498_m1
		CACCAGTGGGAAGAGATATTCCACA
HCN2	NM_053684.1	Assay by design
		v: ACAAGGAGATGAAGCTGTCAGATG (1741-1764)
		r: TGTCAGCCCGCACACT (1815-1830)
		Reporter: CAG ATC TCC CCA AAA TAG (1769-1786)

HCN3	NM_053685.1	Assay Location: 1473
		Rn005866666_m1
		GATCCTACTTTGGGGAGATCTGCCT
HCN4	NM_021658.1	Assay Location: 2206
		Rn00572232_m1
		TCCTATTTTGGAGAGATCTGCTTGC
TASK1	NM_033376.1	Assay Location: 386
		Rn00583727_m1
		ACCACAATCGGCTATGGTCATGCGG
TASK2	NM_053405.1	Assay by design
		v: TCCTTCTACTTCGCTATCACTGTCA (pos.: 337-361)
		r: TTGCCAGCATCGGTTCCA (393-410)
		Reporter: CATGTCCATATCCGATAGTTG (365-385)

Tab. 2.2 Aufstellung der für die RT-PCR verwendeten Primer.

Die RT-PCR Experimente wurden auf einem ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Deutschland) durchgeführt. Das PCR Programm wurde folgerndermaßen gewählt: 2 Min. bei 50°C, 10 Min. bei 95°C, 40 Zyklen; 15 Sek. bei 95°C und 1 Min. bei 60°C.

2.4.3 Auswertung

Alle gewonnenen Ergebnisse wurden mit der ABI Prism 7000 SDS Software ausgewertet. Die jeweilige Effizienz der verwendeten RT-Primer wurde bestimmt, indem die CT-Werte in Abhängigkeit des Verdünnungsfaktors der Gesamt-cDNA aufgetragen wurden. Die lineare Regressionsanalyse dieser Beziehung zeigte einen Unterschied von maximal 8% zwischen β_2 -Mikroglobulin, TASK1, TASK3 und HCN2. Die Quantifizierung der Ergebnisse basierte auf der vergleichenden CT oder DDCT-Methode [10].

2.5 Fluoreszenzimmunzytochemie

2.5.1 Präparation der dissoziierten thalamischen Zellkulturen

Dorsale Anteile des Thalamus wurden von embryonalen Ratten (Long Evans, embryonal Tag 19, E19) präpariert und unmittelbar in eisgekühlte, divalente Kationen freie Hanks Salzlösung (Hanks balanced salt solution, HBSS; 0 mM Mg²⁺, 0 mM Ca²⁺) transferiert. Die Gewebe wurden dreimal in jeweils 5 ml HBSS gespült und im Anschluss daran in 2 ml HBSS mit 0,5% Trypsin für 20 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Gewebe erneut gewaschen (5-mal in 5 ml HBSS) und in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße mit 0,01% DNAseI gegeben (Boehringer Ingelheim, Deutschland). Um die Materialien zu dissoziieren, wurden sie zunächst dreimal durch eine 0,9 mm (Durchmesser, G20) Kanüle und anschließend durch eine 0.45 mM schmale Kanüle (G25) gedrückt. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde durch ein Nylon-Netz (Porengröße 125 μ m) gegossen und in 50 ml Plastikgefäßen mit 18 ml <u>D</u>ulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Eggenstein, Deutschland) aufgefüllt. Nach Bestimmung der Zellquantität wurde die Suspension mit DMEM weiter verdünnt bis die gewünschte Dichte von 16000 Zellen/ml erreicht wurde. Jeweils 500 μ l dieser Zellsuspension wurden in die Öffnung einer 24-Lochplatte gegeben. Auf dem Boden jeder Offnung befand sich ein entfettetes, steriles poly-D-Lysin beschichtetes Deckglas. Die Zellkulturen wurden dann bei 37°C in einem Inkubator bei 5% CO₂-Spannung bis zum jeweils gewünschten Zeitpunkt inkubiert (Neurobasalmedium, Gibco, Eggenstein, Deutschland).

2.5.2 Fixierung und Färbung

Vor der weiteren Verwendung der Zellkulturen wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt, bevor die Zellen für 10 Min. in 4% PFA fixiert (ca. 200 μ l 4% iges PFA für 10 Min. auf die Deckgläschen) wurden. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal für je 10 Min. mit PBS gespült. Nach der Fixierung konnten die Zellen für circa 1 Woche bei 4°C aufbewahrt werden. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die PFA-fixierten Zellen pro Deckglas mit 50 μ l Blockreagenz (Blockpuffer + 0,3% Triton X100; siehe Anhang) für 90-120 Min. inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Blockreagenz abgesaugt und gegen Blockreagenz mit dem jeweiligen Erstantikörper (50 μ l) in der entsprechenden Verdünnung ersetzt (siehe Tab. 2.3). Dieser Inkubationsschritt dauerte 24 Stunden und wurde bei 4°C durchgeführt. Vor den jeweiligen Färbungen wurden alle verwendeten Antikörper in separaten experimentellen Serien titriert. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Präparate für 10 Min. (3x) mit 1xPBS einschließlich 0,3% Triton X100 gespült. Nun konnte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in der erforderlichen Konzentration (siehe Tab. 2.3) in Blockreagenz erfolgen (je 50 μ l). Dieser Schritt dauerte 2 Stunden und sollte so durchgeführt werden, dass die Fluoreszenzantikörper keiner direkten Lichteinwirkung ausgesetzt sind. Danach wurde zunächst für 10 Min. (2x) mit 1xPBS/0,3% Triton X100 und anschließend 10 Min. mit 1xPBS ohne Triton X100 gewaschen. Diesem Prozedere schloß sich ein Spülvorgang mit dH₂O an. Zuletzt konnten die Präparate mit Moviol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) eingedeckelt und bei 4°C aufbewahrt werden. Alle Behandlungsschritte mit Antikörpern sollten für qualitativ bessere Ergebnisse in einer feuchten Kammer durchgeführt werden.

1. Antikörper	Konzentration	Firma	Land
Anti-MAP2 (Maus)	1/1000	Sigma-Aldrich	Deutschland
Anti-TASK3 (Ziege)	1/300	Santa Cruz	USA
Anti-Parvalbumin (Kaninchen)	1/500	Swant	Schweiz
Anti-HCN2 (Kaninchen)	1/500	Alamone	Israel
2. Antikörper	Konzentration	Firma	Land
Cy3-konjugierter Ziege-Anti-	1/1000	Dianova	Deutschland
Kaninchen IgG			
Alexa-Fluor-488-konjugierter	1/1000	Invitrogen	Deutschland
Esel-Anti-Ziege			
Cy5-konjugierter Hase-	1/1000	Dianova	Deutschland
Anti-Maus			

Tab. 2.3 Auflistung aller zur Färbung der thalamischen Zellkulturen verwendeten Erstund Zweitantikörper.

2.6 Computersimulationen mit NEURON

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Computersimulationen basieren auf einem Einzelkompartmentmodell eines thalamokortikalen Schaltneurons [41, 68]. Dieses initial beschriebene Modell wurde an das NEURON Simulationsprogramm adaptiert und entsprechend der jeweiligen Anforderungen erweitert [38]. Das Modell basiert auf der mathematischen Beschreibung der Leitfähigkeiten I_A, I_K, I_C, I_L, I_T, I_{Na persistierend, sowie I_h und zeigt die beiden typischen Aktivitätsmodi thalamischer Schaltneurone: oszillatorisches Entladungsverhalten mit Salven von Na⁺/K⁺-Aktionspotenzialen auf dem Rücken eines niederschwelligen Ca²⁺-Spikes (I_T) sowie tonisches Entladungsverhalten mit der Generierung einzelner Aktionspotenziale [21, 118]. Dieses etablierte Modell wurde um einen einwärts-gleichrichtenden K⁺-Strom (I_{KIR}) nach dem Hodgkin-Huxley Formalismus [135] und um eine pH-sensitive K⁺-Leckleitfähigkeit} (I_{TASK}) erweitert. Die Gleichung zur Beschreibung des Membranruhepotenzials lautet:

$$C_m(dV/dt) = -(I_{leak} + I_{TASK} + I_{KIR} + I_h) + I_{inject}$$

 C_m - Membrankapazität I_{inject} - Injektionsstrom

Der nicht-inaktivierende Strom I_{KIR} wurde wie bereits zuvor beschrieben modelliert [135]:

$$I_{KIR} = g_{KIR} \ m^a (V - E_{KIR})$$

Dabei stellt g_{KIR} die maximale Leitfähigkeit des Stroms I_{KIR} dar, während der Term m^a die Aktivierungsvariable (a = 3) des Stroms repräsentiert. E_{KIR} ist das Umkehrpotenzial des Stroms I_{KIR} .

Der auswärts-gleichrichtende pH-sensitive Leckstrom I_{TASK} wurde als mathematische Annäherung durch die in der vorgelegten Arbeit gemessenen Ströme modelliert:

$$I_{TASK} = g_{TASK} \ m(V - E_{TASK})$$

Dabei steht g_{TASK} für die maximale Leitfähigkeit des Stroms I_{TASK} , während die treibende Kraft durch die Differenz zwischen aktuell vorliegendem Membranpotenzial und dem Umkehrpotenzial des Stroms I_{TASK} definiert wird. Die aktivierende Variable m wurde folgendermaßen definiert:

$$m = y_0 + A_1 e^{(x/t_1)} / (V - E_{TASK})$$

Alle Werte wurden für maximale Leitfähigkeiten und fest definierte Umkehrpotenziale angenommen und in einigen Simulationen systematisch variiert. Um den Beitrag des K⁺-Stroms I_{TASK} am gesamten Leckstrom in thalamischen Schaltneuronen abschätzen zu können, wurde eine pH-insensitive (g_{Leck}) von einer pH-sensitiven (g_{TASK}) Leckleitfähigkeit abgegrenzt. Der jeweilige Beitrag der beiden Leitfähigkeiten wurde systematisch mit dem Ziel verändert, ein Modell der pH-Wert-Effekte in Schaltneuronen der Ratte zu erhalten.
3 Ergebnisse

3.1 Expression von TASK Kanälen, einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanälen und mACh-Rezeptor Subtypen

Unter Verwendung der RT-PCR Technik konnten im Gewebe des dCGL der Ratte PCR-Fragmente der Kanäle TASK1 und TASK3 in signifikanten Mengen nachgewiesen werden, während sich nur schwache Banden für TASK2 darstellten (siehe Abb. 3.1, A).



Abb. 3.1 RT-PCR Analyse zur Expression von TASK-Kanälen, einwärts-gleichrichtenden K⁺-Kanälen und mACh-Rezeptor Subtypen. (A)Expression von TASK1-3 und Kir2.3 im dCGL der Ratte. (B) Expression von TASK5 im dCGL und Cerebellum. (C) Expression der Kanäle Kir3.1-3.4, sowie der ACh-Rezeptoren (m₂-, m₃ACh) im dCGL der Ratte. Die Größe der

verwendeten DNA-Marker sind als Banden jeweils im linken Abbildungsbereich dargestellt (A-C). Wenn als Negativkontrolle H₂O oder isolierte mRNA anstelle der cDNA verwendet wurde, konnten keine PCR-Signale detektiert werden (nicht dargestellt; *modifiziert nach* [77]).

Die Expression von TASK5 konnte im dCGL nicht nachgewiesen werden, währenddessen ein klares Signal für die cDNA im Cerebellum erhalten wurde, welche als Positivkontrolle diente [50]; siehe Abb. 3.1, B). Die Untersuchung der einwärtsgleichrichtenden K⁺-Kanäle (*inward rectifier* <u>K</u>⁺-channels, Kir) erbrachte den Nachweis der Expression von Kir2.3 (siehe Abb. 3.1, A) und allen vier Mitgliedern der Kir3-Familie (Kir3.1-3.4; siehe Abb. 3.1, C), obwohl das Signal für Kir3.4 nur schwach detektiert werden konnte. Zusätzlich konnten PCR-Produkte für m₂ACh- und m₃ACh-Rezeptoren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1, C). Diese Daten belegen die Existenz von Kir-Kanälen, die sensitiv gegenüber Veränderungen des extrazellulären pH-Werts sind (Kir2.3) und durch mACh-Rezeptoren moduliert werden können (Kir3-Familie).



Abb. 3.2 Darstellung TASK1- und TASK3-positiver Zellen im dCGL der Ratte. Die *in situ* Hybridisierung wurde an Hirnschnittpräparaten mittels Digoxigenin-markierter RNA-Sonden komplementär zu TASK1 (A) und TASK3 (B) durchgeführt. In den koronaren Hirnschnittpräparaten zeigen sich in den thalamischen Kerngebieten moderate Expressionslevel für TASK1 und eine hohe Expression für TASK3 (unterschiedliche Vergrößerungen). CGL - Corpus geniculatum laterale, VB - Nkl. ventralis thalami, GD - Gyrus dentatus (modifiziert nach [77]).

In situ Hybridisierungstechniken mittels Digoxigenin-markierter Antisense RNA-Sonden erbrachten den Nachweis einer dichten Verteilung von TASK1-exprimierenden (siehe Abb. 3.2, A) und TASK3-positiven Zellen (siehe Abb. 3.2, B) im dCGL.

In der quantitativen Untersuchung der Zelldichten fanden sich 542 ± 32 TASK1positive Zellen/mm² bzw. 729 ± 24 TASK3-positive Zellen/mm² (n = 6). Um diese Werte in Bezug zur Gesamtzellzahl setzen zu können, wurden Nissl-Färbungen angefertigt. Dabei ergab sich eine Zelldichte von 808 ± 31 Zellen/mm² (n = 6), so dass 67% aller Zellen TASK1 bzw. 90% der Zellen TASK3 exprimieren. Darüber hinaus zeigten die Daten Hinweise für eine zumindest teilweise überlappende Expression der beiden Kanäle. Die in den Kontrollexperimenten verwendeten Sense RNA-Sonden lieferten keine detektierbaren Signale (nicht gezeigt). Ausgehend von der Hypothese, dass TASK1- und TASK3-Sonden ähnliche effektiv sind, zeigen die Resultate der *in situ* Hybridisierung eine höhere Expression für TASK3 als für TASK1 und erhärten damit die Befunde aus den RT-PCR Experimenten, in denen sich ebenfalls eine etwas stärkere Bande für TASK3 zeigte (siehe Abb. 3.1, A).

3.2 Pharmakologische Charakterisierungen der Leckleitfähigkeit in thalamokortikalen Schaltneuronen

Bei Haltepotenzialen zwischen -58 und -68 mV zeigen thalamokortikale Schaltneurone einen anhaltenden Auswärtsstrom (K⁺-Leckstrom, IK_{SO}) von 71 \pm 4 pA [9]. In einem ersten experimentellen Schritt wurde das pharmakologische Profil dieses Auswärtsstroms durch die Applikation von Ionen (H⁺, Ba²⁺) untersucht. Eine Verschiebung des extrazellulären pH-Werts von 7,2 auf 6,4, und die zusätzliche Applikation von Ba^{2+} (150 μm) führte zu einer zweistufigen Reduktion der Stromamplitude (nicht gezeigt). Darüber hinaus führte das Lokalanästhetikum Bupivacain (20 μ m) in der extrazellulären Flüssigkeit zu einer deutlichen Reduktion des Auswärtsstroms auf 29 \pm 3 pA (n = 7). Um eine bessere Darstellbarkeit der Stromantwort zu erreichen, wurde die treibende Kraft durch Messungen bei positiveren Membranpotenzialen durchgeführt. Bei -28 mV konnte ein durchschnittlicher Auswärtsstrom von 348 \pm 11 pA (n = 89) registriert werden. Ein Spannungssprung von -28 auf -68 mV für eine Dauer von 500 ms (alle 20 Sekunden) führte zu einer stufenweisen Abnahme des beschriebenen Stroms (siehe Abb. 3.3, A, inset), was auf Kanäle mit schnellen "gating"-Eigenschaften hindeutet. Die Verringerung des extrazellulären pH-Werts von 7,2 auf 6,4 Einheiten bei einem Haltepotenzial von -28 mV verursachte eine Stromreduktion von $41 \pm 3\%$ (n = 4; siehe Abb. 3.3, A). Die zusätzliche Applikation von Ba^{2+} resultierte in einer weiteren Reduktion von $47 \pm 5\%$ des verbleibenden Stroms (n = 4). Diese Effekte waren gegenüber den jeweiligen Vorbedingungen statistisch

signifikant (p < 0,004). Die umgekehrte experimentelle Anordnung, in der Ba²⁺ vor der zusätzlichen Erniedrigung des pH-Werts hinzugefügt wurde, führte zu einer statistisch signifikanten Stromreduktion von $49 \pm 4\%$ (n = 4; p < 0,0001), wobei die anschließende pH-Wert Verschiebung keinen weiteren Effekt erbrachte (n = 4, p = 0,49; siehe Abb. 3.3, B). Die I/V der Ba²⁺-sensitiven Stromkomponente unter erniedrigtem extrazellulären pH-Wert konnte durch ein Rampenprotokoll von -30 auf -120 mV über 800 ms registriert werden (siehe Abb. 3.3, C). Dabei wurde die Membranantwort unter Ba²⁺/pH 6.4 (siehe Abb. 3.3, C; Einschub: graue Spur) von der Antwort in pH 6.4 subtrahiert (siehe Abb. 3.3, C; Einschub: schwarze Spur).



Abb. 3.3 Wirkung von Ba^{2+} und extrazellulärer pH-Wert Erniedrigung auf einen stehenden Auswärtsstrom in thalamischen Schaltneuronen. (A, B) Amplitude des Netto-Auswärtsstroms aufgetragen gegen die Zeit unter "*voltage-clamp*"-Bedingungen bei -28 mV Haltepotenzial (schwarze Punkte). Extrazelluläre Ansäuerung (pH 6,4) und die Applikation von Ba²⁺-Ionen (150 μ m) werden durch die horizontalen Balken angedeutet. Im Einschub sind jeweils Originalspuren der Membranantwort auf einen von -28 mV Haltepotenzial ausgehenden Spannungssprung nach -68 mV (Dauer: 500 ms) unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Applikation der Pharmaka (pH 6,4; pH 6,4/Ba²⁺; Ba²⁺/pH 6,4) abgebildet. Unter B sind die Ströme unter Ba²⁺ und nach Applikation von Ba²⁺/pH 6,4 nicht voneinander zu unterscheiden. (C) I/V der Ba²⁺-sensitiven Stromkomponente. Diese wurde durch graphische Subtraktion der Membranantwort in Ba²⁺/pH 6,4 von dem Strom unter pH 6,4 erhalten (pH 6,4 - Ba²⁺/pH 6,4). Im Einschub sind Ströme als Antwort auf eine Spannungsrampe von -30 mV nach -120 mV dargestellt (Dauer: 800 ms; pH 6,4 - schwarze Spur, Ba²⁺/pH 6,4 - graue Spur). Eichbalken in den Einschüben A, B: 200 ms/100 pA; C: 100 ms/500 pA.

Die I/V wurde durch eine Einwärts-Gleichrichtung und ein Umkehrpotenzial von -102 ± 2 mV charakterisiert (n = 3; siehe Abb. 3.3, C). Damit lag das gemessene Umkehrpotenzial in der Nähe des errechneten K⁺-Gleichgewichtspotenzials (-104 mV). Die beschriebenen Daten belegen die Existenz einer pH-sensitiven Stromkomponente, die durch Ba²⁺-Ionen blockierbar ist und aufgrund dieses pharmakologischen Profils auf TASK-Kanäle hindeutet. Darüber hinaus zeigt sich eine Beteiligung für einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle in thalamischen Schaltneuronen.

3.3 Beteiligung von TASK-Kanälen am K⁺-getragenen Auswärtsstrom

Im nächsten Schritt wurde die mögliche Beteiligung von TASK-Kanälen am anhaltenden Auswärtsstrom in thalamischen Schaltneuronen im Detail analysiert. Dazu wurde zunächst die pH-sensitive Stromkomponente näher untersucht.



Abb. 3.4 Analyse der pH-sensitiven Komponente des stehenden Auswärtsstroms. (A) Originalspuren der Membranantwort auf einen Spannungssprung von einem Haltepotenzial bei -28 mV auf -68 mV (Dauer: 500 ms) unter pH 7,2 und pH 6,4. (B) Darstellung der Stromamplitude bei -28 mV in Abhängigkeit von der Zeit. Die Dauer der pH-Wert Erniedrigung wird durch den horizontalen Balken angezeigt. (C) Ströme, die durch ein Rampenprotokoll von -30 mV nach -120 mV (Dauer: 800 ms) ausgelöst wurden (unter beiden pH-Bedingungen). (D) Die I/V der pHsensitiven Komponente wurde durch graphische Subtraktion des Rampenstroms in pH 6.4 von dem Strom unter Kontrollbedingungen (pH 7.2 - pH 6.4) erhalten (modifiziert nach [77]).

In den folgenden Experimenten wurde ZD 7288 dem extrazellulären Medium zugesetzt, um Kontaminationen durch die ebenfalls pH-sensitiven HCN-Kanäle zu vermeiden [86]. Die Erniedrigung des extrazellulären pH-Werts von 7,2 auf 6,4 Einheiten führte zu einer signifikanten Reduktion des Auswärtsstroms von $40 \pm 2\%$ (n = 35, p < 0,0001; siehe Abb. 3.4, A) bei -28 mV. Dieser Effekt war reversibel und in einigen Zellen konnte beobachtet werden, dass die Stromamplitude beim Auswaschen über die Werte unter Kontrollbedingungen stieg (siehe Abb. 3.4, B). Die Strom-Spannungs-Beziehung der zu untersuchenden Komponente wurde durch ein Rampenprotokoll, bei dem die Membran über 800 ms von -30 mV auf -120 mV hyperpolarisiert wurde, analysiert (siehe Abb. 3.4, C). Dieses Protokoll beinhaltet eine Hyperpolarisationsrate von 0,11 mV/ms, so dass der Auswärtsstrom bei jedem angelegten Membranpotenzial einen "steady-state"-Zustand erreichen sollte [81, 130]. Die I/V wurde durch Subtraktion der gemessenen Ströme in pH 6.4 (siehe Abb. 3.4, C; graue Spur) von den entsprechenden Strömen unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. 3.4, C; schwarze Spur) erhalten. Dabei ergab sich eine eindeutige Auswärtsgleichrichtung und ein Umkehrpotenzial von -103 ± 2 mV, das nahe dem errechneten K⁺-Gleichgewichtspotenzial lag (siehe Abb. 3.4, D).

Im Folgenden wurde das Lokalanästhetikum Bupivacain - ein beschriebener Inhibitor von TASK-Kanälen - zur weiteren Charakterisierung des Stroms verwendet [7, 33, 52, 56, 73]. Die Applikation von Bupivacain führte zu einer Dosis-abhängigen, signifikanten Reduktion (p < 0.03) des anhaltenden Auswärtsstroms bei -28 mV von $12 \pm 4\%$ (5 μ M, n = 3, nicht dargestellt), $38 \pm 3\%$ (20 μ M, n = 29; siehe Abb. 3.5, A) und $28 \pm 4\%$ (50 μ M, n = 5, nicht dargestellt). Diese Effekte waren nur teilweise reversibel, und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen 20 μ M und 50 μM (p = 0.06). Um bessere Aussagen über die Spezifität des Inhibitors gegenüber TASK-Kanälen treffen zu können, wurde die Substanz (20 μ M) bezüglich ihrer Wirkung auf den schnellen, transienten K⁺-Auswärtsstrom [11] sowie auf den schnellen Na⁺-Strom [76] und auf den hochschwelligen Ca²⁺-Strom [74] in akut isolierten Zellen getestet. Dabei ergaben sich Stromreduktionen für den transienten K⁺-Strom von $9 \pm 2\%$ (n = 6), für die schnellen Na⁺-Ströme von $11 \pm 4\%$ (n = 3) und für die untersuchten Ca²⁺-Ströme von $6 \pm 2\%$ (n = 5). Die Effekte auf TASK-Kanäle waren signifikant stärker als die vorherrschenden Effekte auf andere Leitfähigkeiten (p <0.005). Diese Daten deuten einen vornehmlichen Effekt auf TASK-Kanäle und eine minimale Wirkungen bei anderen Leitfähigkeiten an. Daraufhin wurde Bupivacain in den folgenden Experimenten in einer Konzentration von 20 μ m eingesetzt. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Substanz in 3 von 18 Zellen zu einer circa 10 prozentigen Zunahme der Stromamplitude des stehenden Auswärtsstroms führte. Diese Zellen wurden nicht in die Analyse eingeschlossen.

Die I/V der Bupivacain-sensitiven Komponente wurde wiederum durch die Verwendung von Rampenprotokollen mit anschließender Subtraktion des Stroms unter Substanzeinfluss von dem Strom unter Kontrollbedingungen (Kontrolle - Bupivacain) gewonnen (siehe Abb. 3.5, B). Die I/V zeigte ein Umkehrpotenzial von -103 ± 1 mV (errechnetes K⁺-Gleichgewichtspotenzial bei -104 mV), eine deutliche Auswärtsgleichrichtung und war damit der I/V der pH-sensitiven Komponente sehr ähnlich (siehe Abb. 3.5, B).



Abb. 3.5 Stromkomponenten unter Applikation von Bupivacain und nach Verschiebung des pH-Werts unter Bupivacain. (A, C, D) Darstellung der Stromamplitude bei -28 mV in Abhängigkeit von der Zeit. Die Gabe der einzelnen Pharmaka wird durch horizontale Balken angedeutet. Einschübe: Originalspuren der Membranantwort induziert durch einem Spannungssprung (-28 mV auf -68 mV, 500 ms), unter Kontrollbedingungen (Kon), unter Erniedrigung des pH-Werts und/oder nach Gabe von Bupivacain (siehe Markierungen nahe der Spuren). (C) Die Stromspuren nach Applikation von Bupivacain in pH 7,2 bzw. pH 6,4 sind nicht zu unterscheiden. (B) I/V der Bupivacain-sensitiven Komponente nach graphischer Subtraktion des Stroms unter Substanzwirkung von dem Strom unter Kontrollbedingungen (Kon - Bupivacain). Einschub: Ströme nach Rampenprotokollen (-30 mV nach -120 mV über 800 ms) unter Kontrollbedingungen (Kon, schwarze Spur) und nach Gabe von Bupivacain (graue Spur). Die Eichbalken repräsentieren in A: 200 ms/200 pA, in B: 100 ms/300 pA und C: 100 ms/150 pA.

Im nächsten experimentellen Schritt wurde die Wirkung der extrazellulären pH-Wert Erniedrigung in Anwesenheit von Bupivacain getestet (siehe Abb. 3.5, C). Nach Gabe von Bupivacain wurde der Auswärtsstrom zunächst - wie erwartet - um 45 \pm 2% reduziert (n = 7, siehe Abb. 3.5, C). Nachdem sich ein konstanter Effekt unter Bupivacain eingestellt hatte, wurde zusätzlich der pH-Wert von pH 7,2 auf pH 6,4 erniedrigt. Dieses Vorgehen führte jedoch zu keiner weiteren Abnahme der Stromamplitude, sondern in erster Näherung zu einem geringgradigen, aber nicht signifikanten Anstieg des Stroms um $4 \pm 1\%$ (n = 7, siehe Abb. 3.5, C).

Diese Effekte lassen sich plausibel durch eine pH-abhängige Deblockade der TASK-Kanäle durch Bupivacain erklären [52]. Vergleicht man diese Effekte in individuellen Zellen, so führt die Erniedrigung des pH-Werts zu einer signifikanten Reduktion der Stromamplitude bei -28 mV von 27 ± 3% (n = 5, p < 0,008; siehe Abb. 3.5, D). Nach dem Auswaschen des pH-Effekts und dem Erreichen der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen führte die Applikation von Bupivacain (20 μ M) zu einer signifikanten Verkleinerung des Stroms auf 28 ± 6% (n = 5, p < 0,01; siehe Abb. 3.5, D). Die Inhibition der Stromantwort durch die pH-Verschiebung bzw. durch Bupivacain unterschieden sich dabei nicht signifikant (p < 0,95).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Bupivacain und eine pH-Wert Erniedrigung mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselbe Stromkomponente beeinflussen. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass TASK-Kanäle zur Leckleitfähigkeit in thalamokortikalen Schaltneuronen beitragen und das Substrat der pH-Abhängigkeit dieser Leckleitfähigkeit bilden.

3.4 Halothan-sensitive Ströme in thalamischen Neuronen

Ein weiteres typisches Charakteristikum von TASK-Kanälen ist ihr Verhalten gegenüber Inhalationsanästhetika [101]. In thalamischen Zellen bewirkte die Addition von 1% Halothan zur extrazellulären Flüssigkeit für 3 Min. einen signifikanten (p < 0,0001) und reversiblen Anstieg der Amplitude des Auswärtsstroms (bei -28 mV) um $64 \pm 3\%$ (n = 6; siehe Abb. 3.6, A; schwarze Rechtecke). Die Halothansensitive Stromkomponente konnte durch graphische Subtraktion der jeweiligen Rampenströme bestimmt werden, indem die Ströme unter Kontrollbedingungen von den Strömen während des Substanzeffekts abgezogen wurden (Halothan - Kon). Die Strom-Spannungs-Beziehung zeigte einen linearen Verlauf und eine nur mäßig ausgeprägten Auswärtsgleichrichtung bei Spannungswerten oberhalb von -45 mV (nicht dargestellt). Das Umkehrpotenzial des Halothan-sensitiven Stroms konnte bei -68 ± 4 mV bestimmt werden und lag damit bei positiveren Potenzialen als das erwartete Umkehrpotenzial für K⁺-Ströme (-104 mV).

Diese Beobachtung lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass verschiedene Ionen an der Entstehung dieser Stromkomponente beteiligt sind. In einer extrazellulären Lösung mit einem pH-Wert von 6,4 führte die Gabe von Halothan zu einer Stromzunahme von $42 \pm 2\%$ (n = 4; siehe Abb. 3.6, A; offene Kreise) und lag damit signifikant (p < 0.006) unter den Vergleichswerten in pH 7,2. Das Umkehrpotenzial wurde in diesen Messungen auf -49 ± 2 mV verschoben (n = 3; nicht dargestellt).



Abb. 3.6 Halothan-sensitive Stromkomponenten. (A) Darstellung der Stromamplitude bei -28 mV in Abhängigkeit von der Zeit nach Applikation von Halothan in pH 7,2 (geschlossene Quadrate), pH 6,4 (offene Kreise) und in pH 6,4 unter K⁺-Strom Isolation (pH 6,4/Na⁺-frei; offene Quadrate). Einschub: Originalspuren der Membranantwort gegenüber einem Spannungssprung von -28 mV auf -68 mV (Dauer: 500 ms) unter Kontrollbedingungen (Kon) und nach Gabe von Halothan. Die Eichbalken repräsentieren 100 ms bzw. 200 pA. (B) I/V der Halothan-sensitiven Komponente, die durch ein Rampenprotokoll von -30 mV auf -120 mV über 800 ms ausgelöst wurde. Die Ströme wurden durch graphische Subtraktion erhalten (Halothan - Kon). Die Messungen wurden in Anwesenheit der K⁺-Kanal Inhibitoren TEA (20 mM), 4-AP (6 mM), TTX (1 μ M) und ZD 7288 (100 μ M) durchgeführt; darüber hinaus wurde eine Na⁺-freie extra- und intrazelluläre Lösung verwendet; die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration lag bei 0,5 mM. Um einen reversiblen Effekt zu erhalten, wurde 1% Halothan für 3 Minuten appliziert (modifiziert nach [77]).

Diese Beobachtung passte gut zu der Annahme, dass durch die pH-Wert Erniedrigung und dadurch folgenden Blockade der TASK-Kanäle ein K⁺-Anteil der Halothan-sensitiven Komponente inhibiert wurde. Um die ionale Zusammensetzung der Halothan-sensitiven Komponente weiter zu charakterisieren, wurde das beschriebene Rampenprotokoll (von -30 mV auf -120 mV in 800 ms) in einer externen Lösung mit TEA (20 mM), 4-AP (6 mM), TTX (1 μ M) und ZD 7288 (100 μ M) verwendet. Darüber hinaus wurde in einer Na⁺-freien intra- und extrazellulären Lösung gearbeitet und die externe Ca²⁺-Konzentration auf 0,5 mM eingestellt. Unter diesen Bedingungen zeigte die Halothan-sensitive Komponente eine deutliche Auswärtsgleichrichtung und ein Umkehrpotenzial bei -92 ± 1 mV (n = 3; siehe Abb. 3.6, B; schwarze Spur; errechnetes $E_K = -94$ mV). Mit einem extrazellulären pH-Wert von 6,4 Einheiten wurde die Halothan-sensitive Komponente nahezu komplett blockiert (n = 3; siehe Abb. 3.6, A; offene Quadrate, B; graue Spur). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Halothan-sensitive Strom durch TASK-Känale, sowie durch aktuell nicht identifizierte Na⁺- und/oder Ca²⁺-Kanäle getragen wird.

3.5 Metabotrope ACh Rezeptor-vermittelte Modulation der K⁺-Leckleitfähigkeit

Die Blockade der K⁺-Leckleitfähigkeit durch die Aktivierung von mACh Rezeptoren hat eine hohe funktionelle Relevanz bezüglich des Wechsels zwischen thalamischen Aktivitätszuständen [66]. Um die Beziehung zwischen TASK-Kanälen und der beschriebenen K⁺-Leckleitfähigkeit weiter zu charakterisieren, wurden die Effekte von Bupivacain und extrazellulärer pH-Wert Erniedrigung auf Muskarin- und Achinduzierte Antworten in thalamokortikalen Schaltneuronen untersucht. Die Applikation von ACh (50 μ M) oder Muskarin (50 μ M) führte zu einer signifikanten (p < 0,0001) Reduktion des Auswärtsstroms bei -28 mV von 35 ± 3% (n = 3; nicht dargestellt) bzw. 34 ± 4% (n = 14; siehe Abb. 3.7, A/B).



Abb. 3.7 Applikation von Muskarin (50 μ M) in Anwesenheit/Abwesenheit von Bupivacain bzw. in pH 7,2 oder pH 6,4. (A) Originalspuren der Stromantwort auf einen Spannungssprung von -28 mV auf -68 mV über 500 ms unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von Muskarin. (B) Darstellung der Stromamplitude bei -28 mV in Abhängigkeit von der Zeit. Die Applikation von Muskarin wird durch den horizontalen Balken repräsentiert. (C, D) I/V der Blocker-sensitiven Stromkomponenten nach graphischer Subtraktion (vor Muskarin - während Muskarin). Die Ströme wurden durch ein Rampenprotokoll von -30 mV nach -120 mV (Dauer: 800 ms) ausgelöst. Muskarin blockiert einen einwärts- und auswärts-gleichrichtenden Strom unter Kontrollbedingung (schwarze Spuren) und einen einwärts-gleichrichtenden Strom unter Anwesenheit von Bupivacain (C, graue Spur) bzw. in pH 6,4 (D, graue Spur; modifiziert nach [77]).

Es muss dennoch erwähnt werden, dass in 2 von 16 Zellen die Applikation von Muskarin in einer 10% igen Vergrößerung der Stromamplitude resultierte. Diese Zellen wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen. Die Muskarin-sensitive Komponente wurde durch graphische Subtraktion der Rampenströme in Anwesenheit von Muskarin (siehe Abb. 3.8, B; graue Spur) von den gemesssenen Strömen in Abwesenheit des Muskarins (vor Muskarin - während Muskarin) gewonnen (siehe Abb. 3.8, B; schwarze Spur). Sie zeigte dabei eine Einwärts- und Auswärtsgleichrichtung, sowie ein Umkehrpotenzial nahe dem erwarteten K⁺-Gleichgewichtspotenzial ($E_{rev} = -104 \pm 4 \text{ mV}$, n = 4; siehe Abb. 3.8, A; geschlossene Quadrate).

Im nächsten experimentellen Schritt wurde Bupivacain verwendet, um die möglicherweise beteiligten TASK-Kanäle zu blockieren. In Anwesenheit von Bupivacain führte die Koapplikation von Muskarin zu einer kleinen, aber signifikanten (p < 0,002) Verringerung des Auswärtsstroms bei -28 mV von $4 \pm 9\%$ (n = 12, nicht dargestellt).



Abb. 3.8 Muskarin-sensitive (50 μ M) Rampenströme unter verschiedenen Ableitbedingungen. (A) I/V der Muskarin-sensitiven Stromkomponente unter Kontrollbedingungen (geschlossene Quadrate), in Anwesenheit von Bupivacain (offene Quadrate) und in pH 6,4 (Kreise). Die I/V wurde durch graphische Subtraktion (vor Muskarin - während Muskarin; -30 mV nach -120 mV über 800 ms) gewonnen. (B, C, D) Repräsentative, durch die beschriebenen Rampenprotokolle ausgelöste Stromspuren unter Kontrollbedingungen (Kon) bzw. nach Applikation von Muskarin (Muskarin), Bupivacain (Bupi) und in pH 6,4.

Die zugehörige I/V wurde durch Subtraktion der Ströme (vor Substanzeffekt - während des Substanzeffekts) kalkuliert (siehe Abb. 3.8, C) und zeigte einen einwärtsgleichrichtenden K⁺-Strom ($E_{rev} = -104 \pm 2 \text{ mV}$; n = 5; siehe Abb. 3.8, A; offene Quadrate). Um diese Daten zu bestätigen wurde Muskarin in pH 6,4 eingesetzt, um so die TASK-Kanal Beteiligung erneut weitgehend zu unterdrücken. Dabei zeigte die Muskarin-sensitive Stromkomponente eine Einwärtsgleichrichtung, und der Strom kehrte bei $-103 \pm 2 \text{ mV}$ um (n = 3, $E_k = -104 \text{ mV}$; siehe Abb. 3.8, A; geschlossene Kreise).

Um diese Befunde zu erhärten, wurden die Muskarin-Effekte in individuellen Zellen unter verschiedenen Ableitbedingungen untersucht. In sechs thalamokortikalen Zellen zeigte die Muskarin-sensitive Komponente einen einwärts- und auswärtsgleichrichtenden Anteil mit einem Umkehrpotenzial von -104 ± 1 mV (n = 6; siehe Abb. 3.7, C/D; schwarze Spuren). Nach dem Auswaschen des beschriebenen Effekts erfolgte eine zweite Gabe von Muskarin, diesmal jedoch in Anwesenheit von Bupivacain bzw. in pH 6,4. In beiden Ableitbedingungen war die I/V der Muskarin-sensitiven Komponente durch eine Einwärtsgleichrichtung charakterisiert und kehrte nahe dem K⁺-Gleichgewichtspotenzial um (Muskarin/Bupivacain: $E_{rev} = -105 \pm 1$ mV, n = 3; Muskarin/pH 6,4: $E_{rev} = -103 \pm 1$ mV, n = 3).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die Aktivierung von mACh Rezeptoren zu einer Inhibition von TASK und einwärts-gleichrichtenden (Kir) K⁺-Kanälen führt.

3.6 Spezifische Effekte von extrazellulären divalenten Kationen und Spermin auf TASK-Ströme

Um eine bessere Aussage über den relativen Beitrag der Kanäle TASK1 und TASK3 zum Leckstrom thalamokortikaler Neurone treffen zu können, wurde die unterschiedliche Sensitivität der beiden TASK-Isoformen gegenüber extrazellulären divalenten Kationen und Spermin genutzt [88]. Die Neurone wurden mit einer Ca²⁺-freien Lösung superfundiert (4 mM Mg²⁺) und zeigten unter diesen Bedingungen einen anhaltenden Auswärtsstrom von 626 \pm 226 pA bei einem Membranpotenzial von -28 mV (n = 19). Durch zusätzliches Entfernen der Mg²⁺-Ionen aus der Badlösung vergrößerte sich der Strom um 18 \pm 6% (n = 12; p <0,001; siehe Abb. 3.9, A-C). Die I/V der Kationen-sensitiven Komponente konnte durch Verwendung von Spannungsrampen (-28 mV nach -138 mV über 800 ms) und anschließender Subtraktion der Ströme unter Kationen-freien Ableitbedingungen von den Membranantworten unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. 3.9; C, D) kalkuliert werden. Der subtrahierte Strom zeigte eine nahezu lineare Strom-Spannungs-Beziehung und ein Umkehrpotenzial bei -105 \pm 8 mV (n = 8), welches nahe am errechneten K⁺-Gleichgewichtspotenzial (-104 mV) lag.



Abb. 3.9 Effekte von divalenten Kationen und Spermin auf IK_{SO}. (A) Normalisierte Stromamplitude (bei -28 mV) aufgetragen gegen die Zeit unter Kontrollbedingungen (pH 7,3; schwarze Quadrate; n = 6) und nach extrazellulärer pH-Wert Erniedrigung (pH 6,0; offene Quadrate; n = 4). Die Zeit, in der die Zellen mit Kationen-freier Lösung versorgt wurden, wird durch die horizontale Linie angezeigt. (B) Zusammenfassende Darstellung des Stroms bei pH 7,3 (schwarze Säule), nach Inkubation mit Bupivacain (20 μ M; graue Säule) und bei pH 6,0 (weiße Säule). (C) Repräsentative Stromspuren die durch Rampenprotokolle von -28 mV nach -138 mV (Dauer: 800 ms) ausgelöst wurden unter Kontrollbedingungen (schwarze Spur) und in Kationen-freier Lösung (graue Spur). (D-F) I/V-Beziehung der divalenten Kationen-sensitiven Komponente bei pH 7,3 (D; Kationen-frei - Kontrolle), der pH-sensitiven Komponente (E; pH 7,3 - pH 6,0) und der Kationen-sensitiven Komponente in pH 6,0 (F; divalente Kationen-frei - pH 6,0) nach graphischer Subtraktion. (G) Amplitude des Stroms über die Zeit in einem thalamokortikalen Schaltneuron unter "voltage-clamp"-Bedingungen. Die Applikation von Spermin bzw. die Kationen-freie Lösung sind durch horizontale Balken angezeigt. (H) Strom-Spannungs-Beziehung der Spermin-sensitiven Komponente (500 μ M; Kationen-frei - Spermin) nach Subtraktion der Rampenströme (*modifiziert nach [88]*).

In 4 von 23 untersuchten Zellen kehrte der Subtraktionsstrom bereits bei circa -50 mV um. Diese Zellen wurden nicht in die Analyse eingeschlossen. Die Vorinkubation mit Bupivacain führte zu einer deutlichen Erniedrigung des durch die Kationen-freie Lösung vermittelten Effekts (7 \pm 2%; n = 3; siehe Abb. 3.9; B). Die folgende Serie von Experimenten wurde in extrazellulären Lösungen mit einem pH Wert von 6,0 durchgeführt. Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigte sich der anhaltende Ausswärtsstrom bei -28 mV um 35 \pm 5% (n = 4) gegenüber den Kontrollbedingungen erniedrigt (siehe Abb. 3.9; B). Das Entfernen der Mg²⁺-Ionen aus der Badlösung führte zu einer signifikant (p < 0.002) kleineren Zunahme des stehenden Auswärtsstroms von $5 \pm 1\%$ im Vergleich zu den Effekten unter Kontrollbedingungen (pH 7.3; siehe Abb. 3.9, A; B). Die pH-sensitive Komponente zeigte eine deutliche Auswärtsgleichrichtung, wie für TASK-Ströme zu erwarten, und ein Umkehrpotenzial von -100 \pm 5 mV (n = 4). Die divalente Kationen-sensitive Stromkomponente in pH 6,0 wurde durch eine Einwärtsgleichrichtung und ein Umkehrpotenzial bei -106 \pm 11 mV (n = 4; siehe Abb. 3.9; F) charakterisiert, was auf eine Beteiligung von einwärtsgleichrichtenden K⁺-Kanälen hinweist.

Die divalente Kationen-sensitive Stromkomponente wurde in thalamischen Neurone darüber hinaus durch die Applikation von Spermin im Hirnschnittpräparat untersucht (siehe Abb. 3.9; G). In Mg²⁺-freier Lösung resultierte die Zugabe von 100 bzw. 500 μ M Spermin in einer reversiblen Abnahme der Stromamplitude von 14 ± 4% (n = 3) bzw. 24 ± 6% (n = 3; siehe Abb. 3.9; G). Die I/V der Spermin-sensitiven Komponente ähnelte dem Verlauf der divalenten Kationen-freien Stromkomponente und zeigte ein Umkehrpotenzial von -103 ± 6 mV (siehe Abb. 3.9; H).

In der Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigen die pH-, die divalente Kationenund die Spermin-sensitiven Stromkomponenten in thalamokortikalen Schaltneuronen eine Amplitude von 100 bis 300 pA bei Membranpotenzialen um -28 mV. Da TASK1-Kanäle insensitiv gegenüber divalenten Kationen und Spermin sind [88], lassen die Daten den Rückschluß zu, dass der größere Anteil des Auswärtsstroms in diesen Zellen durch TASK3 getragen wird.

3.7 Einfluss der K⁺-Leckleitfähigkeit auf das Feuerverhalten thalamischer Neurone

Die funktionelle Relevanz der Modulation von TASK-Kanälen auf das Aktionspotenzialmuster thalamokortikaler Neurone wurde unter "*current-clamp*"-Bedingungen untersucht. Die Ableitungen wurden unter Verwendung eines DC-Stroms von leicht hyperpolarisierten Werten des Membranpotenzialen ausgehend durchgeführt (-73 ± 1 mV, n = 12; V_{rest} = -71 ± 1 mV, n = 24). Unter diesen Ableitbedingungen führten depolarisierende Strompulse (siehe Abb. 3.10, oberer Abbildungsteil) zur typischen Salvenaktivität mit 2-5 Na⁺/K⁺-Aktionspotenzialen auf einem sogenannten niederschwelligen " Ca^{2+} -spike" (siehe Abb. 3.10, A, B, D).



Abb. 3.10 Effekte von Bupivacain, pH-Wert Erniedrigung, Halothan und Muskarin auf das Aktionspotenzialmuster thalamokortikaler Neurone. Alle Muster wurden unter *currentclamp*-Bedingungen gemessen und durch einen 300 ms langen 100 - 200 pA depolarisierenden Strompuls ausgelöst. Von hyperpolarisierten Werten des Membranpotenzials ausgehend (siehe Markierung an den Spuren) wurden durch die Stimulation Aktionspotenziale in Form von Salven ausgelöst (A, B, D; linke Spalte). Die Gabe von Bupivacain (20 μ M, A), pH-Wert Erniedrigung in ZD 7288 (B) und die Applikation von Muskarin (50 μ M, D) führten zu einer Depolarisation der Membran und dem damit einhergehenden Wechsel des Aktionspotenzialsmuster zu tonischen Folgen von Aktionspotenzialen als Antwort auf die Stimulation. Die Gabe von Halothan (1%, C) bei einem Mebranpotenzial von -61 mV resultierte in einer Membranhyperpolarisation und einem Wechsel aus dem tonischen Modus in den Salvenentladungsmodus, der durch ein niederschwelliges Ca²⁺-Aktionspotenzial, mit einzelnen Na⁺/K⁺-Aktionspotenzialen gekennzeichnet ist (*modifiziert nach* [77]).

Die Analyse der ersten beiden Aktionspotenziale der Salve ergab eine Frequenz von 148 \pm 7 Hz (n = 12). Die Applikation von Bupivacain (20 μ M) führte zu einer Membrandepolarisation auf 42 \pm 3 mV, die von einem Wechsel des Aktivitätsmodus begleitet wurde. Die Zellen wechselten von der Salvenaktivität zu einer tonischen Aktionspotenzialgenerierung (siehe Abb. 3.10, A; n = 3). Dabei ergaben sich Frequenzen im Bereich von 38 \pm 9 Hz (n = 3). Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn der extrazelluläre pH-Wert von 7,2 auf 6,4 Einheiten in Anwesenheit von ZD 7288 (100 μ M) reduziert (Membranpotenzial bei pH 6.4: -52 ± 3 mV; Frequenz: 32 ± 10 Hz; n = 6; siehe Abb. 3.10, B) oder Muskarin (50 μ M) appliziert wurde (Membranpotenzial: -49 ± 2 mV; Frequenz: 37 ± 4 Hz; n = 3; siehe Abb. 3.10, D). Alle beschriebenen Effekte waren reversibel.

Die Effekte des Inhalationsnarkotikums Halothan wurden von leicht depolarisierten Werten des Membranpotenzials ausgehend (- $61 \pm 2 \text{ mV}$; n = 4) untersucht. Das Membranpotenzial wurde jeweils durch die Verwendung eines depolarisierenden DC-Stroms eingestellt. Die bereits beschriebene Stimulation (100 - 200 pA; 300 ms) löste unter diesen Bedingungen tonische Folgen von Aktionspotenzialen aus (siehe Abb. 3.10, C). Halothan (1%) bewirkte eine Hyperpolarisation der Membran auf - $68 \pm 1 \text{ mV}$ (n = 4) begleitet von einem Wechsel des Aktivitätsmodus in Richtung eines niederschwelligen Ca²⁺-Spikes, der typischerweise ein einzelnes Aktionspotenzial auslöste. Neben der Öffnung von TASK-Kanälen könnte diese Beobachtung auch durch eine Halothan-vermittelte Abnahme des Eingangswiderstands oder durch eine Blockade des T-Typ Ca²⁺-Stroms erklärt werden [107, 122]. Beide Effekte würden ebenfalls in einer Verschiebung des vorherrschenden Membranpotenzials resultieren und könnten sich somit auf die Aktionspotenzialentstehung auswirken. Tatsächlich führte eine längere Applikation von Halothan unter denselben Ableitbedingungen zu einer passiven Membranantwort (nicht dargestellt).

3.8 Koexpression von HCN- und TASK-Kanal Isoformen im dCGL

In Vorbereitung der elektrophysiologischen Studien zur Interaktion von HCN- und TASK-Kanälen, wurde die Expression im dCGL auf Gewebeniveau untersucht. RT-PCR Experimente zeigten dabei deutliche Signale für TASK1 und TASK3, während TASK2 kaum und TASK5 überhaupt nicht detektierbar waren (siehe Abb. 3.1, A und Abb. 3.11, A). Im Anschluss daran wurde ein Ansatz mittels quantitativer "*real time"*-PCR gewählt, um bessere Aussagen über das Expressionsniveau treffen zu können. Nach Normalisierung gegen das Kontrollgen β_2 -Mikroglobulin zeigte sich ein um 4,4 \pm 0,2 (n = 3) höheres Expressionsniveau für TASK3 im Vergleich zu TASK1 (siehe Abb. 3.11, C).

Vergleichbare Expressionslevel wurden auch für kortikale $(3,6 \pm 0,1; n = 3)$ und hippokampale $(3,5 \pm 0,1; n = 3)$ Gewebeproben gefunden (nicht dargestellt). Im Cerebellum, für das eine hohe TASK1-Expression gezeigt werden konnte [1], ergab sich ein TASK3/TASK1-Verhältnis von $0,7 \pm 0,1$ (n = 3). Die Expression von HCN-Kanälen wurde nach dem gleichen Prinzip untersucht. Konventionelle PCR-Protokolle belegten eine Expression für alle vier HCN-Isoformen (siehe Abb. 3.11, A). Die Verwendung der "*real time*"-PCR-Technik ergab zwischen HCN2/HCN3 und HCN4 ein Verhältnis von 7,5 \pm 0,1 (n = 3) bzw. HCN2/HCN1 ein Verhältnis von 12 \pm 0,1 (n = 3; siehe Abb. 3.11, C). In der Zusammenfassung der Ergebnisse kann gefolgert werden, dass TASK3 und HCN2 die dominanten Kanalisoformen im dCGL darstellen.



Abb. 3.11 PCR und immunzytochemische Ergebnisse zur Expression der TASK- und HCN-Kanäle im dCGL der Ratte. (A) Konventionelle PCR zur Expression der Kanäle TASK1-5 sowie HCN1-4 in dCGL Gewebe. (B) Koexpression von HCN2- und TASK3-Kanälen in identifizierten thalamokortikalen Neuronen. (C) Quantitative Analyse der Expression von TASK1 und TASK3 sowie HCN1-4 im Vergleich zu β_2 -Mikroglobulin in Gewebeproben des dCGL. Die Anzahl der Zyklen wurde gegen das normalisierte Fluoreszenzsignal aufgetragen (Δ Rn). (D) Immunhistochemiche Darstellung von TASK3 (grün) und HCN2 (rot) auf identifizierten Neuronen in Zellkulturen des dorsalen Thalamus. Der Overlay (rechte Abbildung) zeigt die Koexpression beider Kanalproteine. (E) Immunhistochemische Koexpression von Mikrotubuli-assoziierten Protein II (MAP2, blau), einem für Neurone spezifischen Molekül sowie Parvalbumin (Parv, grün), einem für TC Neurone spezifischen Molekül im Vergleich mit TASK3 (rot) in kultivierten thalamokortikalen Schaltneuronen. Die Überlagerung der Einzelfärbungen (rechte Abbildung) belegt die Kolokalisation. (modifiziert nach [79]) Im nächsten experimentellen Schritt wurde die zelluläre Lokalisation des HCN2und TASK3-Kanals näher untersucht. Nach akuter Isolierung einzelner Neurone des dCGL wurden thalamokortikale Schaltneurone anhand ihrer morphologischen Eigenschaften ausgewählt [74, 80, 93] und jeweils 10 Zellen mittels eines Laserdissektionsmikroskops für weitere RT-PCR Analysen gesammelt. Unter Verwendung von HCN2- und TASK3-spezifischen Primerpaaren wurden detektierbare Signale für beide Kanäle nachgewiesen (siehe Abb. 3.11, B). Darüber hinaus konnten mit TASK3- und HCN2-spezifischen Antikörpern eine dichte, beide Kanäle exprimierende Population von Zellen im thalamischen Hirnschnittpräparat dargestellt werden (nicht gezeigt). Auch in thalamischen Zellkulturen konnte die Koexpression der beiden Kanäle belegt werden (siehe Abb. 3.11, D). Dass es sich bei den TASK3/HCN2-positiven Zellen tatsächlich um thalamokortikale Schaltneurone handelt, wurde durch die Expression von Mikrotubuli assoziiertem Protein (MAP2) und dem für thalamische Schaltneurone typischen Ca²⁺-Bindungsprotein Parvalbumin [45, 78] bestätigt (siehe Abb. 3.11, D).

3.9 Interaktion von TASK- und HCN-Kanälen: Charakterisierung pH-sensitiver Rampenströme

Um die funktionelle Interaktion zwischen HCN- und TASK-Kanälen zu beschreiben, wurde der extrazelluläre pH von 7,3 entsprechend Kontrollbedingungen auf pH 6,3 erniedrigt, einen Wert der bspw. bei zerebralen Ischämien beobachtet wird [114]. Da sowohl Ströme, die durch HCN- als auch durch TASK-Kanäle fließen, sensitiv gegenüber Veränderungen des extrazellulären pH-Werts reagieren [63, 77, 119], verursacht dieses experimentelle Prozedere eine Modulation der K⁺-Leckleitfähigkeit und des H-Stroms (I_h, HCN). Die Ströme durch TASK-Kanäle wurden von einem Haltepotenzial bei -30 mV durch ein Rampenprotokoll nach -120 mV (Dauer: 800 ms) ausgelöst. Die entsprechende I/V wurde durch graphische Subtraktion der Rampenströme (pH 7,3 - pH 6,3) erhalten. Die I/V der pH-sensitiven Komponente war durch Auswärtsgleichrichtung (siehe Abb. 3.12, A; graue Spur, pH 6,3 spät) und ein Umkehrpotenzial bei -89 ± 3 mV (n = 5; siehe Abb. 3.12, A) charakterisiert.

Das Umkehrpotenzial lag damit circa 15 mV über dem errechneten K⁺-Gleichgewichtspotenzial ($E_K = -104 \text{ mV}$). Allerdings konnte eine graduelle Veränderung des Umkehrpotenzials beobachtet werden: dieses lag bei $-103 \pm 1 \text{ mV}$ circa 3 Minuten nach pH-Wert Erniedrigung (siehe Abb. 3.12, A und B; offene Kreise) und bei $-91 \pm$ 3 mV (siehe Abb. 3.12, A, graue Linie und B; graues Quadrat; n = 3) circa 7 Minuten nach pH-Wert Erniedrigung. Um zu demonstrieren, dass diese pH-Wert abhängigen Effekte zumindest teilweise auch über HCN-Kanäle vermittelt werden, wurde ZD 7288 als H-Strom Inhibitor eingesetzt. Bei Inkubation der Zellen mit ZD 7288 (100 μ M) vor Anderung des pH-Werts Manöver, zeigte die I/V der pH-sensitiven Komponente eine für TASK-Kanäle typische Auswärtsgleichrichtung und ein Umkehrpotential von -103 ± 2 mV (n = 7; siehe Abb. 3.12, A; schwarze Spur, pH 6,3/ZD 7288), demzufolge nahe dem K⁺-Gleichgewichtspotenzial gelegen. Die Umkehrpotentiale der pH-sensitiven Komponente mit und ohne den Einfluss von ZD7288 waren signifikant (p < 0,001) unterschiedlich. Um den Einfluss einer pH-Wert Erniedrigung auf die HCN-Kanäle direkt darzustellen, wurde I_h von einem Haltepotenzial von -43 mV ausgehend durch hyperpolarisierende Spannungssprünge mit zunehmender Amplitude ($\Delta V = -10$ mV) und abnehmender Pulslänge ($\Delta t = -500$ ms) ausgelöst (d.h. 6 Sekunden bei -53 mV bis 2 Sekunden bei -133 mV). Den hyperpolarisierenden Pulsen folgte ein konstanter Spannungssprung nach -93 mV (siehe Abb. 3.12, C).



Abb. 3.12 PH-sensitive Stromkomponenten in thalamokortikalen Schaltneuronen. (A) I/V der pH-sensitiven Komponente nach graphischer Subtraktion (pH 7,3 - pH 6,3) in An- (schwarze Spur) und Abwesenheit (graue Spur und offene Kreise nach 10 und 5 Minuten extrazellulärer Azidose) von ZD 7288 (100 μ M). Die Ströme wurden durch Rampenprotokolle (von -30 nach -120 mV über 800 ms) ausgelöst. (B) Werte des Umkehrpotenzials der pH-sensitiven Stromkomponenten in der An- (schwarze Kreise) und Abwesenheit (offener Kreis: 4-5 Minuten nach pH-Erniedrigung; graues Quadrat: 9-10 Minuten nach pH-Erniedrigung) von ZD 7288. (C) Familie von Stromspuren in pH 7,3 (schwarze Spuren) und pH 6,3 (graue Spuren) in thalamischen Schaltneuronen. Stromspuren bei -63, -83, -103 und -123 mV sind dargestellt. (D) Aktivierungskurve von I_h in pH 7,3 (schwarze Kreise, n = 7) und in pH 6,3 (graue Kreise, n = 7). Die durchgezogenen Linien repräsentieren eine Boltzmann Approximation.

Die Ableitungen wurden in Ba²⁺ (150 μ M) durchgeführt, um eine Beeinflussung von TASK- oder einwärts-gleichrichten K⁺-Strömen zu verhindern [77]. Die Analyse des deaktivierenden Stroms ergab eine halbmaximale Aktivierung des I_h bei einem Membranpotenzial von -83 ± 2 mV (n = 9) bei pH 7,3 (siehe Abb. 3.12, D, schwarze Kreise). Etwa 10 Minuten nach der Erniedrigung des extrazellulären pH-Werts von 7,3 auf 6,3 zeigte sich eine signifikante Verschiebung (p = 0.007) der halbmaximalen Aktivierung des H-Stroms auf -88 ± 2 mV (n = 7, siehe Abb. 3.12, D, graue Kreise). Um sicherzustellen, dass der beschriebene Befund nicht Ausdruck eines Auswascheffekts ("*run downs"*) war, wurden die gleichen Protokolle in 10 minütigen Intervallen unter Kontrollbedingungen appliziert. Dabei ergab sich keine signifikante (p = 0.153) Veränderung der halbmaximalen Aktivierung (1. Protokoll: -86 ± 3 mV; 2. Protokoll: -84 ± 3 mV; Daten nicht dargestellt). Zusammengefasst legen die beschriebenen Befunde den Rückschluss nahe, dass HCN- und TASK-Kanäle einen Beitrag zur pH-sensitiven Komponente in thalamokortikalen Schaltneuronen liefern und die Erregbarkeit der Zellmembran gegenteilig beeinflussen.

Zunächst führte die Applikation des ZD 7288 zu einer signifikanten (p = 5 x 10⁻⁷) Hyperpolarisation der Membran von Ruhewerten auf -79 ± 2 mV (V_{ZD}; n = 7; siehe Abb. 3.13, A). Wurde das Membranpotenzial durch einen DC-Strom auf das Ausgangsniveau von -73 mV zurückgeführt, löste das beschriebene depolarisierende Pulsprotokoll einen typischen Ca²⁺-Spike mit Entladungssalven aus (F_{ZD/H} = 136 ± 11 Hz; n = 6; siehe Abb. 3.13, B und Abb. 3.13, E).

Unter diesen Ableitbedingungen resultierte die extrazelluläre Ansäuerung in einer deutlichen Membrandepolarisation auf $(V_{ZD/pH6.3})$ -52 ± 3 mV (n = 6; siehe Abb. 3.13, A), wodurch ein Wechsel der Aktionspotenzialgenerierung von dem Salvenmodus zu einem tonischen Entladungsverhalten stattfand (FZD/pH6.3 = 32 ± 8 Hz; n = 6; siehe Abb. 3.13, B und Abb. 3.13, F).

3.10 Interaktion von TASK- und HCN-Kanälen: Effekte der extrazellulären pH-Wert Erniedrigung auf das Aktionspotenzialmuster thalamischer Zellen

Die funktionelle Konsequenz der Beeinflussung sowohl von HCN- als auch TASK-Kanälen durch extrazelluläre pH-Wert Verschiebungen wurde unter *current clamp*-Bedingungen untersucht. Die Ableitungen erfolgten bei durch DC-Strominjektion leicht hyperpolarisierten Werten des Membranpotenzials ($V_H = -73 \pm 1 \text{ mV}$, n = 12; Ruhepotenzial: $-71 \pm 1 \text{ mV}$, n = 25 siehe Abb. 3.13, A).



Abb. 3.13 Effekte von pH-Wert Verschiebungen auf das Entladungsverhalten thalamokortikaler Schaltneurone der Ratte unter "current clamp"-Bedingungen. (A) Werte des Membranruhepotenzials unter verschiedenen Ableitbedingungen. V_R = Membranruhepotenzial unter Kontrollbedingungen; V_{ZD} = Membranruhepotenzial in Anwesenheit von ZD 7288 (100 μ M); V_H = Haltepotenzial, über DC-Strominjektion eingestellt; $V_{pH6,3}$ = Membranruhepotenzial bei pH 6,3; $V_{ZD/pH6,3}$ = Membranruhepotenzial bei pH 6,3 in ZD 7288. (B) Frequenzen der Aktionspotentialgenerierung unter verschiedenen Ableitbedingungen. Die Frequenzen wurden durch die Analyse der ersten beiden Aktionspotenziale nach Applikation des depolarisierenden Pulsprotokolls ermittelt. F_H = Feuerfrequenz bei V_H ; $F_{ZD/H}$ = Feuerfrequenz bei V_H in Anwesenheit von ZD 7288; $F_{pH6,3}$ = Feuerfrequenz in pH 6,3; $F_{ZD/pH6,3}$ = Feuerfrequenz in pH 6,3 unter Anwesenheit von ZD 7288. (C-F) Depolarisierende Strompulse (300 ms, 100 - 200 pA) ausgehend von einem Kontrollpotenzial bei circa -73 mV löste Salvenaktivität in Ab- (C) und Anwesenheit (E) von ZD 7288 aus. Nach extrazellulärer pH-Wert Erniedrigung löste das gleiche Stimulationsprotokoll einen Wechsel von der Salvenaktivität zu einem tonischen Modus der Aktionspotenzialgenerierung in Anwesenheit (F), jedoch nicht in Abwesenheit (D) von ZD 7288 aus.

Unter diesen Ableitbedingungen führten depolarisierende Stromsprünge zu Entladungssalven, die durch den Ca²⁺-Spike bedingt wurden und Aktionspotenzialfrequenzen von 134 \pm 10 Hz (n = 6; siehe Abb. 3.13, B, C) auslösten. Die Erniedrigung des extrazellulären pH-Werts von 7,3 auf 6,3 Einheiten führte zu einer nicht signifikanten (p > 0.05) Membrandepolarisation auf -68 ± 1 mV (siehe Abb. 3.13, A), wobei das typische Muster von Entladungssalven als Antwort auf die Strompulsinjektion erhalten blieb ($F_{pH6.3} = 113 \pm 1$ Hz; siehe Abb. 3.13, B und Abb. 3.13, D; n = 5). Die Blockade des I_h durch Vorinkubation mit ZD 7288 veränderte diese Effekte maßgeblich.



Abb. 3.14 Effekte extrazellulärer pH-Wert Verschiebungen auf die Aktivitätsmodi thalamischer Zellen in Mäusen. (A) Membranpotenziale unter verschiedenen Ableitbedingungen. $V_{R/HCN+/+}$ = Membranruhepotenzial unter Kontrollbedingungen in HCN2^{+/+} Mäusen; $V_{R/HCN-/-}$ = Membranruhepotenzial unter Kontrollbedingungen in HCN2^{-/-} Mäusen; V_H = Haltepotenzial unter Verwendung eines DC-Stroms; $V_{pH6.3/HCN+/+}$ = Membranruhepotenzial unter pH 6,3 in HCN2^{+/+} Mäusen; $V_{pH6.3/HCN-/-}$ = Membranruhepotenzial unter pH 6,3 in HCN2^{-/-} Mäusen. (B) Frequenzen der Aktionspotenzialgenerierung unter verschiedenen Ableitbedingungen. In die Analyse wurden jeweils die ersten beiden Aktionspotenziale der Membranantwort eingeschlossen. $F_{HCN+/+}$ = Feuerfrequenz bei V_H in HCN2^{+/+} Mäusen; $F_{HCN-/-}$ = Feuerfrequenz bei V_H in HCN2^{-/-} Mäusen; $F_{pH6,3/HCN+/+}$ = Feuerfrequenz bei pH 6,3 in HCN2^{+/+} Mäusen; $F_{pH6.3/HCN-/-}$ = Feuerfrequenz bei pH 6,3 in HCN2^{-/-} Mäusen. (C, D) Unter Verwendung eines depolarisierenden Stimulationsprotokolls (100 - 200 pA, 500 ms) zeigten thalamische Schaltneurone in HCN^{+/+} bei einem Haltepotenzial von circa -73 mV oszillatorisches Feuerverhalten unter Kontrollbedingungen (C) und in pH 6,3 (D). (E, F) In Neuronen aus HCN2^{-/-} Mäusen löste das Protokoll unter Kontrollbedingungen ebenfalls eine oszillatorische Membranantwort aus (E). Nach extrazellulärer pH-Wert Verschiebung kam es in den "Knock out"-Tieren zu einer Membrandepolarisation, die mit der Generierung tonischer Aktionspotenzialfolgen assoziiert war (F).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Erniedrigung des extrazellulären pH-Werts in der Summe zu einer Nettodepolarisation in thalamokortikalen Neuronen führt und funktionell relevant für das Entladungsverhalten der Zellen ist. Aufgrund des hyperpolarisierenden Einflusses von TASK-Kanälen bzw. aufgrund des depolarisierenden Charakters der HCN-Kanäle stabilisieren TASK-Ströme und I_h das jeweils vorliegende Membranpotenzial gegensinnig. Die beiden für thalamische Neurone typischen Modi der Aktionspotenzialgenerierung, das hoch-frequente Salvenverhalten bzw. der tonische Modus, werden dabei per se nicht verändert.

Diese pharmakologisch im Hirnschnittpräparat der Ratte erhobenen Daten, wurden im nächsten experimentellen Ansatz durch die Verwendung einer HCN2-Knock out Maus (HCN2^{-/-}) näher untersucht [61]. Das Membranruhepotenzial der thalamokortikalen Schaltneurone lag in den Wildtyp (HCN^{+/+}) Mäusen ($V_{R/HCN+/+}$ = -69 ± 1 mV, n = 22) bei signifikant (p = 1 x 10⁻¹¹) positiveren Werten als bei den $HCN^{-/-}$ Tieren ($V_{R/HCN-/-} = -81 \pm 1 \text{ mV}$, n = 21; siehe Abb. 3.14 A), was durch frühere Ergebnisse bestätigt wurde [61]. Von einem Membranpotenzial bei -73 \pm 1 mV ausgehend (DC-Strom), führte der Wechsel von pH 7,3 auf pH 6,3 in $HCN^{+/+}$ Tieren zu einer nicht signifikanten Membranhyperpolarisation $(V_{pH6,3/HCN2+/+})$ auf -75 ± 1 mV (n = 6; siehe Abb. 3.14 A, D). Unter beiden Bedingungen (pH 7,3 und pH 6,4) zeigten sich typische Entladungssalven mit einer Intra-Burst-Frequenz $(F_{HCN+/+})$ von 114 ± 2 Hz bzw. $(F_{pH6.3/HCN+/+})$ 111 ± 6 Hz (n = 6; siehe Abb. 3.14 B). In Zellen von $HCN^{-/-}$ Mäusen zeigte sich bei einem Haltepotenzial von -73 mV unter Kontrollbedingungen eine Intra-Burst-Frequenz von $F_{HCN-/-} = 108 \pm 6$ Hz (n = 3; siehe Abb. 3.14 B, E). Bei pH 6,3 waren die Zellen signifikant $(p = 2 \times 10^{-4})$ depolarisierter bei einem Membranpotenzial von $V_{pH6,3/HCN-/-} = -59 \pm 3 \text{ mV}$ (n = 3; siehe Abb. 3.14 A, F) und zeigten tonisches Antwortverhalten ($F_{pH6.3/HCN-/-}$ $= 31 \pm 8$ Hz; n = 3; siehe Abb. 3.14 B, F). Diese Befunde deuten darauf hin, dass HCN2-Kanäle den größten Teil des I_h in thalamokortikalen Neuronen tragen.

3.11 Simulation der Interaktion von TASK- und HCN-Kanälen in einem Einzelkompartmentmodell

Zusätzlich wurde ein Ansatz über ein gut etabliertes, den I_h beinhaltendes Computermodell gewählt, um die relativen Beiträge von HCN- und TASK-Kanälen an den beschriebenen pH-Effekten zu bestimmen [41, 68]. Als zusätzliche Leitfähigkeiten wurde ein einwärts-gleichrichtender K⁺-Strom [135] und der auswärts-gleichrichtende I_{TASK} in das bestehende Modell eingefügt.

Die Parameter für die Gesamtleckleitfähigkeit I_{K-Leck} (Ausgangswert = 10 nS; [41, 68] und I_{TASK} wurden systematisch variiert. Die beschriebenen Messdaten waren repro-

duzierbar, sobald 49% des Gesamtlecks durch TASK-Kanäle modelliert wurden. Unter diesen Bedingungen zeigte das Zellmodell ein Membranruhepotenzial bei V₁ = -72 mV (siehe Abb. 3.15 A). Von diesem Potenzial ausgehend, führte ein depolarisierendes Stimulationsprotokoll zu einem niederschwelligen Ca²⁺-Spike und Entladungssalven ("bursts") mit einer Frequenz von $F_1 = 102$ Hz (siehe Abb. 3.15 B, C).



Abb. 3.15 Computermodell der Aktivitätsmodi in einem thalamokortikalen Zellmodell der Ratte. (A, B) Membranruhepotenzial und Frequenzen des Zellmodells unter verschiedenen Bedingungen: Kontrollbedingungen (V₁, F₁); unter 25%iger Blockade des I_h und 90%iger Blockade des I_{TASK} (V₂, F₂); ohne I_h (V₃); ohne I_h mit Rückführung des Membranpotenzials über einen DC-Strom (V_{3/DC}, F_{3/DC}); ohne I_h mit DC Strom und 90%iger Reduktion des I_{TASK} (V_{4/DC}, F_{4/DC}). (C) Depolarisierende Strompulse (100 pA, 500 ms) wurden von einem Potenzial von -72 mV ausgehend appliziert. Wenn I_h und I_{TASK} auf 100% gesetzt waren, wurde ein Membranruhepotenzial von -72 mV erreicht. Das Stimulationsprotokoll wurde durch entsprechende Entladungssalven ("bursts") beantwortet. (D) Mit der Festsetzung von I_h auf 75% bzw. I_{TASK} auf 10% (Modellierung des pH-Effekts) kam es zu einer Membrandepolarisation auf -68 mV. Das Feuerverhalten zeigte weiterhin die typischen Entladungsmuster. (E) Wurde nun die Blockade des H-Stroms modelliert und I_h auf 0% und I_{TASK} wieder auf 100% gesetzt, waren 150 pA DC-Strom nötig, um das Ruhepotenzial auf -72 mV einzustellen. Auch unter diesen Bedingungen reagierte das Zellmodell mit dem oszillatorischen Modus auf das Stimulationsprotokoll. (F) Wurde I_h auf 0% und I_{TASK} auf 10% gesetzt, resultierte eine Membrandepolarisation auf -58 mV und tonisches Antwortverhalten.

Die Effekte der extrazellulären pH-Wert Erniedrigung wurden durch die gleichzeitige Reduktion des I_h um 25% [86] bzw. I_{TASK} um 90% [77] simuliert. Im Ergebnis führte dieses Vorgehen zu einer Membrandepolarisation des Modells auf V₂ = -68 mV (siehe Abb. 3.15 A), wobei das Feuerverhalten weiterhin in Form von Salven vorlag (siehe Abb. 3.15 D). Im nächsten Schritt wurde die Blockade des H-Stroms durch ZD 7288 modelliert, indem im Zellmodell die Leitfähigkeit des Stroms auf 0% gesetzt wurde. Dieses Prozedere führte zu einer Membranhyperpolarisation auf V₃ = -82 mV (siehe Abb. 3.15 A). Über einen DC-Strom wurde das Haltepotenzial analog zu den *patch-clamp*-Messungen auf V_{3/DC} = -72 mV (siehe Abb. 3.15 A) zurückgesetzt. Erneut wurde über das depolarisierende Stimulationsprotokoll robuste "*bursts*" ausgelöst (F_{3/DC} = 105 Hz; siehe Abb. 3.15 B, E). Wurde nun der pH-Effekt durch 90%ige Reduktion des I_{TASK} modelliert, konnte eine deutliche Membrandepolarisation auf -58 mV beobachtet werden, was mit der tonischen Generierung von Aktionspotenzialen (F_{4/DC} = 19 Hz; siehe Abb. 3.15 B, E) assoziiert war.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass TASK1-/TASK3- und HCN2-Kanäle das Membranpotenzial in entgegengesetzter Richtung beeinflussen und somit über die funktionelle Interaktion stabilisieren.

4 Diskussion

Die vorgelegte Promotionsschrift liefert eine zusammenfassende Arbeit über die Expression und die funktionelle Relevanz der Zwei-Poren-Kaliumkanäle TASK1 und TASK3 für thalamokortikale Schaltneurone im Hirnschnittpräparat und darüber hinaus (*in vivo*). Sie stellt weiterhin die erste Arbeit über die für die Stabilisierung des Membranruhepotenzials wichtige Interaktion zwischen TASK-Kanäle und HCN-Kanälen in thalamischen Zellen dar.

4.1 Methodenkritische Aspekte: thalamische Einzelzellen und Neurone im Hirnschnittpräparat

In der vorliegenden Arbeit wurden morphologische Charakteristika, die in zahlreichen Arbeiten vorbeschrieben waren, benutzt, um sowohl an Einzelzellen als auch im Hirnschnittpräparat zwischen Schalt- und Interneuronen differenzieren zu können [36, 131]. Während Interneurone als kleine bipolare Zellen erscheinen, sind Schaltneurone durch ihre multipolaren Verzweigungen und den größeren Zelldurchmesser (15 - $25 \ \mu m$) klar zu unterscheiden [30, 31, 32].

Gute elektrophysiologische Vorcharakterisierungen des verwendeten Zelltyps lagen aus zahlreichen Arbeiten unter Verwendung verschiedener in vivo und in vitro Ansätze sowohl im Kontext extrazellulärer als auch intrazellulärer Messungen vor [10, 21, 42, 43, 44], so dass die gewonnenen Ergebnisse zur Kaliumleckleitfähigkeit gut in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden konnten. In diesen Arbeiten zeigte sich bereits, dass das jeweils vorherrschende Membranruhepotenzial einen wichtigen Prädiktor für die Art der Aktionspotenzialgenerierung thalamischer Zellen darstellt. Das oszillatorische Feuerverhalten - auch als Salvenaktivität bezeichnet tritt bei hyperpolarisierter Membran auf, ist durch einen niederschwelligen "Ca²⁺-Spike", der 2 - 5 Na⁺/K⁺-Aktionspotenziale trägt, charakterisiert und ist mit einem niederfrequenten, hochamplitudigen EEG assoziiert. Durch Depolarisation kommt es zum Wechsel von der Salvenaktivität zu einem tonischen Feuerverhalten mit der Generierung einzelner Na $^+/K^+$ -Aktionspotenziale [11, 44, 95]. Daraus zeigt sich, welchen Einfluss Leitfähigkeiten auf die Funktionalität der Zellen haben können, da sie maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Membranpotenzials beteiligt sind.

Thalamische Einzelzellpräparationen liefern einen Großteil (z.B. oszillatorisches und tonisches Feuerverhalten, verzögertes Einsetzen der Aktionspotenzialgenerierung) jedoch nicht alle Eigenschaften der untersuchten Neurone (z.B. anomale Gleichrichtung - von der Dauer und Amplitude der Membranhyperpolarisation abhängige Repolarisation der Membran in Richtung ihres Ruhewerts; [69, 70]). Mögliche Gründe hierfür sind die in der Präparation verwendete enzymatische Behandlung der Zellen, der Verlust intrazellulärer Mediatoren, sowie die dendritische Lokalisation einzelner Leitfähigkeiten. Die zellulären Eigenschaften von Neuronen im Hirnschnittpräparat sind gut messbar. Die Zellen haben eine natürliche Entwicklung erfahren, lokale Verbindungsmuster entsprechen den *in vivo* Bedingungen und kleine funktionelle Einheiten bleiben intakt. Dennoch sind die Zellen von ihrer Umgebung isoliert, es fehlt ihnen der Kontakt zu entfernteren Nervenzellen und es existiert kein natürlicher sensorischer Eingang mehr.

Für die vorgestellten Ableitungen wurden Hirnschnittpräparate aus Tieren zwischen dem 12. und 20. postnatalen Tag hergestellt. Die abgeleiteten Zellen zeigten auf die Fragestellung bezogen alle typischen Eigenschaften thalamokortikaler Schaltneuronen. Diese Beobachtung wird auch durch frühere anatomische Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass die morphologische Differenzierung der CGL-Neurone nach der zweiten postnatalen Woche weitestgehend abgeschlossen ist [97].

4.2 Beitrag von TASK-Kanälen an der Leckleitfähigkeit in thalamokortikalen Schaltneuronen

Ein signifikanter Anteil der Leckleitfähigkeit in thalamokortikalen Zellen im Bereich des Membranruhepotenzials (-65 mV) und bei positiveren Membranpotenzialen (-30 mV) scheint durch TASK-Kanäle getragen zu werden, was z.B. durch die beschriebene Sensitivität gegenüber dem Lokalanästhetikum Bupivacain (20 μ M) angedeutet wird. Die blockierende Wirkung von Bupivacain auf TASK-Kanäle konnte dabei in zahlreichen Zelltypen nachgewiesen werden [7, 8, 33, 56, 58, 73]. Dieser Befund wird darüber hinaus durch das pharmakologische Profil der Leckleitfähigkeit, nämlich der Abhängigkeit von dem extrazellulären pH-Wert, der Reaktion gegenüber der Applikation von Halothan und dem Verhalten nach Stimulation von mACh-Rezeptoren unterstützt [81, 101]. Das Verhalten der Bupivacain-sensitiven Komponente mit einer eindeutigen Auswärtsgleichrichtung und einem Umkehrpotenzial nahe dem kalkulierten K⁺-Gleichgewichtspotenzial deutet ebenfalls auf TASK-Ströme im *wholecell*-Modus hin [106]. Dennoch sollte man auch an eine Beteiligung von Kir-Typ K⁺-Kanälen denken, da diese in zahlreichen Zelltypen zur Leckleitfähigkeit beitragen [37]. Unter diesem Aspekt stellen der Kir2.3-Kanal, sowie Mitglieder der Kir3.X-

Familie interessante Zielstrukturen dar, da diese ebenfalls durch eine extrazelluläre pH-Wert-Erniedrigung blockiert werden [7, 15], durch die Stimulation von mACh-R aktiviert werden [110] und im dCGL exprimiert vorliegen [77]. Dennoch scheint die Leckleitfähigkeit in thalamokortikalen Neuronen hauptsächlich durch TASK-Kanäle getragen zu werden, da die Effekte der extrazellulären Ansäuerung (in ZD 7288) durch Bupivacain geblockt werden konnten. Die isolierte pH-sensitive Stromkomponente zeigte eine klare Auswärtsgleichrichtung vergleichbar mit der Bupivacainsensitiven Komponente und den Beobachtungen zu TASK-Kanälen in anderen Zelltypen [8]. Ba²⁺-Ionen blockieren Kir-Typ- und TASK-Kanäle; dementsprechend zeigte auch die Ba²⁺-sensitive Stromkomponente in thalamokortikalen Schaltneuronen die beschriebenen typischen Eigenschaften. Dieser Rückschluss wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Ba²⁺-sensitive K⁺-Leitfähigkeit in thalamischen Neuronen existiert [71, 135] und durch die in der vorgelegten Arbeit erhobenen Befunde, dass ein Ba²⁺-sensitiver einwärtsgleichrichtender Strom bei niedrigem extrazellulärem pH-Wert beobachtet werden kann, aber keine pH-sensitive Komponente in Ba²⁺-haltigen Lösungen.

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass Bupivacain neben TASK-Kanälen auch Na⁺-Leitfähigkeiten [6], hochschwellige Ca²⁺-Leitfähigkeiten [59] und Spannungs-abhängige K⁺-Kanäle [53] blockiert. Deshalb wurde der Effekt auf die genannten Ionenkanäle in akut-isolierten Zellen auch in der vorgelegten Arbeit untersucht. Dabei blockierte Bupivacain circa 40% des anhaltenden Auswärtsstroms, was verglichen mit den Effekten auf Na⁺-, Ca²⁺- und die schnelle, transiente K⁺-Leitfähigkeit ($\sim 10\%$) vierfach höher war. Aus diesen Ergebnissen wurde der Rückschluss gezogen, dass Bupivacain unter den gegebenen Ableitbedingungen und in den eingesetzten Konzentrationen als Marker für Ströme, die durch TASK-Kanäle fließen, verwendet werden kann. In der vorgelegten Studie wird diese Ansicht durch zwei weitere experimentelle Befunde gestützt: 1.) Die isolierte Bupivacain-sensitive Stromkomponente kehrt beim erwarteten K⁺-Gleichgewichtspotenzial um, was darauf hinweist, dass eine mögliche Kontamination des Stroms nur durch eine andere K⁺-Leitfähigkeit bedingt sein kann. Eine wichtige Spannungs-abhängige K^+ -Leitfähigkeit, die unterhalb der Schwelle aktiv ist und dadurch die thalamischen Aktivitätszustände beeinflussen kann, ist ein schneller transienter Auswärtsstrom [11, 40]. Wie aber bereits angedeutet ist der Bupivacainvermittelte Effekt deutlich kleiner im Vergleich zum stehenden Auswärtsstrom. 2.) Die extrazelluläre pH-Wert Erniedrigung und der inhibierende Effekt durch Bupivacain zeigen deutliche Ähnlichkeiten bezüglich des Umkehrpotenzials, des Kurvenverlaufs und der Amplitude, was eine Beeinflussung der gleichen Stromkomponente vermuten lässt.

Zusammengefasst legt die Leckleitfähigkeit in thalamokortikalen Schaltneuronen im Bereich des Membranruhepotenzials und bei positiveren Membranpotenzialen (\sim -30 mV) eine deutliche Beteiligung von TASK- und Kir-Kanälen nahe. Eine TTXsensitive Stromkomponente, die bei Membranpotenzialen etwas oberhalb des Ruhepotenzials aktiviert und wahrscheinlich den persistierenden Na⁺-Strom darstellt [98], eine den H-Strom repräsentierende ZD7288-sensitive Komponente [3, 62] und eine TEA-/4-AP-sensitive Stromkomponente durch verzögerte Gleichrichterkanäle [11, 40] bzw. langsame A-Typ K⁺-Kanäle [65] tragen ebenfalls signifikante Anteile zur Leckleitfähigkeit bei.

4.3 Beteiligung verschiedener TASK-Kanal Subtypen

TASK1- und TASK3-Kanäle bilden zusammen mit den wahrscheinlich nicht funktionell exprimierten TASK5-Kanälen eine Untergruppe der K₂P-Familie, die eine hohe strukturelle Verwandschaft zeigen und durch extrazelluläre pH-Wert Erniedrigung blockiert werden. Zusätzlich konnte eine weitere Untergruppe bestehend aus TASK2, TASK4 (TALK1) und TALK2 aufgrund ihrer Sequenzhomologien definiert werden. Diese Kanalgruppe zeichnet sich durch eine Aktivierung in alkalischeren Bereichen aus [33, 49, 57]. Die Expression der Kanäle TASK1 und TASK3 konnte durch die PCR-Technik im dCGL nachgewiesen werden, jedoch nicht für TASK5. Diese Daten stimmen mit der Literatur überein, da gezeigt werden konnte, dass TASK3 die dominant exprimierte Untereinheit in thalamischen Schaltneuronen ist, während die Expression von TASK5 mit zentralen auditorischen Schaltkreisen assoziiert zu sein scheint [49, 124]. Die in der Literatur beschriebene niedrige Expression von TASK2 im Gehirn stimmt mit den in der vorgelegten Arbeit nur schwach detektierbaren PCR-Signalen überein. Da die Expression von TASK4-Kanälen nicht nachgewiesen wurde, diese jedoch eine Sensitivität gegenüber Bupivacain und pH-Wert Erniedrigungen zeigen, kann ein Beitrag dieser Leitfähigkeit (und anderen Mitgliedern der TALK-Kanalfamilie) am Leckstrom thalamischer Zellen nicht ausgeschlossen werden. Dennoch lassen an Oozyten erhobene Daten zur pH-Abhängigkeit von TASK4 [19] einen Beitrag zum Leckstrom unter den beschriebenen Ableitbedingung als unwahrscheinlich erscheinen. Zusammengefasst scheinen TASK1 und TASK3 den wesentlichen Anteil der pH-abhängigen K⁺-Leitfähigkeit in thalamischen Schaltneuronen zu tragen, wobei eine Beteiligung von zusätzlichen Säure-sensitiven K^+ -Kanälen (acidsensing ion channels; ASIC) aufgrund der vorgelegten Daten nicht ausgeschlossen werden kann [35].

4.4 Halothan und mACh-Rezeptor vermittelte Effekte

Die Aktivierung von mACh-Rezeptoren in thalamokortikalen Neuronen führt zur Blockade eines auswärts- und einwärts-gleichrichtenden K^+ -Stroms [67]. Die Beobachtung, dass Bupivacain, sowie die Erniedrigung des extrazellulären pH-Werts zu einer deutlichen Blockade der Muskarin-vermittelten Effekte auf den auswärtsgleichrichtenden Stromanteil führen, während die einwärts-gleichrichtende Komponente weitestgehend unbeeinflusst bleibt, deutet auf eine TASK-Kanal vermittelte auswärts-gleichrichtende Stromkomponente hin. Darüber hinaus führt die Applikation des systemischen Inhalationsnarkotikums Halothan zu einer deutlichen Zunahme der auswärts-gleichrichtenden Stromkomponente. Das Umkehrpotenzial der Halothansensitiven Komponente liegt positiver als das erwartete K⁺-Gleichgewichtspotenzial, was auf eine Beteiligung von weiteren Ionenkanälen hinweist. Mögliche Kandidaten dafür sind Ca²⁺-und Na⁺-Leitfähigkeiten, da die Halothan-sensitive Stromkomponente eine deutliche Auswärtsgleichrichtung und ein Umkehrpotenzial nahe dem erwarteten K⁺-Gleichgewichtspotenzial zeigt (unter den gewählten Ableitbedingungen, die Na⁺- und Ca²⁺-Ströme minimieren; siehe auch Material und Methoden). Darüber hinaus wird der verbleibende Strom durch eine pH-Wert Erniedrigung blockiert, was auf TASK-Kanäle hinweist. Die Steigerung einer K⁺-Leitfähigkeit [107, 108] und die Verminderung postsynaptischer Potenziale in thalamischen Zellen durch Halothan sind in der Literatur beschrieben [121]. Auch in diesen Studien wich das Umkehrpotenzial der Halothan-sensitiven Komponte vom erwarteten Umkehrpotenzial einer reinen K^+ -Leitfähigkeit ab und wurde durch Beiträge von anderen Ionen zu einem positiveren Potenzial hin verschoben [108].

4.5 Mögliche funktionelle Implikationen der TASK-Kanal Modulation

Der Wechsel zwischen Perioden synchronisierter Aktivität im Elektroenzephalogramm (EEG), z.B. in verschiedenen Schlafphasen, und desynchronisierten EEG-Mustern bei Wachheit ist mit der tonischen Depolarisation thalamokortikaler Neurone verbunden [112, 117]. Die Aufhebung der oszillatorischen Aktivität zugunsten des tonischen Feuerverhaltens in thalamischen Zellen erlaubt den nahezu frequenzgetreuen Transfer synaptischer Signale zum Kortex. Dabei wirken Eingänge des oberen Hirnstamms am Wechsel der Aktivitätsmodi modulierend mit (z.B. cholinerge Fasern aus dem Tegmentum). Die Wirkung von freigesetztem ACh auf nikotinerge und muskarinerge ACh-Rezeptoren im CGL führt zu einer deutlichen Depolarisation und einem Wechsel von der oszillatorischen zur tonischen Generierung von Aktionspotenzialen in identifizierten X- und Y-Zellen [27, 71]. Die langsame über mACh Rezeptoren vermittelte Depolarisation wird durch die Abnahme einer K⁺-Leckleitfähigkeit in den Zellen bedingt. Die vorgelegte Arbeit liefert nun erstmals Befunde dafür, dass die angesprochene K⁺-Leckleitfähigkeit zu einem wesentlichen Anteil durch TASK1/TASK3-Kanäle vermittelt wird.

Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung derselben Kanäle (z.B. durch Halothan) zu einer Erhöhung der K⁺-Leckleitfähigkeit und damit zur Hyperpolarisation der thala-

mokortikalen Zellen. Diese Erniedrigung des Membranpotenzials ist mit dem Wechsel von tonischer zu oszillatorischer Aktionspotenzialgenerierung assoziiert. Im oszillatorischen Aktivitätsmodus ist die Verschaltung eingehender Signale zum Kortex nicht bzw. nur eingeschränkt möglich. Darüber hinaus resultiert die Zunahme der K⁺-Leckleitfähigkeit in einer Art Kurzschluss (*shunting effect*) der postsynaptischen Potenziale, der Na⁺/K⁺-Aktionspotenzialen und der niederschwelligen Ca²⁺-Potenziale [108, 121]. Dies führt zur Aufhebung des Transfers sensorischer und motorischer Aktivität, die als tonische oder oszillatorische Aktivität kodiert werden [29, 133], und damit zu Analgesie, Bewusstseinsverlust und Aufhebung motorischer Aktivität. Zusammengefasst kann man schlussfolgern, dass K⁺-Leitfähigkeiten der K₂P-Familie in thalamokortikalen Neuronen einen wichtigen Beitrag zu den durch Inhalationsanästhetika (z.B. Halothan) vermittelten klinischen Effekten leisten.

4.6 Effekte von divalenten Kationen und Spermin in thalamischen Schaltneuronen

TASK3-Kanäle werden in verschiedenen Neuronentypen des ZNS exprimiert [124] und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der neuronalen Erregbarkeit. Konsistent mit Ergebnissen aus Ganzzellableitungen in heterologen Expressionssystemen [88] zeigten auch thalamische Zellen eine Komponente des anhaltenden Auswärtsstroms, die sensitiv gegenüber extrazellulären, divalenten Kationen reagiert. Diese Komponente war nach pH-Wert Erniedrigung deutlich kleiner, da bei pH 6,0 der größte Anteil an TASK3-Kanälen bereits inhibiert vorliegt. Der verbleibende divalente Kationen-sensitive Einwärtsstrom wird möglicherweise durch einwärts-gleichrichtende K⁺-Kanäle vermittelt, wobei der Mg²⁺-regulierte Kir2.1 Subtyp eine interessante Zielstruktur darstellen könnte [87]. In Abwesenheit von extrazellulären, divalenten Kationen blockiert Spermin Konzentrations-abhängig einen Teil des stehenden Auswärtsstroms. Die Spermin-sensitive Komponente zeigt dabei eine mit dem divalente Kationen-abhängigen Strom vergleichbare Spannungsabhängigkeit. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Spermin TASK3 und einwärts-gleichrichtende K⁺-Ströme blockieren kann. Bei positiveren Membranpotenzialen (-30 bis + 30 mV) sollten die Spermineffekte ähnlich der pH-Wirkung primär auf die Modulation von TASK-Kanälen projiziert werden, da die Kanäle der stark gleichrichtenden Kir2 Subfamilie geschlossen sind. Die Spermin- und divalente Kationen- Abhängigkeit wurde in der vorgelegten Arbeit benutzt, um Aussagen über die relativen Beiträge der Kanäle TASK1 und TASK3 am IK_{SO} treffen zu können. Da der Leckstrom durch Mg²⁺-Ionen um ~ 18% bzw. durch Spermin (500 $\mu\mathrm{M})$ um $\sim 24\%$ blockiert wurde, kann man schlussfolgern, dass circa 20% des IK_{SO} durch TASK3-Kanäle vermittelt wird.

Die Frage nach der funktionellen Relevanz von extrazellulären Polyaminen als Modulatoren von Ionenkanälen wurde in einigen Arbeiten untersucht [22, 120]. Dabei wurde die zytosolische Konzentration von Spermin in einer Größenordnung von 10 - 50 μ M vorgeschlagen [4, 136, 137]. Der Spermingehalt in synaptischen Vesikeln wurde mit 2 mM bestimmt [64]. In Neuronen und Gliazellen konnte eine Transporter-vermittelter Aufnahme sowie eine Spannungs-abhängige und Rezeptor-mediierte Sperminfreisetzung nachgewiesen werden [28, 64]. Durch repetitives Entladungsverhalten von Neuronen und bei zerebralen Ischämien können Sperminkonzentrationen im synaptischen Spalt erreicht werden, die ausreichen, um neuronale Ionenkanäle zu modulieren [20, 64, 90, 99, 127]. Zusammengefasst zeigen die erhobenen Daten, dass Spermin den Auswärtsstrom durch TASK3-Kanäle blockieren kann. Die daraus resultierende Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit könnte somit zu den beschriebenen neuromodulatorischen Effekten des Spermins beitragen. Da TASK-Kanäle eine breite Expression in verschiedenen Gebieten des ZNS zeigen [50, 124], könnte es sich dabei um ein generelles Prinzip handeln.

4.7 Interaktion I_h und I_{TASK}: pH-sensitive Membranströme in thalamischen Neuronen

Die Namensgebung der TASK-Kanäle (*Twik-related acid sensitive* K^+ -channels) beruht unter anderem auf ihrer charakteristischen Abhängigkeit gegenüber des extrazellulären pH-Werts [25, 51, 106]. Im Einklang mit der nachgewiesenen Expression der TASK-Kanal Isoformen 1 und 3 [77] zeigen thalamische Schaltneurone als Antwort auf Rampenprotokolle (-30mV auf -120mV über 800 ms) eine pH-sensitive Stromantwort, welche die typischen Charakteristika eines TASK-Kanal vermittelten Stroms offenbart. Dennoch weicht das ermittelte Umkehrpotenzial von dem eines reinen K⁺-Stroms ab. Darüber hinaus führt die Blockierung der Kanäle durch extrazelluläre H⁺-Ionen im Gegensatz zur Hemmung des Stromes durch Bupivakain oder Muskarin nicht zu einer deutlichen Depolarisation des Membranruhepotenzials der Zellen [77]. Erst nach Blockade des H-Stroms (I_h) durch ZD7288 zeigt der pH-sensitive Rampenstrom ein Umkehrpotenzial nahe dem erwarteten K⁺-Gleichgewichtspotenzial und wird von einer deutlichen Depolarisation des Membranruhepotenzials begleitet. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sowohl HCN- als auch TASK-Kanäle einen Beitrag zur pH-sensitiven Stromkomponente in thalamokortikalen Schaltneuronen liefern. Dabei ist der pH-Sensor der TASK-Kanäle im äußeren Anteil der Kanalpore lokalisiert [106], während sich der pH-Sensor der HCN-Kanäle im Bereich des zytoplasmatischen Anteils der S4-S5 Region des Kanals befindet [139]. Daher ist die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Modulation der HCN-Kanäle durch extrazelluläre Protonen auf den ersten Blick überraschend. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die Beobachtung, dass der intrazelluläre pH-Wert thalamischer Neurone mit einem langsameren Zeitverlauf und einer niedrigeren Amplitude dem extrazellulären pH-Wert folgt [86]. Somit könnte das direkte Schliessen von TASK-Kanälen durch extrazelluläre H⁺-Ionen mit einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des I_h zu hyperpolarisierteren Werten durch die folgende intrazelluläre pH-Wert Änderung verbunden sein. In der Summe könnten sich die beiden gegenregulierenden Effekte kompensieren, wodurch die marginalen Veränderungen des Membranpotenzials erklärt werden könnten. Eine weitere, vom intrazellulären pH-Wert unabhängige, Erklärung wäre das spannungsabhängige Schliessen von HCN-Kanälen als Konsequenz aus der depolarisierenden Wirkung der TASK-Kanal Inhibition. Das Spannungs-abhängige Szenario wäre damit vergleichbar mit dem Verschluss des H-Stroms im Kontext der intrinsischen Delta-Oszillationen von thalamokortikalen Schaltneuronen, in dem die Aktivierung des Ca^{2+} -Stroms I_T zu einer Depolarisation der Zellmembran führt und als Konsequenz die De-Aktivierung des I_h bedingt [70]. Beide Erklärungen begründen die geringe Depolarisation des Membranpotenzials nach extrazellulärer pH-Wert Erniedrigung. Der Zeitverlauf der Änderungen des Membranpotenzials pH-sensitiver Rampenströme, wie sie in einigen Messungen beobachtet wurden, lässt als Ursache die konsekutive intrazelluläre pH-Wert Anderung jedoch geeigneter erscheinen. Zusätzlich konnte die positive Verschiebung in der I_h Aktivierung durch extrazelluläre Ansäuerung auch durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [63, 119].

Die Größenordnung der Reduktion des I_h konnte für eine intrazelluläre pH-Wert Verschiebung um 0,8 Einheiten mit circa 25% bestimmt werden [86]. Daher wurde dieser Wert in das beschriebene Computermodel eines thalamokortikalen Schaltneurons implementiert, um die pH-Effekte auf den H-Strom in Zellen der Ratten simulieren zu können. Anhand von Arbeiten an geklonten TASK-Kanälen ist bekannt, dass bei einem pH-Wert von 6.4 die Inhibition von TASK3 circa 75% beträgt, während TASK1-Kanäle bei den gleichen Werten um circa 95% blockiert werden [51, 56, 100]. Darüber hinaus zeigen aus TASK1 und TASK3 bestehende sogenannte Tandem-Kanäle intermediäre pH-Abhängigkeiten [17]. Obwohl nicht nachgewiesen ist, inwieweit die in heterologen Expressionssystemen gewonnenen Daten auf native Zellen übertragbar sind, wurde für das thalamische Zellmodell eine Reduktion des TASK-Stroms durch pH-Wert Erniedrigung von 90% angenommen. Dabei ist dieser Wert gegebenenfalls etwas zu hoch angesetzt. Da extrazelluläre pH-Wert Veränderungen eine Reihe von Membranrezeptoren und Ionenkanälen beeinflussen, kann ein zusätzlicher Beitrag anderer Ionenleitfähigkeiten an der pH-sensitiven Komponente nicht ausgeschlossen werden. Dies trifft besonders für T-Typ Ca²⁺-Kanäle zu, die durch extrazelluläre Protonen inhibiert werden und bei Membranpotenzialen um -60 mV einen "steady-state window current" generieren [39, 111, 134]. Zudem muss man bedenken, dass das Umkehrpotenzial der pH-sensitiven Komponente in der Anwesenheit von ZD7288 dem eines reinen K⁺-Stroms entspricht und somit die Beteiligung weiterer Leitfähigkeiten unwahrscheinlich macht.

Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass TASK- und HCN-Kanäle zur pHsensitiven Stromkomponente in thalamischen Nervenzellen beitragen. Die fein regulierte Interaktion beider Kanäle trägt entscheidend zur Stabilisierung des Membranpotenzials bei. Die Kombination aus extrazellulärer pH-Erniedrigung mit und ohne ZD7288 schließt einen wesentlichen Beitrag durch andere Leitfähigkeiten weitestgehend aus.

4.8 Interaktion I_{TASK} und I_h: Funktionelle Bedeutung

Der dorsale Thalamus spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Informationsverarbeitung und -weiterleitung von sensorischen Informationen aus der Peripherie zu den primären sensorischen, kortikalen Arealen und ist in die Entstehung und Aufrechterhaltung thalamokortikaler Oszillationen bei verschiedenen Bewusstseinsstadien, sowie im Kontext der Absence Epilepsie involviert (siehe auch Einleitung; [117]). Dabei können Neurotransmitter des aufsteigenden Hirnstamms wie etwa Noradrenalin, Serotonin und Acetylcholin die thalamokortikalen Neurone depolarisieren [66]. Während Noradrenalin diese Wirkung über die konvergente Modulation des K⁺-Lecks (Schliessen von I_{K-Leck}) und des I_h (z.B. depolarisierender Shift der Aktivierung) erreicht, wird die depolarisierende Wirkung von Acetylcholin auf thalamische Neurone durch die Inhibition von TASK- und Kir-Kanälen vermittelt [77]. Diese Depolarisation ist für den Wechsel zwischen der Schlaf-assoziierten rhythmisch-oszillatorischen Aktivität der Zellen und der tonischen Generierung von Aktionspotenzialen im Kontext von Wachheit verantwortlich. Der wesentliche, neurochemische Unterschied innerhalb dieses Szenarios ist die unterschiedliche Menge an Monoaminen im Gehirn zwischen Stadien der Wachheit und des REM-Schlafs [46]. Während in Phasen der Wachheit cholinerge, serotonerge und adrenerge Hirnstammneurone aktiv sind, sind in Phasen des REM-Schlafs "nur" cholinerge Neurone aktiv. Die Unterschiede in den beschriebenen Transmittersystemen und die damit verbundene, unterschiedliche Modulation von HCN- und TASK-Kanälen könnte zu den verschiedenen Bewusstseinszuständen während Wachheit und in Stadien des REM-Schlafs beitragen. Die funktionelle Relevanz der miteinander verbundenen Modulation von HCN- und TASK-Kanälen konnte in einer weiteren Region aufgeklärt werden: im Hirnstamm depolarisiert Serotonin Hypoglossusmotorneurone durch Inhibition der TASK-Kanäle und gleichzeitiger Verschiebung der Aktivierung des I_h in Richtung depolarisierterer Membranpotenziale [116]. Diese Regulation hat eine zu der des systemischen Inhalationsnarkotikums Halothan entgegengesetzte Wirkung. Halothan hyperpolarisiert Motoneurone durch die Aktivierung von TASK-Kanälen und verschiebt zeitgleich die Aktivierung des I_h zu hyperpolarisierteren Membranpotenzialen. Ähnliche Effekte wurden auch in thalamischen Zellen beschrieben, in denen Halothan ebenfalls eine hyperpolarisierende Wirkung auf das Membranpotenzial durch das Schliessen von TASK-Kanälen vermittelt; wobei die Effekte des Inhalationsnarkotikums auf HCN Kanäle im Thalamus bis heute nicht beschrieben wurden [77, 107, 108]. Diese Befunde zeigen im Kontext der TASK- und HCN-Kanal Interaktion eine hohe Ahnlichkeit zwischen Neuronen des Hirnstamms und thalamischen Schaltneuronen.

Zusammengefasst könnte man - unter Berücksichtigung der weit verbreiteten Expression beider Kanäle im ZNS [82, 124] - die funktionell entgegengesetzte Modulation von TASK- und HCN-Kanälen bezüglich Membranruhepotenzial, sowie ihre miteinander verbundene Modulation durch Hirnstammtransmitter, als generelles Phänomen neuronaler Zellen postulieren. Dieser Zusammenhang wird noch weiter durch Arbeiten unterstützt, in denen die Wirkung von Adenosin, einer potentiell Schlaf-induzierenden Substanz [105], durch Aktivierung eines K⁺-Leckstroms bei zeitgleicher Verschiebung der I_h Aktivierung zu hyperpolarisierteren Membranpotenzialen mit der Entstehung von oszillatorischer Aktivität in thalmischen Zellen korreliert werden konnte [91].

4.9 Pathophysiologische Implikationen

Phasen epileptischer Aktivität und zerebraler Ischämie im ZNS sind mit einer Reduktion der extrazellulären Ca²⁺-Ionenkonzentration, sowie zu einer Erniedrigung des pH-Werts [114, 115] verbunden. Dabei kann der extrazelluläre pH-Wert im ischämischen Areal unter normoglykämischen Bedingungen unter 6,5 absinken und unter hypoglykämischen Konditionen sogar auf 6,0 abfallen. Obwohl der Zeitverlauf zwischen verschiedenen Hirnregionen stark variieren kann, führt die neuronale Aktivität zunächst zu einer transienten, extrazellulären Alkalisierung, die dann wiederum von einer persistierenden, extrazellulären Azidose abgelöst wird [13]. Im dCGL führt die synchronisierte afferente Aktivierung, die tonische Generierung von Aktionspotenzialen und die rhythmische, oszillatorische Aktivität ebenfalls zu einer Zunahme der extra- und intrazellulären H⁺-Ionen Konzentration [125, 126]. Neurone des ZNS zeigen z.T. extreme Unterschiede in ihrer Sensibilität gegenüber ischämischen Bedingungen, wobei die Gründe für diese differente Vulnerabilität weitestgehend unbekannt sind. Die Neurone reagieren auf ischämische Bedingungen mit langen und massiven Depolarisationen des Membranpotenzials und nachfolgender zellulärer Schädigungen. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Interaktion und Modulation von TASK- und HCN-Kanälen kann gefolgert werden, dass thalamische Zellen ischämische Insulte mit einer nur geringen Depolarisation beantworten. Dennoch muss klar herausgestellt werden, dass andere Einfüsse die Reaktion thalamischer Zellen gegenüber akuter Hypoxie dominieren. So führt die erhöhte Freisetzung von Monoaminen und Stickoxid zu einer starken Modulation des I_h im Sinne einer Depolarisation und damit zu Veränderungen der synaptischen Potenziale was wiederum mit einer veränderten Funktionsweise der thalamokortikalen Zellen einhergeht [26, 94]. Zusammenfassend führen die gegenregulierenden Effekte von TASK- und HCN-Kanälen zu einer effektiven Regulation des Membranruhepotenzials und könnten eine Basis für eine reduzierte Vulnerabilität von thalamischen Neuronen während neuronaler Exzitation und bei Ischämien darstellen.
Darüber hinaus zeigen neuere Studien eine schnelle und reversible Modulation von Mitgliedern der K₂P im Kontext ischämischer Bedingungen, welche mit Hypoxie und einer pH-Wert Erniedrigung verbunden sind [114]. Beispielsweise scheint die Inhibition der K₂P-Kanäle TASK1 und TREK1 zur Hypoxie-bedingten Depolarisation in verschiedenen Zellen beizutragen [81, 103]. Neuroprotektive Effekte im Zusammenhang mit zerebralen Insulten konnten ebenfalls für TASK3-Kanäle gezeigt werden [60]. Aus diesem Zusammenhang könnte man folgern, dass eine TASK knock out Maus durch den Verlust dieser neuroprotektiven Eigenschaften gegenüber ischämischen Ereignissen mit einem depolarisierteren Membranpotenzial anworten müsste, größere Infarkte ausbilden würde bzw. verstärkte neurotoxische Zellschäden aufweisen könnte [75]. Dennoch erscheint die Situation komplexer, da die Größe des K⁺-Auswärtsstroms in kultivierten zerebellären Granularzellen, welcher in diesen Neuronen durch TASK1, TASK2 und TASK3 getragen wird, mit dem verstärkten Auftreten von Apoptose korreliert werden konnte [54]. In den frühen Phasen der Apoptose scheint es dabei zu einem massiven K⁺-Ausstrom zu kommen, der wiederum konsekutiv zu einer Abnahme der intrazellulären K⁺-Konzentration führt und mit einem Schrumpfen der Zellen vergesellschaftet ist [138]. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Befunden aus TASK1-defizienten Tieren. Der dort beschriebene vergrößerte IK_{SO} in thalamokortikalen Neuronen in für Ischämien relevanten pH-Bereichen (pH 6.0 - 6.5) könnte eine Zunahme apoptotischer Vorgänge und einen vermehrten Zelluntergang bedingen. Zudem konnte eine durch verstärkte Expression des TASK3-Kanals bedingte zelluläre Transformation im Sinne einer uneingeschränkten Proliferation in verschieden humanen Tumorentitäten nachgewisen werden [102].

Zusammenfassend sollten in der Bewertung dieser zum Teil inkonsistenten Ergebnisse die folgenden Aspekte berücksichtigt werden: (1) die Befunde aus verschiedenen experimentellen Modelsystemen müssen mit Vorsicht eingeordnet werden, da die Expression verschiedener K₂P-Isoformen einer Altersabhängigkeit unterliegt [48]. (2) Unter ischämischen Bedingungen treten zum Teil drastische Veränderungen der K⁺-Homöostase auf, die von einer *spreading depression* begleitet werden und zu intrazellulären K⁺-Werten um 80 mM führen können [5, 55]. Unter diesen Extrembedingungen können sich die elementaren elektrophysiologischen Eigenschaften von TASK-Kanälen ändern oder verloren gehen (z.B. die charakteristische Auswärtsgleichrichtung) und K⁺-Ionen in beide Richtungen über die Membran fließen [25, 51]. (3) Die Ausbildung von Heterodimeren kann die Eigenschaften von TASK-Strömen alterieren. Deshalb sind weitere Arbeiten zu den durch Ischämie verursachten Effekten auf TASK-Kanäle z.B. in TASK^{-/-} Mäusen *in vivo* notwendig, um die komplexen Verbindungen zwischen K⁺-Homöostase, TASK-Kanälen und Zelluntergang bzw. Neuroprotektion weiter zu entschlüsseln.

4.10 Zusammenfassendes Modell zur Funktion und Modulation der thalamischen Leckleitfähigkeit: ein Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mechanismen der Modulation und die funktionelle Relevanz von K⁺-Leckleitfähigkeiten der K₂P-Familie an thalamischen Schaltneuronen im Hirnschnittpräparat untersucht.

Innerhalb der seit lange bekannten funktionellen Achse, bestehend aus Hirnstamm, Thalamus und Kortex [84], spielen die Hirnstammtransmitter Serotonin, Acetylcholin und Noradrenalin eine wichtige Rolle für das Membranpotenzial und somit auch für den vorherrschenden Aktivitätsmodus thalamischer Schaltneurone. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Muskarineffekt deutlich auf TASK-Kanäle auswirkt [77]; siehe Abb. 4.1). Weitere Arbeiten aus unserer Gruppe konnten darüber hinaus Hinweise dafür liefern, dass dies auch für Serotonin anzunehmen ist bzw. dass diese Effekte über Gq11-Proteine vermittelt werden [132]).

Auf Kanalebene konnte gezeigt werden, dass die K₂P Kanäle TASK1 und TASK3 durch extrazelluläre pH-Wert Erniedrigung, Muskarin, das Lokalanästhetikum Bupivacain und Ba²⁺ blockiert werden, während das Inhalationsnarkotikum Halothan zu einer Vergrößerung der Stromamplitude führt [77]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass TASK3 Kanäle spezifisch durch Spermin blockiert bzw. durch divalente Kationen-freie extrazelluläre Lösungen geöffnet werden können [88]. Zusätzlich konnte in einer TASK1^{-/-} Maus die spezifische Inhibition von TASK1 durch das endogene Cannabinoid Anandamid aufgezeigt werden [75]. Damit ergibt sich für TASK-Kanäle ein einzigartiges, pharmakologisches Profil.

Die Aufklärung der intrazellulären Regulation der Kanäle stellt eine interessante Aufgabe dar, da diese bis heute nicht vollständig verstanden ist. Für TASK1-Kanäle konnte eine Beteiligung der Phospholipase C im Expressionssystem nachgewiesen werden. Dabei scheinen die stromabwärts gelegenen Stoffwechselprodukte Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) für die Inhibiton des Stroms keine Rolle zu spielen [18]. Vielmehr scheint die Konzentration an Phosphatidylinositol-4,5-biphosphonat (PIP2), ähnlich der bereits für KCNK Kanäle (M-Strom) gezeigten Effekte, für die Regulation verantwortlich zu sein.

Der funktionelle Aspekt der TASK-Kanal Expression und Modulation ist in der hohen Relevanz der K⁺-Leckleitfähigkeiten für das Membranruhepotenzial der thalamischen Neurone begründet. Dabei scheint eine fein regulierte Interaktion zwischen TASK- und HCN-Kanälen stabilisierend auf das Membranpotenzial einzuwirken und massgeblich die Aufrechterhaltung bzw. den Wechsel in den beschriebenen thalamischen Funktionszuständen zu beeinflussen [79]. Diese Interaktion konnte auch für Hypoglossusmotoneurone gezeigt werden [116]. Als Ausblick zu den in der vorgelegten Arbeit erhobenen Daten muss klar gesagt werden, dass eine Reihe von physiologischen Aspekten zu K_2P bis heute nicht vollständig verstanden sind, obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Publikationen zu dieser Kanalfamilie veröffentlicht wurden. Beispiele hierfür sind die intrazelluläre Regulation, die subzelluläre Expression oder die Zelltyp-spezifische Funktion (Schaltversus Interneuron) der Kanäle. Die vorgelegte Arbeit liefert jedoch eine umfassende Charakterisierung der Kanalexpression und -funktion in thalamischen Zellen und könnte so die Grundlage für weitere Arbeiten bieten. Darüber hinaus wächst das Interesse K_2P im Kontext pathophysiologischer Situationen (neuronaler Apoptose, Epilepsie, zerebraler Ischämie) zu untersuchen.



Abb. 4.1 Zusammenfassendes Modell zur Funktion und Modulation von K⁺-Leckleitfähigkeiten der K₂P-Familie in thalamischen Schaltneuronen. Die Funktion thalamischer Zellen wird massgeblich durch die gegenregulierende Interaktion von HCN- und TASK-Kanälen mit dem daraus resultierenden Einfluss auf das Membranpotential beeinflusst. Dabei werden TASK-Kanäle durch Halothan aktiviert bzw. Ba²⁺-Ionen und Acetylcholin (ACh) inhibiert, während extrazelluläre pH-Erniedrigungen TASK- und HCN-Kanäle blockiert (unterer Bildausschnitt). Diese Interaktion der Ionenkanäle kann durch Transmitter des aufsteigenden Hirnstammsystems (besonders ACh, Noradrenalin - NA) Gq11-vermittelt beeinflusst werden (oberer Bildausschnitt). Obwohl die intrazelluläre Regulation nicht vollständig geklärt ist, legen erste Ergebnise eine Mitbeteiligung der Phospholipase C (PLC β) nahe.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Der Prozess des Aufwachens ist im thalamokortikalen System mit einem Wechsel aus der oszillatorischen Aktivität hin zur tonischen Aktionspotenzialgenerierung verbunden. Dabei sind Transmitter des aufsteigenden, aktivierenden Hirnstammsystems (ARAS) in der Lage diesen Wechsel durch die Erniedrigung einer K⁺-Leckleitfähigkeit zu vermitteln, was in einer Depolarisation des Membranruhepotenzials resultiert. Bis heute wurde die molekulare Grundlage dieser Kanäle im Thalamus nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde in der vorgelegten Arbeit zunächst die Expression von TASK-Kanälen (*TWIK-related acid-sensitive* K^+ *channels*), welche an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Membranpotentials in verschiedenen Zellen des zentralen Nervensystems beteiligt sind, im dCGL näher charakterisiert. Dazu wurden verschiedene elektrophysiologische Techniken im Hirnschnittpräparat und auf Einzelzellen, PCR-Methoden, die in situ Hybridisierung, Immunzytochemie und ein Computermodell verwendet. Setzt man nun das Membranpotenzial der thalamischen Zellen auf einen Wert von -20 mV, so löst dieses Vorgehen einen persistierenden Auswärtsstrom von 200 - 400 pA aus, der wiederum durch die Erniedrigung des extrazellulären pH-Werts von 7,2 auf 6,4, die Applikation von ACh, Muskarin, dem Lokalanästhetikum Bupivacain, dem polyvalenten Amin Spermin oder Ba²⁺ blockiert werden kann. Umgekehrt kann der Auswärtsstrom durch das systemische Inhalationsnarkotikum Halothan oder das Entfernen der divalenten Kationen aus der extrazellulären Lösung signifikant vergrößert werden. Dieses pharmakologische Profil kann als typisch und einzigartig für TASK Kanäle gewertet werden. Die graphische Subtraktion von Rampenströmen vor und nach Applikation der Kanalmodulatoren erlaubt die Beurteilung der Pharmakon-sensitiven Ströme und zeigt die für TASK Kanäle typische Auswärtsgleichrichtung und ein Umkehrpotenzial nahe dem errechneten K⁺-Gleichgewichtspotenzial (-104 mV). RT-PCR Techniken, Antikörperfärbungen und die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zeigen die Expression der Kanäle TASK1 und TASK3 im dCGL und unterstützen damit die elektrophysiologischen Ergebnisse. Die funktionelle Bedeutung dieser Ergebnisse wurde mittels *current clamp* Ableitungen adressiert: die Applikation von Halothan führte zur Hyperpolarisation des Membranpotenzials von -60 auf -70 mV und war mit einem Wechsel von der tonischen Aktionspotenzialgenerierung zur Salvenaktivität vergesellschaftet. Die In-

5 Zusammenfassung

hibition der TASK Kanäle durch die oben genannten Pharmaka (z.B. Bupivacain, Muskarin, pH Erniedrigung) resultierte in der Verschiebung der Aktivität von dem oszillatorischen Feuerverhalten hin zur tonischen Aktionspotenzialgenerierung und war von einer Membrandepolarisation begleitet. Zusammengefasst bewertet zeigen diese Daten, dass verschiedene TASK Kanäle, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Membranpotenzials in Neuronen des dCGL beteiligt sind, zur Vermittlung der Anästhesie *in vivo* beitragen könnten.

Der zweite Teil der vorgelegten Arbeit beschäftigt sich mit der Interaktion von TASK und HCN Kanälen, die den Hyperpolarisations-aktivierten, durch zyklische Nukleotide regulierten Strom I_h vermitteln. Alle bekannten Schrittmacherkanäle dieser Familie (HCN1-4) werden im dCGL exprimiert. Die Koexpression der wichtigsten Isoformen TASK3 und HCN2 konnte in Parvalbumin-positiven Schaltneuronen in Kulturen des dorsalen Thalamus gezeigt werden. Die Stromkomponenten der HCN und TASK Kanäle tragen zum stehenden Auswärtsstrom der thalamokortikalen Schaltneurone sowie zur pH-sensitiven Stromkomponente (durch ein hyperpolarisierendes Rampenprotokoll ausgelöst) bei. Elektrophysiologische Messungen in der Stromklemme (*current clamp*) in Ratten, HCN2 defizienten Mäusen, sowie Modellierungstechniken in einem *single compartment* Modell zeigen den gegenregulierenden Effekt von HCN2und TASK3/TASK1-Kanälen. Diese Interaktion trägt massgeblich zur Aufrechterhaltung des Membranruhepotenzials der untersuchten Zellen bei und beeinflusst daher ebenfalls die Aktionspotenzialentstehung in thalamischen Zellen.

5.2 Englische Zusammenfassung - Summary

The process of waking up is associated with the shift from rhythmic burst activity to tonic action potential generation in many neurons of the thalamocortical system. Transmitters of the ascending brainstem system are capable of mediating this change by the reduction of leak K^+ channels, resulting in a depolarization of the resting membrane potential. Unfortunately, the molecular nature of these channels has not been analyzed in the thalamus until now. Therefore the expression of TWIK-related acid-sensitive K^+ (TASK) channels, which contribute to the setting of the membrane potential in different types of cells in the central nervous system, was probed in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) by combining whole cell patch-clamp recordings in brain slices and acutely-isolated cells, molecularbiological, immunocytochemical techniques and modelling procedures. Setting the membrane potential of thalamocortical relay neurons to a value of -20 mV induced a persistent outward current of 200 - 400 pA, which was significantly reduced by e.g. lowering the external pH from 7.2 to 6.4, application of ACh, muscarine, the local anaesthetic bupivacaine, the polyvalent cation spermine and Ba^{2+} . In addition, the steady state outward current was increased by bath application of the general anaesthetic halothane and removal of divalent cations from the extracellular solution, thereby completing the typical pharmacological and regulatory profile of TASK channels. Graphical substraction of ramp currents revealed blocker-sensitive currents with clear outward rectification and a reversal potential close to the expected K⁺ equilibrium potential (-104 mV). RT-PCR analysis, antibody staining, and *in situ* hybridization demonstrated the expression of TASK1 and TASK3 in dLGN, thereby further confirming the electrophysiological findings. The functional role of these findings was probed during current clamp recordings: application of halothane hyperpolarized the membrane potential from about -60 to -70 mV, an effect that was accompanied by a change in the firing pattern (from tonic single spike to burst activity). Inhibition of TASK channels due to the mentioned blockers (e.g. bupivacaine, muscarine, pH lowering) resulted in a shift from burst firing to tonic action potential generation, associated with a significant depolarization of the membrane potential. Taken together these data indicate that several TASK channel subtypes are involved in setting the membrane potential of dLGN relay neurons and contribute to the production of anesthesia *in vivo*.

In a second part the interaction of TASK channels and HCN channels mediating the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated current I_h was investigated. All known pacemaker channels (HCN1-4) are expressed in dLGN. The coexpression of the dominant isoforms, namely TASK3 and HCN2 to be existent in parvalbumin-positive relay neurons could be shown in cultured cells of the dorsal thalamus. Components carried by HCN and TASK channels contribute to the standing outward current of TC neurons and the pH-sensitive component elicited by hyperpolarizing ramp protocols. Current clamp recordings in rats, $HCN^{-/-}$ mice, and computer modeling studies demonstrate that the counterbalancing effects of HCN2 and TASK3 / TASK1 channels play a pivotal role in setting the resting membrane potential of TC neurons thereby influencing the activity mode of thalamic neurons.

6 Literaturverzeichnis

- [1] MI Aller, EL Veale, AM Linden, C Sandu, M Schwaninger, LJ Evans, ER Korpi, A Mathie, W Wisden, and Brickley SG. Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. J Neurosci, 25:11455–11467, 2005.
- [2] AP Berg, EM Talley, JP Manger, and DA Bayliss. Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K+ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. J Neurosci, 24:6693–6702, 2004.
- [3] RE BoSmith, I Briggs, and NC Sturgess. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (If) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. Br J Pharmacol, 110:343–349, 1993.
- [4] D Bowie and ML Mayer. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*, 15:453–462, 1995.
- [5] NM Branston, AJ Strong, and L Symon. Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow: Relationships during progressive ischemia in baboon cerebral cortex. J Neurol Sci, 32:305–321, 1977.
- [6] ME Brau, W Vogel, and G Hempelmann. Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na+ and K+ channels in peripheral nerve. Anesth Analg, 87:885–889, 1998.
- [7] DA Brown. Neurobiology: the acid test for resting potassium channels. Curr Biol, 10:R456-459, 2000.
- [8] KJ Buckler, BA Williams, and E Honore. An oxygen-, acid- and anestheticsensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. J Physiol, 525 Pt 1:135–142, 2000.
- [9] T Budde, G Biella, T Munsch, and HC Pape. Lack of regulation by intracellular Ca2+ of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic neurones. J Physiol (Lond), 503:79–85, 1997.

- [10] T Budde, L Caputi, T Kanyshkova, R Staak, C Abrahamczik, T Munsch, and HC Pape. Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. J Neurosci, 25:9871–9882, 2005.
- [11] T Budde, R Mager, and HC Pape. Different types of potassium outward current in relay neurons acutely isolated from the rat lateral geniculate nucleus. *Eur J Neurosci*, 4:708–722, 1992.
- [12] T Budde and JA White. The voltage-dependent conductances of rat neocortical layer I neurons. *Eur J Neurosci*, 10:2309–2321, 1998.
- [13] M Chesler and K Kaila. Modulation of pH by neuronal activity. Trends Neurosci, 15:396–402, 1992.
- [14] CE Clarke, EL Veale, PJ Green, HJ Meadows, and A Mathie. Selective block of human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, IKSO, by zinc. J Physiol, 2004.
- [15] WA Coetzee, Y Amarillo, J Chiu, A Chow, D Lau, T McCormack, H Moreno, MS Nadal, A Ozaita, D Pountney, M Saganich, E Vega-Saenz de Miera, and B Ruby. Molecular diversity of K+ channels. Ann N Y Acad Sci, 868:233–285, 1999.
- [16] G Czirjak and P Enyedi. Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. J Biol Chem, 277:5426–5432, 2002.
- [17] G Czirjak and P Enyedi. Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol Pharmacol*, 63:646–652, 2003.
- [18] G Czirjak, GL Petheo, A Spat, and P Enyedi. Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. Am J Physiol Cell Physiol, 281:C700–708, 2001.
- [19] N Decher, M Maier, W Dittrich, J Gassenhuber, A Bruggemann, AE Busch, and K Steinmeyer. Characterization of TASK-4, a novel member of ph-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett*, 492:84–89, 2001.
- [20] RJ Dempsey, MW Roy, DE Cowen, and DJ Combs. Polyamine inhibition preserves somatosensory evoked potential activity after transient cerebral ischemia. *Neurol Res*, 10:141–144, 1988.
- [21] M Deschenes, M Paradis, JP Roy, and M Steriade. Electrophysiology of neurons of lateral thalamic nuclei in cat: resting properties and burst discharges. J Neurophysiol, 51:1196–1219, 1984.

- [22] R Dingledine, K Borges, D Bowie, and SF Traynelis. The glutamate receptor ion channels. *Pharamcol Rev*, 51:7–61, 1999.
- [23] WJ Dixon and FJ Massey. Introduction to statistical analysis. McGraw Hill, New York, 1969.
- [24] HU Dodt and W Zieglgansberger. Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared dic-videomicroscopy. *Brain Res*, 537:333–336, 1990.
- [25] F Duprat, F Lesage, M Fink, R Reyes, C Heurteaux, and M Lazdunski. TASK, a human background K+ channel to sense external pH variations near physiological pH. *Embo J*, 16:5464–5471, 1997.
- [26] G Erdemli and V Crunelli. Release of monoamines and nitric oxide is involved in the modulation of hyperpolarization-activated inward current during acute thalamic hypoxia. *Neuroscience*, 96:565–574, 2000.
- [27] UT Eysel, HC Pape, and R Van Schayck. Excitatory and differential disinhibitory actions of acetylcholine in the lateral geniculate nucleus of the cat. J Physiol, 370:233–254, 1986.
- [28] D Fage, C Voltz, B Scatton, and C Carter. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. J Neurochem, 58:2170–2175, 1992.
- [29] EE Fanselow, K Sameshma, LA Baccala, and MA Nicolelis. Thalamic bursting in rats during different awake behavioral states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:15330–15335, 2001.
- [30] PL Gabbott, J Somogyi, Stewart MG, and J Hamori. GABA-immunoreactive neurons in the rat dorsal lateral geniculate nucleus: light microscopical observations. *Brain Res*, 346:171–175, 1985.
- [31] PL Gabbott, J Somogyi, MG Stewart, and J Hamori. Gaba-immunoreactive neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: characterisation by combined golgi-impregnation and immunocytochemistry. *Exp Brain Res*, 61:311–322, 1986.
- [32] PL Gabbott, J Somogyi, MG Stewart, and J Hamori. A quantitative investigation of the neuronal composition of the rat dorsal lateral geniculate nucleus using gaba-immunocytochemistry. *Neuroscience*, 19:101–111, 1986.
- [33] SA Goldstein, D Bockenhauer, I O'Kelly, and N Zilberberg. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*, 2:175–184, 2001.

- [34] OP Hamill, A Marty, E Neher, B Sakmann, and FJ Sigworth. Improved patchclamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391:85–100, 1981.
- [35] J Han, J Truell, C Gnatenco, and D Kim. Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. J Physiol, 542:431–444, 2002.
- [36] A Hernandez-Cruz and HC Pape. Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus. J Neurophysiol, 61:1270–1283, 1989.
- [37] B Hille. Ionic channels of excitable membranes. *Sinauer*, 2001.
- [38] ML Hines and NT Carnevale. The NEURON simulation environment. Neural Comput, 9:1179–1209, 1997.
- [39] SW Hughes, DW Cope, TI Toth, SR Williams, and V Crunelli. All thalamocortical neurones possess a T-type Ca2+ 'window' current that enables the expression of bistability-mediated activities. J Physiol, 517 (Pt 3):805–815, 1999.
- [40] JR Huguenard, DA Coulter, and DA Prince. A fast transient potassium current in thalamic relay neurons: kinetics of activation and inactivation. J Neurophysiol, 66:1304–1315, 1991.
- [41] JR Huguenard and DA McCormick. Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamocortical relay neurons. J Neurophysiol, 68:1373– 1383, 1992.
- [42] H Jahnsen and R Llinas. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. J Physiol, 349:205–226, 1984.
- [43] H Jahnsen and R Llinas. Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of the guinea-pig thalamic neurons in vitro. J Physiol, 349:227–247, 1984.
- [44] H Jahnsen and R Llinas. Voltage-dependent burst-to-tonic switching of thalamic cell activity: an in vitro study. Arch Ital Biol, 122:73–82, 1984.
- [45] EG Jones and SH Hendry. Differential calcium binding protein immunoreactivity distinguishes classes of relay neurons in monkey thalamic nuclei. Eur J Neurosci, 1:222–246, 1989.

- [46] D Kahn, EF Pace-Schott, and JA Hobson. Consciousness in waking and dreaming: the roles of neuronal oscillation and neuromodulation in determining similarities and differences. *Neuroscience*, 78:13–38, 1997.
- [47] D Kang, C Choe, and Kim D. Functional expression of TREK-2 in insulinsecreting MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 323:323–331, 2004.
- [48] AM Kanjhan, R Anselme, PG Noakes, and MC Bellingham. Postnatal changes in TASK-1 and TREK-1 expression in rat brain stem and cerebellum. *Neuro*report, 15:1321–1324, 2004.
- [49] A Karschin. K⁺-Kanäle mit zwei Porendomänen: funktionelle Bedeutung einer neuen Proteinfamilie im Nervensystem. *Neuroforum*, 2001.
- [50] C Karschin, E Wischmeyer, R Preisig-Muller, S Rajan, C Derst, KH Grzeschik, J Daut, and A Karschin. Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K+ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol Cell Neurosci*, 18:632–648, 2001.
- [51] Y Kim, H Bang, and D Kim. TASK-3, a new member of the tandem pore K+ channel family. J Biol Chem, 275:9340–9347, 2000.
- [52] CH Kindler, CS Yost, and AT Gray. Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiology*, 90:1092– 1102, 1999.
- [53] H Komai and TS McDowell. Local anesthetic inhibition voltage-activated potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Anesthesiology*, 94:1089–1095, 2001.
- [54] I Lauritzen, M Zanzouri, E Honore, F Duprat, MU Ehrengruber, M Lazdunski, and AJ Patel. K+ dependent cerebellar granule neuron apoptosis. role of task leak K+ channels. J Biol Chem, 278:32068–32076, 2003.
- [55] JA Leis, LK Bekar, and W Walz. Potassium homeostasis in the ischemic brain. Glia, 50:407–416, 2005.
- [56] D Leonoudakis, AT Gray, BD Winegar, CH Kindler, M Harada, DM Taylor, RA Chavez, JR Forsayeth, and CS Yost. An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. J Neurosci, 18:868–877, 1998.
- [57] F Lesage. Pharmacology of neuronal background potassium channels. Neuropharmacology, 44:1–7, 2003.

- [58] F Lesage and M Lazdunski. Molecular and functional properties of two-poredomain potassium channels. Am J Physiol Renal Physiol, 279:F793–801, 2000.
- [59] BG Liu, XL Zhuang, ST Li, GH Xu, SJ Brull, and JM Zhang. Effects of bupivacaine and ropivacaine on high-voltage-activated calcium currents of the dorsal horn neurons in newborn rats. *Anesthesiology*, 95:139–143, 2001.
- [60] C Liu, JF Cotten, JA Schuyler, CS Fahlman, JD Au, PE Bickler, and CS Yost. Protective effects of TASK-3 (KCNK9) and related 2P K channels during cellular stress. *Brain Res*, 1031:164–173, 2005.
- [61] A Ludwig, T Budde, J Stieber, S Moosmang, C Wahl, K Holthoff, A Langebartels, C Wotjak, T Munsch, X Zong, S Feil, R Feil, M Lancel, KR Chien, A Konnerth, HC Pape, M Biel, and F Hofmann. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo J*, 22:216– 224, 2003.
- [62] G Maccaferri and CJ McBain. The hyperpolarization-activated current (ih) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurones. J Physiol, 497:119–130, 1996.
- [63] AT Malcolm, DE Kourennyi, and S Barnes. Protons and calcium alter gating of the hyperpolarization-activated cation current (I(h)) in rod photoreceptors. *Biochim Biophys Acta*, 1609:183–192, 2003.
- [64] T Masuko, K Kusama-Eguchi, K Sakata, T Kusama, S Chaki, S Okuyama, K Williams, K Kashiwagi, and K Igarashi. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. J Neurochem, 84:610–617, 2003.
- [65] DA McCormick. Functional properties of a slowly inactivating potassium current in guinea pig dorsal lateral geniculate relay neurons. J Neurophysiol, 66:1176–1189, 1991.
- [66] DA McCormick. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol*, 39:337–388, 1992.
- [67] DA McCormick. Actions of acetylcholine in the cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog Neurobiol*, 39:337–388, 1993.
- [68] DA McCormick and JR Huguenard. A model of electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. J Neurophysiol, 68:1384–1400, 1992.
- [69] DA McCormick and HC Pape. Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. J Physiol, 431:319–342, 1990.

- [70] DA McCormick and HC Pape. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. J Physiol, 431:291–318, 1990.
- [71] DA McCormick and DA Prince. Actions of acetylcholine in the guinea-pig and cat medial and lateral geniculate nuclei, in vitro. J Physiol, 392:147–165, 1987.
- [72] DA McCormick and DA Prince. Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea pig and cat thalamic neurons, in vitro. J Neuophysiol, 59:978–996, 1988.
- [73] HJ Meadows and AD Randall. Functional characterisation of human task-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuropharmacology*, 40:551–559, 2001.
- [74] S Meuth, T Budde, and HC Pape. Differential control of high-voltage activated Ca2+ current components by a Ca2+ dependent inactivation mechanism in thalamic relay neurons. *Thalamus Relat Syst*, 1:31–38, 2001.
- [75] SG Meuth, MI Aller, T Munsch, T Schumacher, T Seidenbecher, P Meuth, C Kleinschnitz, HC Pape, H Wiendl, W Wisden, and T Budde. The contribution of TASK-1-containing channels to the function of dorsal lateral geniculate thalamocortical relay neurons. *Mol Pharmacol*, 69:1468–1476, 2006.
- [76] SG Meuth, T Budde, H Duyar, P Landgraf, T Broicher, M Elbs, R Brock, M Weller, R Weissert, and H Wiendl. Modulation of neuronal activity by the endogenous pentapeptide QYNAD. *Eur J Neurosci*, 18:2697–2706, 2003.
- [77] SG Meuth, T Budde, T Kanyshkova, T Broicher, T Munsch, and HC Pape. Contribution of TWIK-related acid-sensitive K+ channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons. J Neurosci, 23:6460–6469, 2003.
- [78] SG Meuth, T Kanyshkova, P Landgraf, HC Pape, and T Budde. Influence of Ca(2+)-binding proteins and the cytoskeleton on Ca(2+)-dependent inactivation of high-voltage activated Ca(2+) currents in thalamocortical relay neurons. *Pflugers Arch*, 450:111–122, 2005.
- [79] SG Meuth, T Kanyshkova, P Meuth, P Landgraf, T Munsch, A Ludwig, F Hofmann, HC Pape, and T Budde. The membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels. J Neurophysiol, Jun 7 2006.
- [80] SG Meuth, HC Pape, and T Budde. Modulation of Ca²⁺ currents in rat thalamocortical relay neurons by activity and phosphorylation. *Eur J Neurosci*, 15:1603–1614, 2002.

- [81] JA Millar, L Barratt, AP Southan, KM Page, RE Fyffe, B Robertson, and A Mathie. A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:3614–3618, 2000.
- [82] LM Monteggia, AJ Eisch, MD Tang, LK Kaczmarek, and Nestler EJ. Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cylcic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 81:129–139, 2000.
- [83] S Moosmang, M Biel, F Hofmann, and A Ludwig. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem*, 380:975–980, 1999.
- [84] G Moruzzi and HW Magoun. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. 1949. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 7:251–267, 1995.
- [85] T Munsch and HC Pape. Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. J Physiol, 519 Pt 2:493–504, 1999.
- [86] T Munsch and HC Pape. Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic relay neurons by acetazolamide. J Physiol (Lond), 519 Pt 2:505–514, 1999.
- [87] Y Murata, H Okado, Y Katsuyama, Y Okamura, and Y Kubo. Primary structure, developmental expression and functional properties of an inward rectifier K+ channel of the tunicate. *Receptors Channels*, 7:387–399, 2001.
- [88] B Musset, SG Meuth, GX Liu, C Derst, S Wegner, HC Pape, T Budde, R Preisig-Muller, and J Daut. Effect of divalent cations and spermine on the conductance of the K+ channel TASK3 and on the standing outward current in thalamocortical relay neurons. J Physiol, Mar 2, 2006.
- [89] E Neher. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. Methods Enzymol, 207:123–131, 1992.
- [90] ST Nevin, JL Haddrill, and JW Lynch. A pore-lining glutamic acid in the rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel controls external spermine block. *Neurosci Lett*, 296:163–167, 2000.
- [91] HC Pape. Adenosine promotes burst activity in guinea-pig geniculocortical neurones through two different ionic mechanisms. J Physiol, 447:729–753, 1992.
- [92] HC Pape. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. Annu Rev Physiol, 58:299–327, 1996.

- [93] HC Pape, T Budde, R Mager, and ZF Kisvarday. Prevention of Ca(2+)mediated action potentials in GABAergic local circuit neurones of rat thalamus by a transient K+ current. J Physiol (Lond), 478 (Pt 3):403–422, 1994.
- [94] HC Pape and R Mager. Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron*, 9:441–448, 1992.
- [95] HC Pape and DA McCormick. Electrophysiological and pharmacological properties of interneurons in the cat lateral geniculate nucleus. *Neuroscience*, 68:105–1125, 1994.
- [96] HC Pape, SG Meuth, T Seidenbecher, T Munsch, and T Budde. Der Thalamus: Das Tor zum Bewusstsein und Rhythmusgenerator im Gehirn. *Neuroforum*, S. 44-45, 2005.
- [97] JG Parnavelas, EJ Mounty, R Bradford, and AR Liebermann. The postnatal development of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: a Golgi study. J Comp Neurol, 171:481–499, 1977.
- [98] HR Parri and V Crunelli. Sodium current in rat and cat thalamocortical neurons: role of a non-inactivating component in tonic and burst firing. J Neurosci, 18:854–867, 1998.
- [99] W Paschen. Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. Mol Chem Neuropathol, 16:241–271, 1992.
- [100] AJ Patel and E Honore. Anesthetic-sensitive 2p domain k+ channels. Anesthesiology, 95:1013–1021, 2001.
- [101] AJ Patel, E Honore, F Lesage, M Fink, and M Romey, G Lazdunski. Inhalational anesthetics activate tow-pore-domain background k+ channels. *Nat Neurosci*, 2:422–426, 1999.
- [102] AJ Patel and M Lazdunski. The 2p-domain k+ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch*, 448:261–273, 2004.
- [103] LD Plant, PJ Kemp, C Peersm, Z Henderson, and HA Pearson. Hypoxic depolarization of cerebellar granule neurons by specific inhibition of TASK-1. Stroke, 33:2324–2328, 2002.
- [104] LD Plant, S Rajan, and SA Goldstein. K2p channels and their protein partners. Curr Opin Neurobiol, 15:326–333, 2005.
- [105] T Porkka-Heiskanen, RE Strecker, M Thakkar, AA Bjorkum, RW Greene, and RW McCarley. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*, 276:1265–1268, 1997.

- [106] S Rajan, E Wischmeyer, G Xin Liu, R Preisig-Muller, J Daut, A Karschin, and C Derst. TASK-3, a novel tandem pore-domain acid-sensitive K+ channel. An extracellular histiding as pH sensor. J Biol Chem, 275:16650–16657, 2000.
- [107] CR Ries and E Puil. Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons. J Neurophysiol, 81:1802–1809, 1999.
- [108] CR Ries and E Puil. Mechanism of anesthesia revealed by shunting actions of isoflurane on thalamocortical neurons. J Neurophysiol, 81:1795–1801, 1999.
- [109] RB Robinson and SA Siegelbaum. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. Annu Rev Physiol, 65:453–480, 2003.
- [110] JP Ruppersberg. Intracellular regulation of inward rectifier K+ channels. Pflugers Arch, 441:1–11, 2000.
- [111] MJ Shah, S Meis, T Munsch, and HC Pape. Modulation by extracellular pH of low- and high-voltage-activated calcium currents of rat thalamic relay neurons. *J Neurophysiol*, 85:1051–1058, 2001.
- [112] SM Sherman. Thalamic relay functions. Prog Brain Res, 134:51–69, 2001.
- [113] SM Sherman and RW Guillery. Functional organization of thalamocortical relays. J Neurophysiol, 76:1367–1395, 1996.
- [114] E Siemkowicz and AJ Hansen. Brain extracellular ion composition and eeg activity following 10 minutes ischemia in normo- and hyperglycemic rats. *Stroke*, 12:236–240, 1981.
- [115] RP Simon, N Benowitz, R Hedlund, and J Copeland. Influence of the bloodbrain pH gradient on brain phenobarbital uptake during status epilepticus. J Pharmacol Exp Ther, 234:830–835, 1985.
- [116] JE Sirois, C Lynch 3rd, and DA Bayliss. Convergent and reciprocal modulation of a leak K+ current and I(h) by an inhalational anaesthetic and neurotransmitters in rat brainstem motoneurones. J Physiol, 541:717–729, 2002.
- [117] M Steriade. Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cereb Cortex*, 7:583–604, 1997.
- [118] M Steriade and M Deschenes. The thalamus as a neuronal oscillator. Brain Res, 320:1–63, 1984.
- [119] DR Stevens, R Seifert, B Bufe, Muller F, E Kremmer, R Gauss, W Meyerhof, UB Kaupp, and B Lindemann. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Stroke*, 12:236–240, 2001.

- [120] K Stromgaard and I Mellor. AMPA receptor ligands: synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Med Res Rev*, 24:589–620, 2004.
- [121] K Sugiyama, T Muteki, and K Shimoji. Halothane-induced hyperpolarization and depression of postsynaptic potentials of guinea pig thalamic neurons in vitro. Brain Res, 576:97–103, 1992.
- [122] M Takenoshita and JH Steinbach. Halothane blocks low-voltage-activated calcium current in rat sensory neurons. J Neurosci, 11:1404–1412, 1991.
- [123] EM Talley, Q Lei, JE Sirois, and DA Bayliss. TASK-1, a two-pore domain K+ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron*, 25:399–410, 2000.
- [124] EM Talley, G Solorzano, Q Lei, D Kim, and DA Bayliss. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. J Neurosci, 21:7491–7505, 2001.
- [125] CK Tong and M Chesler. Activity-evoked extracellular pH shifts in slices of rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res*, 815:373–381, 1999.
- [126] CK Tong and M Chesler. Endogenous pH shifts facilitate spreading depression by effect on NMDA receptors. J Neurophysiol, 81:1988–1991, 1999.
- [127] SF Traynelis, M Hartley, and SF Heinemann. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268:873–876, 1995.
- [128] BJ Wainger, M DeGennaro, B Santoro, SA Siegelbaum, and GR Tibbs. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 411:805–810, 2001.
- [129] CP Washburn, JE Sirois, EM Talley, PG Guyenet, and DA Bayliss. Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K+ conductance. J Neurosci, 22:1256–1265, 2002.
- [130] CS Watkins and A Mathie. A non-inactivating K+ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. J Physiol, 491:401–412, 1996.
- [131] MJ Webster and MH Rowe. Morphology of identified relay cells and interneurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat. Exp Brain Res, 56:468–474, 1984.

- [132] N Wettschurek, T Seidenbecher, T Munsch, T Broicher, SG Meuth, HC Pape, S Offermanns, and T Budde. Dependency of activity mode transition in thalamocortical relay neurons on Gq protein signalling. *(in revision)*, 2006.
- [133] TG Weyand, M Boudreaux, and W Guido. Burst and tonic response modes in thalamic neurons during sleep and wakefulness. J Neurophysiol, 85:1107–1118, 2001.
- [134] SR Williams, TI Toth, JP Turner, SW Hughes, and V Crunelli. The 'window' component of the low threshold Ca2+ current produces input signal amplification and bistability in cat and rat thalamocortical neurones. J Physiol, 505 (Pt 3):689–705, 1997.
- [135] SR Williams, JP Turner, SW Hughes, and V Crunelli. On the nature of anomalous rectification in thalamocortical neurones of the cat ventrobasal thalamus in vitro. J Physiol, 505 (Pt 3):727–747, 1997.
- [136] DH Yan and K Ishihara. Two Kir2.1 channel populations with different sensitivities to Mg(2+) and polyamine block: a model for the cardiac strong inward rectifier K(+) channel. J Physiol, 563:725–744, 2005.
- [137] DH Yan, K Nishimura, K Yoshida, K Nakahira, T Ehara, K Igarashi, and K Ishihara. Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K(+) currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. J Physiol, 563:713–724, 2005.
- [138] CH Yu and R Pomes. Functional dynamics of ion channels: modulation of proton movement by conformational switches. J Am Chem Soc, 125:13890– 13894, 2003.
- [139] X Zong, J Stieber, A Ludwig, F Hofmann, and M Biel. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel hcn2. J Biol Chem, 276:6313–6319, 2001.

7 Danksagung

Ohne die außergewöhnliche Unterstützung meiner Familie - besonders meiner Eltern - während des gesamten Studiums wäre die vorgelegte Arbeit nicht durchführbar gewesen.

Meinem Bruder Patrick Meuth danke ich für seine Hilfsbereitschaft in verschiedensten Bereichen (kritische Durchsicht der Arbeit, Hilfe bei EDV-Problemen ...) und die gelungene Zusammenarbeit bezüglich des verwendeten Computermodells.

Frances Sauerzweig danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung, Geduld und ihre tolle Persönlichkeit. Es ist schön, dass es Dich gibt! Ich bin sehr stolz auf Dich!

Ich danke den technischen Assistentinnen des Institutes für Physiologie (Regina Ziegler, Angela Jahn, Anja Reupsch, Sabine Mücke) für die Unterstützung meiner Forschungsarbeiten.

Den Mitarbeitern des Institutes für Physiologie der Otto-von-Guericke Universität (besonders Susanne Meis, Thomas Munsch und Thomas Seidenbecher) danke ich für die zahlreichen Ratschläge, fruchtbaren Diskussionen und belebenden Kooperationen.

Bei Tatjana Kanyshkova bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Techniken. Peter Landgraf danke ich für die Hilfe bei den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen und seine generelle Unterstützung über die vorgelegte Arbeit hinaus.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Reiser als Sprecher des Graduiertenkollegstipendiums "Biologische Grundlagen neuronaler Erkrankungen" für seine Betreuung und wohlwollende Förderung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape für die ausgezeichnete Betreuung und für die generelle Unterstützung meiner Arbeit. Durch diese Unterstützung und Förderung habe ich viel über das wissenschaftliche Arbeiten gelernt.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meinem Mentor und Freund PD. Dr. rer. nat. Thomas Budde für die nun schon einige Jahre andauernde, freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit bedanken. Die Qualität und Intensität dieser Zusammenarbeit war und ist außergewöhnlich gut.

8 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

"EXPRESSION UND FUNKTIONELLE RELEVANZ VON ZWEI-POREN K⁺-KANÄLEN DER TASK-FAMILIE IN THALAMISCHEN SCHALTNEURONEN"

im Institut für Physiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Betreuung durch **Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape** ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Naturwissenschaftlichen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Würzburg, September 2006

(Dr. med. Sven G. Meuth)

9 Darstellung des Bildungsweges/Publikationsliste

Julius-Maximilians-Universität Würzburg Klinik für Neurologie Forschungsgruppe - Multiple Sklerose und Neuroimmunologie Josef-Schneider Str. 11 97080 Würzburg Telefon: (0931) 20123543 Mobil: (0163) 3803352 Email: sven.meuth@gmx.de

Persönliche Informationen

Geboren am:	16. März 1977 in Limburg (a.d.L.)
Nationalität	deutsch
Familienstand:	ledig, keine Kinder

Ausbildung

1983-1987:	Grundschule
1987-1993:	Taunusschule Bad Camberg
1993-1996:	Pestalozzigymnasium Idstein, Abitur
1997:	Immatrikulation an der Otto-von-Guericke-Universität Magde-
	burg in den Studiengang "Humanmedizin"
1999:	Physikum
2000-2002:	$\label{eq:lagrang} Auf baustudiengang , Neurowissenschaften `` parallel zum Medizinstudium$

2001:	1. Staatsex	amen
2003:	2. Staatsex	amen
2003-2004:	Praktisches	s Jahr (PJ):
	1. Tertial:	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Medizinische Fakultät Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
	2. Tertial:	Psychiatrische Universitätsklinik Basel, PUK
	3. Tertial:	Otto-von-Guericke Universität Magdeburg Medizinische Fakultät Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
seit $12/2004$:	Assistenzar	zt der Klinik für Neurologie, Julius-Maximilians Un

medizinische Promotion

2000-2005: (Dr. med.) zum Thema: "KALZIUM ABHÄNGIGE INAK-TIVIERUNG VON NEURONALEN KALZIUMKANÄLEN IN THALAMOKORTIKALEN SCHALTNEURONEN DER RAT-TE"

versität Würzburg (Leitung: Prof. K.V. Toyka)

 $naturwissenschaftliche\ Promotion$

seit 2002: Beginn der Promotionsarbeit (Dr. rer. nat.) zum Thema: "EX-PRESSION UND FUNKTIONELLE RELEVANZ VON ZWEI-POREN K⁺-KANÄLEN DER TASK-FAMILIE IN THALAMI-SCHEN SCHALTNEURONEN"

Forschungserfahrung und besetzte Positionen

2000-2001 Institut für Physiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Doktorand und studentische Hilfskraft: Elektrophysiologische und biochemische Untersuchungen an thalamischen Schaltneuronen.

2001-2004	Institut für Physiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magde- burg Wissenschaftliche Hilfskraft: Elektrophysiologische und mo- lekularbiologische Untersuchungen an Hirnschnitten der Ratte
seit 2004	wissenschaftlicher Assistent, Forschungsgruppe Multiple Sklero-
	Würzburg (Leitung: Prof. H. Wiendl)
Lehrerfahrung	
2000/2001:	Praktikum "Zelluläre Neurophysiologie" (5. Fachsemester) im Rahmen des Hauptstudiengangs Neurobiologie / Neurowissen- schaften an der Medizinischen Fakultät Magdeburg
2001/2002:	Physiologie fakultative Lehrveranstaltung "Biologische Grundla- gen der Hirnfunktion"
2002:	Spezialpraktikum " <i>Patch-clamp-Aufnahmen an Hirnschnitt-</i> <i>präparaten</i> " (7. Fachsemester) im Rahmen des Hauptstudien- gangs Neurobiologie / Neurowissenschaften an der Medizinischen Fakultät Magdeburg
seit 2004:	Untersuchungskurs Neurologie, Julius-Maximilians Universität

seit 2005: PJ-Vorlesung "Liquordiagnostik"

Würzburg

${\it Mitglieds chaften}$

seit 2001 :	Mitgliedschaft bei der deutschen Neurowissenschaftlichen Gesell-
	schaft
seit 2003:	Mitgliedschaft im Hartmannbund - Verband der Ärzte Deutsch-
	lands e.V.

Forschungsförderung

 $\underline{\mbox{Graduierten-Stipendium der DFG}}$ (01.10. 1999 - 31. 10. 2000):
 Stipendium, Verbrauchsmittel

 $\underline{\mbox{Graduierten-Stipendium der DFG}}$ (01.01. 2002 - 31. 12. 2002):
 $\underline{\mbox{Stipendium, Verbrauchsmittel}}$

Kommission zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses (Juni 2002): Reisemittel

Stipendium der Otto-von-Guericke-Universität (01.01. 2003 - 31. 12. 2004): Stipendium, Verbrauchsmittel

Reisestipendium der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V. (März 2003): Reisemittel

Reisestipendium der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V. (Februar 2004): Reisemittel

 $\frac{\mathrm{IBRO}\ \text{-}\ \mathrm{International\ Brain\ Research\ Organisation}}{\mathrm{Reisemittel}}$ (Oktober 2004):

${\it For schungs auf en thal te}$

2001/2002:	Eberhard-Karls Universität, Abteilung Allgemeine Neurologie, Tübingen, Deutschland in Zusammenarbeit mit Heinz Wiendl (M.D.) und Robert Weissert (M.D./Ph.D)
	Thema: Modulation of neuronal activity by the endogenous pen- tapeptide, QYNAD
2002:	University of Southwestern, Medical Center, Dallas, Texas, USA unter der Leitung von Robert W. Greene (M.D./Ph.D) Thema: <i>Characterization of altered LTP in BDNF knock-out mice</i>
2004:	Universität Basel, Schweiz unter der Leitung von Ralph Mager (M.D.) Thema: Neurocognitive processing of conflicting information in borderline personality disorder: an event-related potential study

Mitarbeit in der Selbstverwaltung und bei Fachgesellschaften

2001-2004:	Mitarbeit als gewähltes Mitglied in der "Kommission zur Förde-
	rung des wissenschaftlichen Nachwuchses" innerhalb des Fa-
	kultätsrates der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2001/2002:	Organisation des internationalen Symposiums "molecular ba- sics and clinical perspectives of neurodegenerative diseases" vom
	15./16.01.02 in Magdeburg

eingeladene Vorträge

2002:	Magdeburger Forschungsverbund "Neurowissenschaften und Im- munologie", 1. Struktur- und Forschungsworkshop;
	Thema: "Die Modulation von Kalium- und Kalzium-Kanälen un- terliegt der thalamischen Aktivität im Wachzustand."
2004:	AG Neuroimmunologie, Kloster Seeon - 06. Februar bis 08. Februar 2004
	Thema: "Reine Nervensache: Wie die Kombination aus klas- sischen elektrophysiologischen Techniken und neuroimmunologi- schen Strategien neue Perspektiven eröffnen kann."
2004:	Klinik für Psychiatrie, Universität Basel, Schweiz; November 2004 Thema: " <i>Neurobiologie des Schlaf-Wach-Rhythmus</i> "
2005:	Institut für Physiologie, Julius-Maximilians Universität Würz- burg; April 2005 Thema: "More than a leak: involvement of K ₂ P channels in phy-
	siological and pathophysiological conditions"
2005:	Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft (DMSG), Landesverband Thüringen, Sonneberg; Juni 2005
	Thema: "Aktuelle Therapien bei Multipler Sklerose."
2005:	Society for Neuroscience, 35^{th} Annual Meeting, Washington D.C., USA; November 2005
	Thema: "More than a leak: characterization of K_2P channels and their possible role in multiple sclerosis."
2006:	AG Neuroimmunologie, Kloster Seeon - 04. Februar bis 06. Februar 2006
	Thema: "Ionale Leitfähigkeiten in der Pathogenese der Multiplen Sklerose - Ansichten eines Kanalarbeiters."

Preise

2005:	Dissertationspreis der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
	(Dr. med.); Karin-Witte Stiftung
2005:	Preis der Klaus-Felgenhauer-Stiftung

Publikationsliste

 $Wissenschaftliche\ Ver{\"o}ffentlichungen$

P1	S.G. Meuth , T. Budde & HC. Pape (2001). Differential control of high-voltage activated Ca^{2+} current components by a Ca^{2+} -dependent inactivation mechanism. <i>Thalamus and Related Systems, Volume 1, Issue 1 , March 2001, Pages 31-38</i>
P2	S.G. Meuth , H.C. Pape & T. Budde (2002). Modulation of Ca^{2+} currents in rat thalamocortical relay neurons by activity and phosphorylation. <i>Eur J Neuroscience 2002 May</i> ;15(10):1603-14
P3	T. Budde, S.G. Meuth, HC. Pape (2002). Ca^{2+} -dependent inactivation of neuronal Ca^{2+} channels: restricting the action of a universal messenger. <i>Nature Reviews Neuroscience 2002 Nov;3(11):873-83. Review</i>
P4	S.G. Meuth , T. Kanishkova, T. Munsch, HC. Pape & T. Budde (2003). TASK channels set the membrane potential of thalamic neurons. <i>J Neuroscience 2003;23 6460-6469</i>
Ρ5	Sven G. Meuth, Thomas Budde, Hüseyin Duyar, Peter Landgraf, Tilman Broicher, Martin Elbs, Roland Brock, Michael Weller, Robert Weissert and Heinz Wiendl (2003). Modulation of neuronal activity by the endogenous pentapeptide QYNAD. <i>Eur J Neuroscience 2003</i> <i>Dec;18 2697-2706</i>
P6	Lisa Monteggia, Michel Barrot, Craig Powell, Olivier Berton, Victor Galanis, Terry Gemelli, Sven G. Meuth , Andras Nagy, Robert Greene, Eric Nestler (2004). Essential role of brain derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. <i>Proc Nat Acad Sci USA 2004 Jul 12</i>
P7	Sven G. Meuth , Tatjana Kanishkova, Peter Landgraf, Hans- Christian Pape and Thomas Budde (2005). Influence of Ca^{2+} -binding proteins and the cytoskeleton on Ca^{2+} -dependent inactivation of high- voltage activated Ca^{2+} currents in thalamocortical relay neurons. <i>Pflügers Arch 2005 Jan 13</i>
P8	Patrick Meuth, Sven G. Meuth , Daniel Jacobi, Tilman Broi- cher, Hans-Christian Pape and Thomas Budde (2005). GET THE RHYTHM: modeling of neuronal activity. <i>Journal of Undergraduate</i> <i>Neuroscience Education, Fall 2005, 4(1):A1-11</i>
Р9	Hans-Christian Pape, Sven G. Meuth, Thomas Seidenbecher, Thomas Munsch und Thomas Budde (2005). Der Thalamus: Das Tor zum Bewusstsein und Rhythmusgenerator im Gehirn. Neuroforum $2/05$, 44-54

P10	Sven G. Meuth , Isabelle M. Aller, Thomas Munsch, Thekla Schuma- cher, Thomas Seidenbecher, Patrick Meuth, Christoph Kleinschnitz, Hans-Christian Pape, Heinz Wiendl, William Wisden and Thomas Budde (2006). The contribution of TASK1-containing channels to the function of dorsal geniculate thalamocortical relay neurons. <i>Mol Phar-</i> <i>macol</i> 69:1468-76
P11	Boris Musset, Sven G. Meuth , Gong Xin Liu, Christian Derst, Sven Wegner, Hans-Christian Pape, Thomas Budde, Regina Preisig-Müller and Jürgen Daut (2006). Effect of divalent cations and spermine on the conductance of the K ⁺ channel TASK3 and on the standing outward current in thalamocortical relay neurons. <i>J Physiol Mar 2</i>
P12	Christoph Kleinschnitz, Harald H. Hofstetter, Sven G. Meuth , Claudia Sommer and Guido Stoll (2006). T-cell infiltration after chronic injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. <i>Exp Neurol May 1</i>
P13	Sven G. Meuth , Tatjana Kanishkova, Patrick Meuth, Peter Landgraf, Thomas Munsch, Andreas Ludwig, Franz Hofmann, Hans-Christian Pape and Thomas Budde (2006). The membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels. <i>J Neurophysiol Jun 7</i>
P14	Sven G. Meuth , Christoph Kleinschnitz, Marco Frank, Carsten Wessig, Wolfram Kress, Martin Bendszus and Heinz Wiendl. Why a positive genetic test for myotonic dystrohpy type1 does not always imply the diagnosis of Steinert's disease. <i>JNNP (in press)</i>
P15	Christoph Kleinschnitz, Sven G. Meuth , Bernd C. Kieseier and Heinz Wiendl (2006). Immunotherapeutic Approaches in MS: Update on Pathophysiology and Emerging Agents or Strategies 2006. <i>EMID-DT (in press)</i>
P16	Tilman Broicher, Tatjana Kanyshkova, Peter Landgraf, Sven G. Meuth , Hans-Christian Pape and Thomas Budde. Differential expres- sion of low-voltage-activated calcium channels in identified thalamic cell types of epileptic and non-epileptic rat strains. <i>(in revision)</i>
P17	Nina Wettschurek, Thomas Seidenbecher, Thomas Munsch, Tilman Broicher, Sven G. Meuth , Hans-Christion Pape, Stefan Offermanns and Thomas Budde. Dependency of activity transition in thalamocor- tical relay neurons on Gq protein signalling. (in revision)

Buchkapitel

C1	S.G. Meuth (2000). Störungen der Schlaf-Wach-Rhythmik.
	Internet: www.gesundheitsweb.de (Firma Knoll).
C2	Sven G. Meuth, Thomas Budde (2004). Neurobiologische und neu-
	rophysiologische Aspekte in der Neuroimmunologie. Fragen und Ant-
	worten der Neuroimmunologie. Heinz Wiendl (Editor) (in press)

Bücher

B1 T. Budde/**S. Meuth** (Erscheinungsjahr 2003). Fragen und Antworten zu den Neurowissenschaften. *Hans-Huber Verlag*

Kongressbeiträge/eingereichte Abstrakts

http://www.sven-meuth.de/pub.html

A Anhang

A.1 Rezepte

A.1.1 Elektrophysiologie

ACSF -	artificial	cerebrospinal	fluid,	Hirnschnitte;	pH =	7,35
		1		/	-	

NaCl	125 mM
KCl	2,5 mM
NaH_2PO_4	$1,25 \mathrm{~mM}$
$NaHCO_3$	24 mM
$MgSO_4$	2 mM
$CaCl_2$	2 mM
Dextrose	10 mM

PIPES-haltiges Inkubations medium; pH = 7,35

NaCl	120 mM
KCl	5 mM
$MgCl_2$	3 mM
$CaCl_2$	1 mM
PIPES	20 mM
Dextrose	25 mM

A.1.2 Zellkultur

Neurobasalmedium:

50 ml Neurobasalmedium (Gibco, Eggenstein, Deutschland)

- + 1ml B27 (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- + 0,5 ml Penicillin/Streptavidin (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- + 200 μ l Glutamin (Gibco, Eggenstein, Deutschland)

DMEM:

500 ml Dulbecco's modified Eagle Medium, DMEM (Gibco, Eggenstein, Deutschland)

- + 50 ml fetales Kälberserum (Hitze-inaktiviert, Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- + 5 ml Penicillin/Streptavidin
- + 5 ml Glutamin

Kälberserum vorher steril filtrieren!

Poly-D-Lysin:

100 mg Poly-D-Lysin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 11 0,15 M Borsäure lösen (=9,27 g Borsäure/l ; mit NaOH auf pH 8,4 eingestellt)

steril filtrieren

<u>DNase I:</u>

DNase I (Boehringer, Ingelheim, Deutschland) 0,1 % ig in HBSS (+ divalente Kationen) verdünnen; Lösung dann bei einer Endkonzentration von 0,01% (1:10) verwenden

Trypsin:

Trypsin in 2,5% iger Lösung herstellen (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) Lösung dann in einer Endkonzentration von 0,25% einsetzen

A.1.3 Immunzytochemie auf dissoziierten thalamischen Zellen

Blockpuffer:

1xPBSauf 50ml:10% Pferdeserum5 ml Pferdeserum5% Saccharose2,5 g Saccharose2% BSA1 g BSApH 7,1 - 7,4steril filtrieren, aliquotieren