Aus dem Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock Direktor : Univ.-Prof. Dr. med. R. Köhling

Einfluss des Proteinkinase CK 2 Inhibitors

4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol auf das Nachpotential

im Pilocarpinmodell der Temporallappenepilepsie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Hannes Brehme

geboren am 25.02.1986 in Potsdam

Rostock, 2015

Dekan:	Prof. Dr. med. E. C. Reisinger
	Ernst-Heydemann-Straße 8
	18057 Rostock
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. R. Köhling
	Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie
	Gertrudenstraße 9
	18057 Rostock
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. U. Walter
	Zentrum für Nervenheilkunde
	Klink für Neurologie und Poliklinik
	Gehlsheimer Straße 20
	18147 Rostock
3. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. T. Schneider
	Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
	Robert-Koch-Straße 39
	50931 Köln
Eingereicht am: 26.08.2014	
Verteidigung am: 17.06.2015	

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsv	erzeichnis	iii
2.	Einleitu	ng	1
	2.1. Hippo	ocampus	1
	2.2. Epiler	osie und Temporallappenepilepsie	4
	2.3. Tierm	odelle der Epilepsie	7
	2.4. Das A	ktionspotential und dessen Nachpotentiale	8
	2.5. Prote	inkinase CK 2 und TBB	10
	2.6. Zielst	ellung	11
3.	Materia	lien und Methoden	12
	3.1. Ma	terialien	12
	3.1.1.	Materialien und Geräte	12
	3.1.2.	Chemikalien	15
	3.1.3.	Lösungen	16
	3.2. Me	thoden	19
	3.2.1.	Status epilepticus	19
	3.2.2.	Applikation von TBB	20
	3.2.3.	Hippocampuspräparation	20
	3.2.4.	Extrazelluläre elektrophysiologische Messungen	21
	3.2.5.	Isolation von Pyramidenzellen der CA 1 Region	22
	3.2.6.	Strom- und Spannungsmessungen an isolierten Zellen	23
	3.2.7.	Datenaufnahme und statistische Analyse	27

4. Ergebnisse

4.1. Veränderungen der synchronen neuronalen Aktivität in der	
CA 1 Region durch TBB	28
4.2. Veränderung des Aktionspotentials	31
4.3. Veränderung des Nachpotentials nach einem einzelnen Aktionspotential	33
4.3.1 Amplitudenveränderung	33
4.3.2 Veränderung der Länge des Nachpotentials	33
4.4. Veränderungen des mAHP-abhängigen Stromes im Pilocarpinmodell der	
Temporallappenepilepsie	35
4.5. Veränderungen des mAHP-abhängigen Stromes durch die Gabe von TBB	35
4.6. Veränderungen des sAHP-abhängigen Stromes im Pilocarpinmodell	37
4.7. Veränderungen des sAHP-abhängigen Stromes durch die Gabe von TBB	38
Dickuccion	11

5. Diskussion

41

5.1. Orale Applikation von TBB verringert die epileptische Aktivität im	
neuronalen Netzwerk	42
5.2. Senkung des mAHP-abhängigen Stromes im Pilocarpinmodell der	
Temporallappenepilepsie und dessen Unabhängigkeit von TBB	43
5.3. Steigerung des sAHP-abhängigen Stromes durch TBB	44
5.4. Anstieg des sAHP durch Blockierung der CK 2 zeigt keine	
Pharmakoresistenz im Pilocarpinmodell	45
5.5. Rückschlüsse auf die Wirkungskaskade der Proteinkinase CK 2	46
5.6. Fehlerbetrachtung	48
5.7. Zusammenfassung	49

6.	Thesen	50
7.	Anhang	52
	7.1. Abkürzungsverzeichnis	52
	7.2. Abbildungsverzeichnis	53
	7.3. Literaturverzeichnis	54
	7.4. Veröffentlichungsverzeichnis	65
	Danksagung	66
	Eidesstattliche Erklärung	67
	Lebenslauf	68

2. Einleitung

2.1. Hippocampus

Der Hippocampus gehört phylogenetisch dem Archikortex an. Er ist somit eine der Strukturen, die evolutionär früh in der Gehirnentwicklung entstanden ist und die, verglichen mit der restlichen Großhirnrinde, bei Säugetieren geringen Veränderungen unterworfen ist. Morphologisch und funktionell lässt sich der Hippocampus in den Gyrus dentatus, das Ammonshorn (= Cornu ammonis) und das Subiculum einteilen. Das Cornu ammonis gliedert sich weiterhin in die Regionen CA 1 bis CA 4 (Amaral und Witter, 1989) (s. Abb. 2.1.), wobei CA 4 bereits den Hilus des Gyrus dentatus beschreibt und nicht in allen Arbeiten zum Cornu ammonis gerechnet wird. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Zellen der CA 1 Region. Im Hippocampus existiert ein häufig beschriebener unidirektionaler Erregungsweg: Körnerzellen des Gyrus dentatus projezieren über sogenannte Moosfasern auf Pyramidenzellen der CA 3 Region, deren Erregungsfortleitung über die Schaffer Kollateralen zur CA 1 Region führt (vgl. Abb. 2.1.). Dieser Erregungskreislauf wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Ramon y Cajal beschrieben (Übersichtsartikel Roxo et al., 2011). Der Erregungskreislauf sei hier erwähnt, da für die Feldpotentialmessungen in der vorliegenden Arbeit die Schaffer Kollateralen gereizt werden, um die Elektrodenposition in der CA 1 Region zu verifizieren.

Viele neuronale Prozesse werden im Hippocampus verarbeitet. Großen Anteil hat er am Verund Entschlüsseln sowie zur Vertiefung von erlebtem Geschehen (Carr und Frank, 2012). Er ist ebenfalls in das limbische System zusammen mit dem präfrontalen Cortex, der Amygdala, dem anterioren cingulären Cortex und der Insula eingebettet. Bereits 1937 beschrieb Papez die neuroanatomische Grundlage des Zusammenspiels im limbischen System anhand des Papezkreises (vgl. Übersichtsarbeit von Roxo et al., 2011). Funktionell wird das limbische System mit dem Trieb- und Affektverhalten, der Motivation sowie mit einer wichtigen Rolle bei Lernprozessen und dem Gedächtnis in Verbindung gebracht, so dass Schädigungen des Hippocampus und dessen assoziierten Strukturen häufig kognitive Störungen zur Folge haben.



Abb. 2.1. Schematische und histologische Darstellung des Hippocampus. In der Abbildung sind zum einen eine schematische Zeichnung des Hippocampus (A), zum anderen eine kombinierte Zellkern- und Timm-Färbung (B) eines Kontrolltieres zu sehen. Gekennzeichnet sind die in der vorliegenden Arbeit angesprochenen Regionen Stratum granulosum, Cornu ammonis 1 (CA 1) und Cornu ammonis 3 (CA 3). Die Zellkörper der Körnerzellen im Stratum granulosum und die der Pyramidenzellen im Cornu ammonis sind vereinfacht dargestellt. Die Gebiete werden vernetzt durch die Moosfasern, die bei der Reorganisation des Gewebes während der Epileptogenese eine Rolle spielen und die Schaffer Kollateralen, die in der vorliegenden Arbeit bei der Messung der Feldpotentiale gereizt wurden, um die Lokalisation der Elektrode in der CA 1 Region zu verifizieren. Die Moosfasern sind in (B) dunkelbraun angefärbt. Sie ziehen von den Körnerzellen im Stratum granulosum in die CA 3 Region.

Bereits im 19. Jh. wurden in Autopsiestudien Veränderungen am Hippocampus bei Epilepsiepatienten gefunden (Bouchet und Cazauvielh, 1825). Durch weiteren technischen Fortschritt, wie die Entwicklung des Elektroenzephalogramms (EEG) durch Hans Berger Anfang des 20. Jh. fand man heraus, dass der Hippocampus als Taktgeber prominenter EEG-Signale fungiert (Green und Ardouini, 1948). Später wird auch elektroenzephalografisch der Hippocampus als Ursprungsgebiet bei der mesialen Temporallappenepilepsie (TLE) vermutet (King und Spencer, 1995), die im nächsten Kapitel im Detail besprochen wird.

Durch den weiten Aufgabenbereich des Hippocampus ist es nicht verwunderlich, dass die Temporallappenepilepsie häufig mit Auren von verschiedenen Qualitäten einhergeht, wie zum Beispiel diffuse epigastrische und auditive Missempfindungen, affektive Symptome wie Wut, Euphorie, Depression oder auch Déjà-vu Erlebnisse sowie Konzentrationsschwächen (French et al., 1993).

2.2. Epilepsie und Temporallappenepilepsie

Der Begriff Epilepsie beschreibt eine heterogene Gruppe von Krankheitsbildern, die sich in ihrer Ätiologie, Symptomatik und Prognose unterscheiden. Gemeinsam ist ihnen die anhaltende Prädisposition spontane epileptische Anfälle zu entwickeln (Fisher et al., 2005). Als Anfall gilt ein vorübergehendes Auftreten von Symptomen aufgrund abnorm gesteigerter oder hypersynchroner neuronaler Aktivität im Gehirn (Fisher et al., 2005; Martinerie et al., 1998).

Die Epilepsie ist eine der häufigsten schwerwiegenden neurologischen Erkrankungen, an der ca. 0,4 - 1 % der Weltbevölkerung erkrankt ist (Sander und Shorvon, 1996). Das Lebensrisiko einen epileptischen Anfall zu erleiden wird mit 3 - 5 % angegeben (Sander und Shorvon, 1996). Die Internationale Liga gegen Epilepsie klassifizierte diese Gruppe von Erkrankungen zuletzt 2010 in Epilepsien mit generalisierten und partiellen Anfällen sowie ätiologisch nach genetischer, strukturell/metabolischer und unbekannter Ursache (Berg et al., 2010). Die Erkrankungen haben zwei Inzidenzmaxima. Zum einen im Kindes- und Jugendalter, hier kommen u. a. genetische Defekte, sowie prä- und peripartale Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) als häufigere Ursachen in Betracht, und zum anderen im Erwachsenenalter, in dem Traumata, Tumore, Infektionen, Schlaganfälle oder auch vaskuläre Malformationen zu schweren Schäden am ZNS und zur Epilepsie führen können.

Die TLE ist beim Erwachsenen die häufigste Form und gehört zu den fokalen Epilepsien. Meistens ist ihre Grundlage die mesiale temporale Sklerose (MTS), bzw. Hippocampussklerose (Blümcke et al., 2009). Die anderen genannten Ursachen können ebenfalls bei einer Temporallappenepilepsie vorliegen. Die MTS tritt meist beidseitig auf, wobei eine Seite häufig stärker betroffen ist (Sadler, 2006). Es wird angenommen, dass eine Reorganisation des neuronalen Netzwerks als Antwort auf den Neuronenuntergang epileptogen wirkt (Bender et al., 2003). Die Pathogenese dieser Erkrankung konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass Fieberanfälle in der frühen Kindheit vor der Erkrankung häufig auftreten (French et al., 1993; Harvey et al., 1995). Bei der Ausbildung von MTS nach Fieberkrämpfen werden zusätzlich auch genetische Ursachen diskutiert (Cendes, 2004). Weiterhin wird eine autoimmune Genese in einem kleineren Kollektiv vermutet (Soeder et al., 2009; Malter et al., 2010).

Klinisch handelt es sich bei der TLE infolge einer MTS um eine progressive Erkrankung, die sich meistens zwischen dem sechsten und zehnten Lebensjahr manifestiert, wobei auch Fälle jenseits des 30. Lebensjahres beschrieben wurden (Stefan et al., 2009). Häufig treten sekundär generalisierte Anfälle auf, wobei ein Status epilepticus selten eintritt.

Diese Anfälle lassen sich initial mit Antiepileptika meist kontrollieren, wobei es in 60 bis 90 % der Fälle zu Rezidiven im Verlauf und damit zu erneuten Anfällen kommt, die medikamentös nur schwer zu kontrollieren sind (Sadler, 2006). Als weitere Therapieoption steht bei den refraktären Fällen die Hippocampektomie zur Verfügung. Hier zeigt sich eine Anfallsfreiheit von bis zu 80 % in den ersten beiden Jahren (Blümcke et al., 2007; Janszky et al., 2005).

In der Magnetresonanztomografie (MRT) ist die MTS durch eine Atrophie des Hippocampus sowie eine abnormal starke Signalerhöhung in der T2 Gewichtung zu erkennen (Van Paesschen, 2004). Als histologisches Korrelat ist ein Zelluntergang in den Regionen CA 1 bis CA 3 und im Gyrus dentatus zu erkennen, wobei die CA 1 Region am stärksten und die CA 2 Region am schwächsten betroffen ist (Blümcke et al., 2007). Als weiteres histologisches Zeichen lässt sich eine Moosfasersprossung beobachten (Scheibel et al., 1974), welche als Reorganisationsprozess angesehen wird (Sutula et al., 1989). Hierbei folgen die Moosfasern der Körnerzellen im Gyrus dentatus nicht mehr dem ursprünglichen Weg in Richtung CA 3 Region, sondern ihre Axone sprossen nun auch in Richtung des enthorinalen Cortex aus (vgl. Abb. 2.2.). Moosfasern besitzen verstärkt Zinkionen, die angefärbt werden können (Timm, 1958). Diese Färbemethode wurde verwendet, um sicherzustellen, dass es auch in dem hier angewendeten Tiermodell der Pilocarpinbehandlung zu einer Hippocampussklerose kommt. Zur Verdeutlichung dieser Unterschiede ist in Abb. 2.2. diese Färbung sowohl bei Kontrolltieren als auch bei epileptischen Tieren dargestellt.

Abbildung 2.2.





Histologischer Vergleich des Hippocampus zwischen Kontrolltieren und epileptischen Tieren. Abb. 2.2. Dargestellt sind Hippocampusschnitte sowohl eines Kontrolltieres (A) als auch eines mit Pilocarpin behandelten Tieres (epileptisch) (B), die durch eine Färbemethode nach Timm gefärbt sind. Es zeigen sich bei den Kontrollen Moosfasern (dunkelbraun angefärbt), die von den Körnerzellen ausgehend bis in die CA 3 Region ziehen. Bei den epileptischen Tieren hingegen organisieren sich diese neu und streuen nun auch basal in Richtung enthorinalen Cortex. Des Weiteren liegt eine geringere Zellkerndichte vor allem in der CA1 Region bei den epileptischen Tieren vor. Die Zellkerne sind hier blau-violett angefärbt.

> Die Bilder werden freundlicherweise von Frau Sellmann (aus dem Institut für Physiologie der Universität Rostock) zur Verfügung gestellt.

2.3. Tiermodelle der Epilepsie

Es existieren verschiedene Tiermodelle zur Epilepsie und Anfallsdiagnostik. Verwendet werden sowohl chemisch oder elektrisch induzierte als auch genetische Modelle.

Als genetisches Modell existiert z.B. GEPR (genetically epilepsy-prone rat), welches eine sehr niedrige Anfallsschwelle für akustische Reize besitzt (Reigel et al., 1986; Jobe et al., 1995) und eine audiogene Epilepsie wiederspiegelt. Die Absence Epilepsie kann in dem Modell GAERS (Genetic Absence epilepsy rat from Strasbourg) untersucht werden (Marescaux et al., 1992).

Als elektrisch induziertes Epilepsiemodell hat sich das Amygdala-Kindling etabliert. Hierbei wird durch regelmäßige fokale elektrische Stimulation eine Erniedrigung der Krampfschwelle erreicht und ein Anfall kann initialisiert werden (Goddard, 1967). Dieses Modell wird häufig als Anfallsmodell genutzt und spielt hierbei auch heute noch eine Rolle bei der präklinischen Evaluierung von Antiepileptika (Morimoto et al., 2004).

Die Modelle der Temporallappenepilepsie basieren häufig darauf einen Status epilepticus zu generieren, der einen Umbauprozess des Hippocampus initialisiert, in deren Verlauf es zu spontanen epileptischen Anfällen kommt. So führt eine intraamygdaloide Applikation von Kainsäure zu einem solchen Status, welcher zu einer Hippocampussklerose und zu spontanen Anfällen führen kann (Ben-Ari et al., 1979). Nach akzidenteller Intoxikation mit Domoinsäure, welche, wie die Kainsäure, an glutamatergen Rezeptoren bindet, wurde diese Wirkung auch beim Menschen beschrieben. Zunächst kam es bei dem Patienten zu mehreren partiellen Anfällen und zu einem Status epilepticus. Nach 3 Wochen war er wieder anfallsfrei. Mit einer Latenzzeit von einem Jahr kam es dann zu spontanen Anfällen (Cendes et al., 1995). Der Ablauf ist mit kürzeren Latenzzeiten im Tiermodell ebenfalls in dieser Reihenfolge nachzuvollziehen.

Als weiteres Chemokonvulsivum wird das auch für diese Arbeit verwendete Pilocarpin oder auch Pilocarpin in Verbindung mit Lithium eingesetzt. Hierbei wird durch eine, in der Regel einmalige, systemische Injektion ein Status epilepticus herbeigeführt, durch den die Tiere nach einer Latenzzeit von ca. einem Monat spontane Anfälle generieren (Tursky et al., 1983). Auf den Ablauf wird im Methodenteil verstärkt eingegangen. Vom Zellverlust ist histologisch sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen vor allem die CA 1 Region bei der Hippocampussklerose betroffen (Bender et al., 2003). (Vgl. auch Abb. 2.2.)

2.4. Das Aktionspotential und dessen Nachpotentiale

Im Folgenden soll hier kurz auf die Grundlagen der neuronalen Erregung einzelner Zellen eingegangen werden.

Ein Aktionspotential ist eine rasche, ca. 1-2 ms andauernde Verschiebung des Membranpotentials in depolarisierende Richtung, z.B. von ca. -70 mV auf ca. +20 mV. Das Ruhemembranpotential liegt auf Grund der unterschiedlichen intra- und extrazellulären Verteilung und Leitfähigkeit hauptsächlich von Kalium-, Natrium- und Chloridionen bei Nervenzellen bei ca. -60 bis -70 mV. Dieses wird sowohl durch die intrazellulären negativ geladenen, membranimpermeablen Proteine als auch durch die elektrogen arbeitende Na⁺/K⁺- Pumpe gehalten (Kirschstein, 2008).

Viele verschiedene Nervenzelltypen zeigen einen typischen Verlauf des Aktionspotentials beginnend mit einer schnellen Depolarisation. Diese wird durch spannungsabhängige, schnell aktivierbare, schnell inaktivierende und Tetrodotoxin (TTX) sensitive Natriumkanäle getragen (Hille, 1970) wird. Ihr folgt eine schnelle Repolarisation und häufig eine Hyperpolarisation (s. Abb. 2.2). Die nach einem Aktionspotential stattfindende Hyperpolarisation ist in die englischsprachige Literatur unter dem Begriff afterhyperpolarisation potential (AHP) eingegangen.

Bereits in den 70er Jahren des 20. Jh. stellte sich heraus, dass das Nachpotential einen großen Einfluss auf die Erregbarkeit einer Nervenzelle besitzt. So wurde an Motoneuronen in vivo eine Kalziumabhängigkeit dieses Nachpotentials festgestellt (Krnjević und Lisiewicz, 1972) und folglich eine Beeinflussbarkeit durch Kalziumchelatoren, wie z.B. von EGTA (Krnjević et al., 1978). In vitro konnte dies im folgenden Jahrzehnt auch für Hippocampuszellen gezeigt werden (Hotson und Prince, 1980; Schwartzkroin und Stafstrom, 1980).

Das Nachpotential kann durch den zeitlichen Verlauf in einen schnellen (fAHP), einen mittelschnellen (mAHP) und einen langsamen (sAHP) Anteil gegliedert werden (Lancaster und Nicoll, 1987; Storm, 1987). Das fAHP endet bereits nach wenigen Millisekunden und wird von kalzium- und spannungsabhängigen Kaliumkanälen mit großer Leitfähigkeit (big conductance), den BK-Kanälen, ausgelöst (Storm, 1987). Funktionell beeinflusst dieser Anteil des Nachpotentials die späte Repolarisation.

Das mAHP entsteht wenige Millisekunden nach dem Aktionspotential und hat eine Dauer von ca. 100 - 300 ms. Das Potential wird durch den Kalziumeinstrom in das Zytoplasma aktiviert und ist von der Spannung unabhängig. Einen großen Anteil an dem Strom haben SK-Kanäle, welche Kaliumkanäle mit geringer Einzelleitfähigkeit (small conductance) darstellen (Stocker et al., 1999; Stackman et al, 2002). Weitere Kaliumkanäle aus der BK- bzw. KCNQ- Familie haben ebenfalls einen Einfluss auf das mAHP (Gu et al., 2005; Gu et al., 2008; Schulz et al., 2012).

Am wenigsten aufgeklärt ist derzeitig die molekulare Grundlage des sAHP. Es kann bis zu mehreren Sekunden andauern und wird wie das mAHP durch einen Kalziumeinstrom aktiviert (Lancaster und Adams, 1986; Storm, 1989). Welche Kanäle dieses Potential ausbilden, konnte bisher noch nicht entdeckt werden (s. Übersichtsarbeit von Andrade, 2012). Hinweise finden sich aber sowohl auf Kanäle der SK- und der KCNQ-Familie (Fernandez da Sevilla et al., 2006; Soh et al., 2010; Yue und Yaari, 2004) als auch auf die K_{2P}-Familie (Zwei-Poren Kaliumkanal) (Ford et al., 2013). Der Strom wirkt modulierend bei der Frequenzkontrolle mit und reagiert sensitiv auf beta-adrenerge Rezeptorstimulation sowie zyklische Nukleotide, z. B. zyklisches Adenosinmonophoysphat (cAMP) (Madison und Nicoll, 1986; Pedarzani und Storm, 1993).

2.5. Proteinkinase CK 2 und TBB

Die Proteinkinase CK 2, auch bekannt als Casein Kinase 2, ist eine Seryl/Threonyl Proteinkinase, die evolutionär stabil und ubiquitär in eukaryoten Zellen sowie in Hefezellen vorkommt (Pinna und Meggio, 1997; Battistutta, 2009). Ihren Namen verdankt sie der Spaltung von Casein in vitro, wobei dieses Substrat unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper keine Rolle spielt (Blanquet, 2000). Die CK 2 kann sowohl ATP (Adenosintriphosphat) als auch GTP (Guanosintriphosphat) als Phosphatdonator verwenden und ist durch Heparin und 2,3 - Biphosphoglycerat inhibierbar. Im Gegensatz dazu nutzt die Proteinkinase CK 1 nur ATP und ist nicht durch die genannten Enzyme blockierbar (Hathaway und Traugh, 1983; Blanquet, 2000).

Die CK 2 existiert als Tetramer aus zwei katalytischen Untereinheiten α und α' sowie zwei regulatorischen β -Einheiten (Litchfield, 2003) und kommt im neuronalen Gewebe vor allem im Cortex sowie im Hippocampus vor (Blanquet, 2000). Die Konzentration im Hippocampus wird durch Stimulierung mit Kainat nicht beeinflusst (Wyneken et al., 2001). Weiterhin phosphoryliert das Enzym die Calmodulin-Kinase. Dies führt zu einer verminderten Kalziumsensitivität und möglicherweise durch eine verminderte Aktivität der SK-Kanäle zur Beeinflussung des Nachpotentials (Allen et al., 2007; Bildl et al., 2004; Keen et al., 1999). Des Weiteren ist Calmodulin für die Integration von SK-Kanälen in die Membran mit verantwortlich (Lee et al., 2003). Es beeinflusst so möglicherweise deren Funktionsfähigkeit und wirkt modulierend auf die Öffnungswahrscheinlichkeit von SK-Kanälen (Keen et al., 1999; Schumacher et al., 2001; Xia et al., 1998).

Um den weitreichenden Einfluss des Enzyms darzustellen, sei zusätzlich bemerkt, dass es ebenfalls den N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor modifiziert (Chung et al., 2004; Soto et al., 2004), welcher eine große Rolle bei der synaptischen Plastizität besitzt (Charriaut-Marlangue et al., 1991), sowie die Lernfunktion über den Phosphoinositol-3 Signalweg (Chao et al., 2007) beeinflusst.

Als selektiver Inhibitor dieses Enzyms steht 4,5,6,7 - Tetrabromobenzotriazol (TBB) zur Verfügung (Sarno et al., 2001). Dieser ist lipophil und kann oral appliziert werden. Als Inhibitor des Enzyms bewirkt er eine Reduktion der Frequenz und Amplitudenhöhe der durch NMDA-Rezeptoraktivierung auftretenden exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP) des Nucleus paraventrikularis des Hippocampus (PVN) (Ye et.al., 2011).

2.6. Zielstellung

Im Gegensatz zum mAHP ist bisher ist nur wenig über die zum sAHP gehörenden Ionenkanäle bekannt. Auch liegen kaum Erkenntnisse über mögliche Unterschiede zwischen den Nachpotentialen von epileptischen Tieren und Kontrolltieren vor. Die Proteinkinase CK 2 ist ein wichtiges Enzym im zentralen Nervensystem (Blanquet, 2000), dessen Einfluss auf das Erregungsniveau eines Neurons und deren Veränderung bei epileptischen Erkrankungen jedoch ungeklärt ist.

Daher sollen folgende Fragestellungen unter Verwendung des Tiermodells der pilocarpininduzierten Temporallappenepilepsie in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen werden:

- 1. Welcher Unterschied existiert im Nachpotential zwischen gesunden und epileptischen Tieren? Kann hierbei ein Unterschied im mAHP bestätigt werden?
- 2. Welchen Einfluss hat TBB als Inhibitor der Proteinkinase CK 2 auf das Nachpotential mit besonderer Betrachtung und Unterscheidung des mAHP und sAHP?
- 3. Beeinflusst TBB auch die Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks?
- 4. Welche Ionenkanäle könnten für das sAHP von Bedeutung sein?

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Materialien und Geräte

3.1.1.1. Pilocarpininduzierter Status epilepticus

Einmal-Pasteurpipette 3.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritze 1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Spritzenkanüle 16G	Braun, Melsungen, Deutschland
Waage	Ladenwaage, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Wistar Ratte	Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland

3.1.1.2. Präparation des Hippocampus

Aufbewahrungskammer	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Bad mit Thermostat: Haake C 10	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Begasungsfritte	Robu, Hattert, Deutschland
Brenner Labogaz 206	Camping Gaz, Hungen-Inheiden, Deutschland
Carbogen-Gas 5% CO ₂ , 95% O ₂	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Doppelspatel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Gasverteilungsrohr	Robu, Hattert, Deutschland
Perfusionskanüle: Microlance 3, 21G	BD, Franklin Lakes, USA
Kaltlichtquelle: KL 1500 LCD	Schott, Mainz, Deutschland
Kocherklemmen	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Mikroskopierschere	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Mikrowaage	Sartorius CP 225 D, Göttingen, Deutschland
Narkosekammer	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Pasteurpipette, gläsern, 50 mm	VWR international, West Chester, USA
Perfusorspritze 50ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pinzetten stumpf	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Reagiergefäß BD Falcon	BD, Franklin Lakes, USA
Rundfilter 55 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sauerstoff	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Sekundenkleber	UHU, Bühl, Deutschland
Silikonschläuche	VWR international, West Chester, USA
Skalpell	präzisa plus, P. J. Dahlhausen, Köln, Deutschland
Small animal decapitator	Stoelting, Wood Dale, USA
Spatellöffel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Stahlklingen	Campden Instruments, Campden, England
Stereomikroskop Leica MZ 6	Leica, Wetzlar, Deutschland
Transferpipetten	3,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vibratom: Integraslice 7550 MM	Campden Instruments, Campden, England

3.1.1.3. Elektrophysiologische Ableitungen

Absaugvorrichtung ALA VWK	ALA Scientific Instruments, Westbury, USA
Analog-Digital-Konverter	Power 1401, CED, Cambridge, England
Borosilikatröhrchen	GB150-10, Science Products, Hofheim, Deutschland
Extrazellulärverstärker	EXT-08, DPA-2F, npi electronics, Tamm, Deutschland
Faradaykäfig	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Frequenzgenerator	Master-8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Infusionsgerät	Intrafix Air P, Braun, Melsungen, Deutschland
Interfacekammer (extrazell.)	BSC-HAT, Harvard Apparatus, Holliston, USA
Inversmikroskop	Nikon Instruments, Melville, USA
Messkammer (Patch-clamp)	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Mikrofilter 0.22 μm, Millex GV	Millipore, Cork, Irland
Mikromanipulator (extrazell.)	LBM7, Scientifica, Uckfield, UK
Mikromanipulator (Patch-clamp)	burleigh PCS 4000, EXFO, Mississauga, Canada
Mikropipettennadel MicroFil MF28G	WPI, Saratota, USA
PatchClamp Verstärker EPC10	HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland
Perfusionscontroller	npi electronics, Tamm, Deutschland
Personalcomputer (Microsoft Windo	ws XP) HP, Palo Alto, USA

10 µl bis 100 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Pipette Pipette 100 µl bis 1000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich Pipettenspitzen Pipettenziehgerät P-97 Sutter Instrument, Novato, USA Platindraht 0.05 mm WPI, Sarasota, USA Pulsstimulator ISO-STIM 01D npi electronics, Tamm, Deutschland **Rollerpumpe Minipuls 3** Gilson, Villiers le Bel, Frankreich Silberdraht Science Products, Hofheim, Deutschland Spannungsgenerator ep 915 npi electronics, Tamm, Deutschland Temperaturregler TC-10 npi electronics, Tamm, Deutschland Tisch (schwingungsgedämpft) TMC, Peabody, USA

3.1.1.4. Weiteres Labormaterial

Glasflasche 500 ml, 1000 ml, 2000 ml Schott, Mainz, Deutschland Magnetrührer RH basic 2 IKA, Staufen, Deutschland Messkolben Hirschmann, Eberstadt, Deutschland Messzylinder Brand, Wertheim, Deutschland Osmometer Automatic, Knauer, Berlin, Deutschland pH-Meter CG840 Schott, Mainz, Deutschland Reagiergefäß Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Rundbodenglas Knauer, Zehlendorf, Deutschland Waage MC1 analytic AC 1205 Sartorius, Göttingen, Deutschland

3.1.2. Chemikalien

3.1.2.1 Chemikalien zur elektrophysiologischen Ableitung

CaCl ₂	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
D-(+)-Glucose	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	Merck / Roth, Darmstadt, Deutschland
KCI	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
K-Gluconat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
КОН	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
MgSO ₄	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Na-ATP	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Na-GTP	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaHCO ₃	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
NaMeSO ₄	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phosphokreatin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sucrose	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.1.2.2 Weitere Chemikalien

8-CPT-cAMP	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Diazepam	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Diethylether	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	Pfizer Pharma, Berlin, Deutschland
Methylscopolamin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Pilocarpin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Protease Typ XIV (Pronase)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tetraethylammonium	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Tetrodotoxin	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Tetrabromobenzotriazol	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland

3.1.3. Lösungen

Lösung	Salz	mmol/l
Isolationslösung	NaMeSO ₄	145
	KCI	3
	CaCl ₂	0,1
	MgSO ₂	4
	HEPES	10
	Glucose	15
	Osmolarität: 305 - 310 mOsm/kg; pH 7,4	

Präparationslösung	NaCl	60	
	KCI	2,5	
	CaCl ₂	0,1	
	MgSO ₄	4	
	HEPES	15	
	Glucose	11	
	Sucrose	137	
	Osmolarität: 305 - 310 mOsm/kg; pH 7,4		

Extrazelluläre Lösung (isolierte Zellen)

NaCl		125
KCI		3
CaCl ₂		2,5
MgSO ₄		1,25
HEPES		15
Glucose		10
Sucrose		30
NaH_2PO_4		1,3
0	210	

Osmolarität: 305 - 310 mOsm/kg; pH 7,4

Extrazelluläre Lösung (Feldpotentialmessungen)

NaCl	125	
NaHCO ₃	26	
КСІ	3	
NaH ₂ PO ₄	1,25	
CaCl ₂	2,5	
MgCl ₂	1,3	
Glucose	10	
O	210 m O am // m 11 7 4	

Osmolarität: 305 - 310 mOsm/kg; pH 7,4

Intrazelluläre Lösung	K-Gluconat	140
	HEPES	10
	MgCl ₂	2
	Phospho-Creatinin	10
	Na ₂ ATP	2
	Na ₂ GTP	0,4
	Osmolarität: 310 - 320 mOsm/kg; pH 7,3	

Die pH-Wert- Einstellung erfolgte durch Gabe von HCl bzw. NaOH. Bei der intrazellulären Lösung wurde zur Vermeidung zu hoher intrazellulärer Na⁺-Konzentrationen KOH zur Einstellung des pH-Werts verwendet.

Zum Ausgleich geringer Abweichungen der Osmolarität erfolgte die Gabe von Sucrose bzw. destilliertem Wasser.

3.2. Methoden

3.2.1. Status epilepticus

Der Pilocarpin assoziierte Status epilepticus wird bei männlichen Wistarratten (120 - 160 g, Charles River, Sulzfield) am 30. Tag nach ihrer Geburt induziert. Durch die starke cholinerge Wirkung des Pilocarpins sind ohne Vorbehandlung Nebenwirkungen, z.B. Bradykardie sowie Erhöhung der Speichel-, Schweiß- und Magensekretion, zu erwarten. Zur Reduktion dieser peripheren Nebenwirkungen und der Letalität während des Status epilepticus wird zunächst ein Anticholinergikum verabreicht (Tursky et al., 1983). N - Methylscopolamin wird als nicht-liquorgängiges Anticholinergikum 1 mg/kg intraperitoneal (i. p.) appliziert. Die Injektion von 340 mg/kg KG Pilocarpin i. p. erfolgt 30 min später. Bei den Tieren, die keine Anfälle innerhalb einer Stunde entwickeln, erfolgt einmalig eine zweite Injektion Pilocarpin in halber Dosierung. Durch diese Behandlung entwickeln ca. 70 % der Tiere motorische Anfälle, die in einen Status epilepticus übergehen. Der Status wird nach 40 min durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg KG Diazepam beendet. Kontrolltieren wird isotone Natriumchloridlösung mit gleichem Injektionsvolumen und Diazepam i. p. verabreicht.

Die Tiere werden im Anschluss zur Verringerung der Spätmortalität mit 5 % Glukoselösung rehydriert und in Einzelkäfigen in dem Tierstall untergebracht, der über einen festen Hell-Dunkelrhythmus verfügt (Tag: 6.00 - 18.00; Nacht 18.00 - 6.00) und klimatisiert ist. Die Tiere erholen sich schnell und werden unter gleichen Bedingungen mit Nahrung und Trinkwasser ad libitum gehalten, wobei Streu, Nahrung und Wasser regelmäßig gewechselt werden.

Nach einem anfallsfreien Intervall von zwei bis vier Wochen treten bei den mit Pilocarpin behandelten Tieren spontane motorische Anfälle auf. Zur Dokumentation dieser Anfälle werden Videoaufzeichnungen eingesetzt und zur histologischen Aufarbeitung der Schnitte die Timm - Färbung (Timm, 1958) angesetzt, um die Ausbildung einer Hippocampussklerose zu verifizieren (Vgl. Abb. 2.2.). Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen elektrophysiologischen Messungen finden in der chronischen Phase der Erkrankung sechs bis zwölf Wochen nach der Behandlung mit Pilocarpin statt.

3.2.2. Applikation von TBB

Sowohl Gruppen von Tieren, die mit Pilocarpin behandelt wurden, als auch Kontrolltiere erhalten über das Trinkwasser 6 µmol/kg KG TBB. Zunächst wird die tägliche Trinkmenge über mindestens vier Tage für jedes Tier bestimmt. Dann erfolgt die Gabe des Enzyminhibitors zum Trinkwasser. Über die Zeit der Medikamentengabe hinweg wird weiterhin auf das Gewicht, die Trinkgewohnheiten, das Anfallsverhalten sowie Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen geachtet. Bei Trinkmengenveränderung wird die Konzentration des TBB angepasst, so dass weiterhin 6 µmol/kg KG aufgenommen werden.

Die im nächsten Abschnitt beschriebene Entnahme des Hippocampus sowie die elektrophysiologischen Messungen werden am vierten Tag nach Beginn der Gabe des Inhibitors der Proteinkinase CK 2 vorgenommen. Während der elektrophysiologischen Messung der Zellen bzw. der Hippocampusschnitte wird 6 µmol/kg KG TBB in die extrazelluläre Lösung hinzugefügt.

3.2.3. Hippocampuspräparation

Die Narkose der Ratte wird zunächst Dimethylether eingeleitet, bevor das Anästhetikum S-Ketamin (100 mg/kg KG) sowie das Muskelrelaxans Xylazine-Hydrochlorid (Rompun) (10 mg/kg KG) injiziert wird. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgt zur Kühlung des Gehirns eine Perfusion von 4 °C kalter, sauerstoffgesättigter und auf Sucrose basierende extrazelluläre Lösung (s. 3.1.3., Präparationslösung), um das Überleben der Neurone zu steigern. Belegend für eine ausreichende Narkosetiefe sind die Erlöschung der Halte-, Stell- und Schmerzreflexe. Sind die Reflexe erloschen, wird die Bauchhöhle eröffnet und das Diaphragma dargestellt. An die Eröffnung des Thorax durch zwei parasternale Schnitte schließen sich die Resektion der ventralen Thoraxwand und die Eröffnung des Herzbeutels an. Es folgt die Darstellung und Abklemmung der Aorta descendens, anschließend die Kanülierung des linken Ventrikels und der Beginn der Perfusion der Lösung nach einer Stichinzision in das rechte Herzohr, um einem Hypertonus sowie einer Ödemwirkung entgegenzuwirken. Der Erfolg dieses Vorgehens ist bereits während der Prozedur durch das Abblassen der Vorderläufe, der Ohren und der Nase im Vergleich zu den weiterhin rosigen Hinterläufen gut sichtbar. Nachdem der Stoffwechsel durch die Kühlung herabgesetzt ist, wird das Gehirn entnommen. Dazu wird das Tier dekapitiert. Im Anschluss wird durch einen median geführten Schnitt mit dem Skalpell die Schädelkalotte freigelegt und gespalten. Ausgehend vom Medianschnitt vom Foramen magnum bis zum Bregma und zwei Schnitten nach anterolateral am Foramen magnum erfolgt die Eröffnung der Kalotte mit einer Pinzette. Das freiliegende Cerebellum wird mit einem Skalpell abgetrennt. Mit Hilfe eines gebogenen Spatels wird das Gehirn nun von der Schädelbasis unterminiert, von den Hirnnerven abgetrennt und in oxygenierte, gekühlte Lösung (Präparationslösung) überführt.

Die Hippocampusschnitte werden mit Hilfe eines Vibratoms ebenfalls in Präparationslösung hergestellt. Nach Fixierung des Gehirns durch Sekundenkleber werden 480 μ m dicke Schnitte mit einem Vortrieb von 12 - 16 μ m/s und einer Schwingungsfrequenz von 80 Hz für die Messungen gewonnen. Die Hippocampi werden mit einer gebogenen Kanüle exzidiert und in eine Aufbewahrungskammer mit extrazellulärer Lösung, die mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid (Carbogen) begast ist, überführt. Die beschriebenen Schnitte sind die Grundlage für die folgenden elektrophysiologischen Messungen.

3.2.4. Extrazelluläre elektrophysiologische Messungen

Von den präparierten Hippocampusschnitten wird der Cortex abgetrennt, um einen eventuellen kortikalen Einfluss auf die epileptische Aktivität auszuschließen. Die extrazellulären Ableitungen am isolierten Hippocampus werden bei 32 °C in mit Carbogen begaster Lösung durchgeführt. Sowohl die Referenzelektrode als auch die Messelektrode sind über einen chlorierten Silberdraht an den Verstärker angeschlossen. Die Messelektrode steht über eine Glaskapillare (Öffnungswiderstand: $2 - 3 M\Omega$) mit dem Bad in Kontakt und wird im Stratum pyramidale der CA 1 Region positioniert. Die Stimulationselektrode besteht aus einem teflonbeschichteten Platindraht, der im Stratum radiatum platziert ist. Eine Stimulation der Schaffer Kollateralen (s. Einleitung 2.1.) erfolgt durch Einzelpulse von 10 mA, deren Feldpotentiale über dem Stratum pyramidale der CA 1 Region abgeleitet werden. Stabile Reizantworten sowie fehlende Spontanaktivität über zehn Minuten sind die Voraussetzungen für die weitere Verwertung der Schnitte und deren Ergebnisse. Es folgt die Perfusion der Hippocampi mit einer magnesiumfreien extrazellulären Lösung, ansonsten mit gleicher Zusammensetzung (s. Lösungen im Abschnitt 3.1.3).

Die Reduktion des Magnesiums führt zu einer Induktion spontaner epileptiformer Entladungen (Mody et al., 1987). Die Aufnahme dieser Signale erfolgt über Verstärkung und Filterung bei 1 kHz.

Die Gruppen für die extrazellulären Ableitungen gliedern sich in:

- 1. unbehandelte Kontrolltiere (Kontrolle)
- 2. mit Pilocarpin behandelte Tiere (epileptisch)
- 3. Kontrolltiere mit 4 Tage TBB-Behandlung (Kontrolle + TBB)
- 4. Mit Pilocarpin behandelte Tiere mit 4 Tage TBB-Behandlung (epileptisch +TBB)

3.2.5. Isolation von Pyramidenzellen der Hippocampusregion CA 1

Zur Isolation einzelner Neurone wird in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß präoxygenierte Lösung (Isolationslösung, s. Lösungen im Abschnitt 3.3) gegeben. Im Anschluss erfolgt die Gabe von Pronase (Protease Type XIV, 3 mg/ml) und die Erwärmung auf 35 °C unter 100 % O₂-Begasung. Jeweils drei der Gewebeschnitte werden der Lösung hinzugefügt und für 20 - 25 Minuten dem Enzym ausgesetzt, welches hauptsächlich die Extrazellulärmatrix spaltet. Die Pronase wird im Anschluss ausgewaschen.

Die Hippocampusstruktur lässt sich auch nach der enzymatischen Behandlung auf Grund der nur gelockerten und nicht komplett aufgehobenen Matrix gut nachvollziehen, so dass im Anschluss die CA 1 Region unter einem Stereomikroskop auf einer mit Agar-Agar gefüllten Petrischale herauspräpariert werden kann. Die CA 1 Region wird nun vorsichtig trituriert. Trituration bezeichnet einen mechanischen Vorgang, um einzelne Nervenzellen zu lösen. Hierbei finden unter der Flamme langgezogene Pasteurpipetten mit unterschiedlich großen Öffnungen Verwendung. Nacheinander werden die Hippocampusschnitte mit den Pipetten in absteigender Öffnungsgröße eingesaugt und zurück in die Lösung gegeben, wodurch Nervenzellen aus dem Zellverband herausgelöst werden. Die entstandene Zellsuspension wird in eine Petrischale überführt, welche in das Inversmikroskop am Messplatz für isolierte Zellen gestellt wird. Während einer halben Minute ohne Perfusion setzen sich die Zellen am Boden ab. An den abgesetzten Neuronen werden Strom- und Spannungsmessungen vorgenommen, die im nächsten Abschnitt beschrieben sind.

3.2.6. Strom- und Spannungsmessungen an isolierten Zellen

Die Ganzzellableitungen von Neuronen werden an einem pneumatisch schwingungsgedämpften Tisch an einem Inversmikroskop durchgeführt. Das Mikroskop verfügt über Objektive mit zehnfacher und 40 facher Vergrößerung. An dem horizontal und vertikal bewegbaren Mikroskoptisch ist ein Perfusionssystem auf Basis von Perfusionsspritzen, T-Stücken sowie Silikonspritzen eingerichtet. Dieses ermöglicht sowohl eine kontinuierliche Lösungszufuhr (siehe 3.1.3. Extrazelluläre Lösung) als auch eine separate Applikation von TEA und TTX. In eigener Herstellung sind zu- und abführende Perfusionseinheiten sowie die Befestigung der Referenzelektrode installiert. Am Tag einer Messung werden die Patchpipetten aus Borosilikatröhrchen an einem horizontalen Pipettenziehgerät auf einen Öffnungswiderstand von 4 - 7 M Ω gezogen und vor dem Ableitungsversuch retrograd mit Intrazellulärflüssigkeit gefüllt. Die Pipette ist über einen chlorierten Silberdraht, der als Ableitelektrode dient, mit dem Vorverstärker verbunden. Die Ganzzellableitungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt (Hamill et al., 1981).

Die Pipetten werden langsam unter Applikation eines geringen Überdrucks zur Vermeidung von Anlagerungen von Partikeln an der Spitze an die Zelle herangeführt. Hierbei lässt sich die Pipette in der z-Achse über verschiedene Geschwindigkeitsstufen über einen Joystick bewegen, die x- und y-Achse werden manuell eingestellt. Beim Heranführen an die Zelle nimmt der Widerstand zunächst leicht und nach Ablassen des Überdrucks und Setzen eines leichten Unterdrucks bis in den Gigaohmbereich zu, so dass ein sogenannter Gigaseal entsteht, welcher ein Anzeichen für einen festen Zell-Pipetten-Kontakt darstellt. Das Setzen eines kurzen Unterdrucks zur Öffnung der Zellmembran unterhalb der Pipettenspitze erfolgt, um einen stabilen Zugang zur Zelle zu schaffen. Nach kurzer Ruhephase, in der sowohl langsame (Cs) und schnelle (Cf) Stromtransienten als auch Leckströme automatisch kompensiert und kontinuierlich überwacht werden und in der der Serienwiderstand und das Ruhemembranpotential konstant bleiben, werden die Messungen gestartet. Die Serienwiderstände der ausgewerteten Zellen betragen 4 - 15 M Ω und werden während des gesamten Experiments überwacht.

In die Auswertung können die Nervenzellen eingeschlossen werden, deren Ruhemembranpotential negativer als -50 mV ist und deren Serienwiderstand und Kapazität

konstant bleiben. Die Kriterien sind bei 99 Zellen aus 51 Tieren erfüllt. Die Nervenzelle wird bei einem Potential von -60 mV gehalten.

Es können sowohl der Strom vorgegeben und die Spannung gemessen (current clamp) oder der fließende Strom bei gesetzter Spannung (voltage clamp) abgeleitet werden. Die Überprüfung der spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle erfolgt anhand eines rampenförmigen Spannungsanstiegs (kontinuierlicher Anstieg von -80 mV bis 60 mV über 100 ms). Aktionspotentiale werden durch eine Strominjektion von 200 pA über 3 ms ausgelöst (s. Abb. 3.1.). Für die Messung des langsamen (sAHP) und mittleren Nachpotentials (mAHP) werden spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle durch Badapplikation von TTX (500 µmol) und TEA (1 mmol) geblockt. Im Anschluss erfolgt in der Spannungsklemme eine Depolarisierung von -60 mV auf 60 mV für 100 ms, eine kurze Hyperpolarisierung auf -120 mV für 2 ms, bevor die Zelle wieder auf -60 mV geklemmt wird. Dieses Protokoll wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen genutzt, um einen nachpotentialabhängigen Strom in Form eines kalziumabhängigen Auswärtsstroms zu induzieren (Hammond et al., 2006; Schulz et al., 2012) (Vgl. Abb. 3.2.).

Die Versuchsreihen für die Messungen an isolierten Zellen gliedern sich wie folgt:

Sowohl epileptische Tiere als auch Kontrolltiere sind in folgende Untergruppen aufgeteilt:

- 1. nicht mit TBB behandelte Tiere (Kontrolle bzw. epileptisch unbehandelt)
- 2. mit TBB behandelte Tiere (im Folgenden Kontrolle TBB oral bzw. epileptisch TBB oral genannt)
- unbehandelte Tiere, deren hippocampale Schnitte bei der Isolierung 6 μmol/kg TBB der Lösung hinzugefügt wird (TBB in Lösung).

Die Gabe eines cAMP-Analogons erfolgt intrazellulär über die Pipette, so dass sich weitere Gruppen sowohl für Kontrollen als auch für die mit Pilocarpin vorbehandelten Gruppen mit und ohne orale TBB-Gabe anschließen.

Abbildung 3.1.



В



Abb. 3.1. Darstellung eines Aktionspotentials. Der Verlauf eines Aktionspotentials und dessen Nachpotential einer isolierten Pyramidenzelle der CA 1 Region in der Stromklemme. Ein Aktionspotential wird durch einen Stromimpuls von 200 pA über 3 ms (B) ausgelöst.

In der vorliegenden Arbeit werden am Potentialverlauf folgende Werte bestimmt:

Die Amplitude eines Aktionspotentials (der Bereich von Punkt 1 bis 3), die Breite des APs, welches an der halbmaximalen Amplitude bei Punkt 2 gemessen wird. Als Amplitude des Nachpotentials wird die Differenz zwischen Punkt 3 und 4 bestimmt. τ ist die Zeit in ms, die benötigt wird, bis 63 % der Spannung abgefallen ist.

Das Aktionspotential wird zur besseren Sichtbarkeit des kleinen Nachpotentials im Ergebnisteil nicht dargestellt (Vgl. Abb. 4.3.).

Abbildung 3.2.



Abb. 3.2. Darstellung des nachpotentialabhängigen Stromes. An einer isolierten Nervenzelle erfolgt nach Gabe von TTX und TEA zur Blockierung der spannungsabhängigen Na⁺- und K⁺-Kanäle die Messung des nachpotentialabhängigen Stromes in der Spannungsklemme (A). Im Ergebnisteil wird auf die Darstellung der Stimulationsphase verzichtet, um sichtbar den relativ kleinen Nachstrom herausheben zu können (B). Zur Stimulation wird die Nervenzelle von -60 mV auf 60 mV für 100 ms depolarisiert und anschließend für 2 ms auf -120 mV hyperpolarisiert (C). Um den Anteil des sAHPabhängigen Stromes bzw. der Ladungsmenge zu quantifizieren und zu vergleichen, wird die Fläche unter der Kurve von 400 ms (Punkt 1) bis 2400 ms (Punkt2) errechnet.

3.2.7. Datenaufnahme und statistische Analyse

Die Strom- und Spannungsmessungen an isolierten Nervenzellen werden über Patch-clamp amplifier EPC 10 und Patchmaster 2.11 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) aufgenommen und analysiert. Für die Datenaufnahme der extrazellulären Messungen wird Signal 2.16 (Cambridge Elektronic Design, Cambridge, Vereinigtes Königreich) genutzt. Die statistische Datenauswertung erfolgt durch SigmaStat 3.5 (Systat Software, Point Richmond, USA) und die Darstellung durch MS Office Excel 2010 (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland).

Die Angaben werden als Mittelwerte mit den Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM, engl.: standard error of the mean) dargelegt. Nachdem die Prüfung der Normalverteilung erfolgt ist, wird die statistische Signifikanz durch den Student-t-Test vom ungepaarten Typ berechnet. Hierbei wird ein Fehler p < 0.05 als signifikanter Unterschied angenommen und in den Abbildungen mit einem Sternchen (*) definiert. Für p < 0.01 werden zwei und für p < 0.001 drei Sternchen verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Veränderungen der synchronen neuronalen Aktivität in der CA 1 Region durch TBB

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wird zunächst auf die Auswirkungen einer Inhibition der Proteinkinase CK 2 durch TBB im neuronalen Netzwerk der CA 1 Region des Hippocampus eingegangen. Gemessen werden Feldpotentiale nach einer extrazellulären Reduktion von Magnesium. Bei Reduktion des Magnesiums kommt es zu einer Lösung des Magnesiumblocks von NMDA-Rezeptoren an Neuronen in Hippocampusschnitten von Kontrolltieren und epileptischen Tieren. Dies führt zu einem verstärkten Calciumeinstrom und zu vermehrt auftretenden spontanen, synchronen Entladungen (Mody et al., 1987) in der CA 1 Region. Ausgewertet wird die Frequenz dieser Erregungen.

Im zeitlichen Verlauf (siehe Abb. 4.1. (B)) treten die epileptiformen Erregungen bei Kontrolltieren mit einer geringeren Latenzzeit als bei den mit Pilocarpin behandelten Tieren auf, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist. Die Entladungsfrequenz steigt in Schnitten der epileptischen Tiere steiler an als in Kontrollgeweben. Ein wesentlicher erster Befund ist, dass innerhalb des Beobachtungszeitraumes unter TBB-Vorbehandlung praktisch keine synchronen Entladungen auftraten. Die Vorbehandlung reduziert die Entladungsfrequenz im 60 Minuten nach Auswaschen Netzwerk massiv. von Magnesium liegt die Entladungsfrequenz in Kontrollpräparaten bei 3,7 Entladungen/min (± 1,2; (n=9)) und in Präparaten aus den epileptischen Tieren bei 5,8 Entladungen/min (± 1,8; n=10) (nicht signifikant). Bei Präparaten aus TBB-vorbehandelten Tieren zeigt sich ein anderes Bild: epileptogene Aktivität tritt nur in 2 von 11 Präparaten aus Kontrolltieren und keinem Präparat aus Pilocarpin-vorbehandelten Tieren auf. Die Entladungsfrequenz liegt in Kontrollpräparaten bei 0,4 (± 0,2; n=11) bzw. 0,0 Entladungen/min (± 0,0; n=12)) in epileptischem Gewebe (siehe Abb. 4.1. (C)).

Zusammenfassend reduziert eine Vorbehandlung der Tiere mit TBB die Netzwerkerregbarkeit der CA 1 Region signifikant.

Abbildung 4.1.





Abb. 4.1. Feldpotentialmessungen nach Magnesiumreduktion. In den Abbildungen ist die Wirkung von TBB auf die durch den Entzug von Magnesium ausgelösten spontanen epileptischen Erregungen dargestellt. (A) stellt exemplarisch Feldpotentiale 60 min nach Magnesiumreduktion dar. Die abgebildete Dauer beträgt 30 s. Bereits hier ist zu sehen, dass sowohl bei unbehandelten als auch bei mit Pilocarpin behandelten Tieren synchrone Erregungen zu verzeichnen sind. Die Tiere, die über 4 Tage mit TBB oral vorbehandelt worden sind, zeigen nur eine verminderte Frequenz von Feldpotentialen.

Der zeitliche Verlauf ist in der Teilabbildung (B) dargestellt. Der Zeitpunkt 0 kennzeichnet den Beginn der Magnesiumreduktion. Die Kontrollschnitte reagieren etwas früher, jedoch steigt die Zahl der epileptiformen Aktivitäten bei den pilocarpinisierten Tieren stärker an, wobei dies nicht signifikante Beobachtungen sind. Der Unterschied zur TBB-Vorbehandlung ist bereits hier nachzuvollziehen.

Die epileptischen Entladungen pro Minute nach einer Stunde Magnesiumauswasch sind in Abbildung (C) als Balkendiagramm dargestellt, um die im Zeitverlauf geschilderten Beobachtungen zu verdeutlichen.

С

4.2. Veränderung des Aktionspotentials

Im Folgenden wird auf funktionelle Veränderungen einzelner Pyramidenzellen in der Hippocampusregion CA 1 eingegangen. Hierbei werden Strom- und Spannungsmessungen im Patch-clamp-Verfahren an isolierten Nervenzellen durchgeführt. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Zellkapazität, Membranwiderstand und Zellen Ruhemembranpotential zwischen von Kontrolltieren (19,8 ± 1,5 pF; 93,1 ± 10,5 MΩ; -55,1 ±0,9 mV) und epileptischen Tieren (16,9 ± 1,8 pF; $91,4 \pm 12,1 \text{ M}\Omega; -53,3 \pm 0,8 \text{ mV}).$

Bei Betrachtung des Einzelaktionspotentials wird als erstes auf die Breite des Potentials bei halbmaximaler Amplitude eingegangen (vgl. Abb. 3.1.). Hierbei zeigen alle Gruppen ähnliche Werte ohne signifikante Unterschiede. Spezifisch bedeutet dies für die Kontrollen ohne weitere Behandlung eine Dauer von 2,47 ms (\pm 0,16; n=15), bei intrazellulärer Gabe von cAMP-Analogon 2,50 ms (\pm 0,16; n=6), bei Gabe von TBB in die Lösung 2,47 ms (\pm 0,31; n=3), nach oraler Applikation von TBB 2,44 ms (\pm 0,25; n=8) und nach oraler Applikation von TBB und intrazellulärer Gabe von cAMP-Analogon 1,99 ms (\pm 0,22; n=6).

Bei mit Pilocarpin behandelten Ratten ohne TBB-Gabe liegen die Werte bei 2,37 ms (\pm 0,08; n=11), nach intrazellulärer cAMP-Analogon Gabe 2,80 ms (\pm 0,09; n=3), nach TBB-Gabe in die Lösung 2,09 ms (\pm 0,16; n=7), bei längerer TBB-Applikation 2,53 ms (\pm 0,18; n=12) und mit zusätzlichem cAMP-Analogon 2,30 ms (\pm 0,26; n=7). In Abb. 4.2. sind diese Daten in einem Diagramm zusammengefasst.

Die Amplituden zeigen ebenfalls keine signifikanten Differenzen. Sie liegen bei 90,0 mV (\pm 3,2), 93,2 mV (\pm 4,7), 83,0 mV (\pm 5,4), 86,7 mV (\pm 7,3) und 91,7 mV (\pm 5,6) bei den Kontrollen. In den Gruppen der epileptischen Tiere finden sich Amplituden von 89,1 mV (\pm 4,6), 84,5 mV (\pm 12,4), 90,1 mV (\pm 5,8), 84,1 mV (\pm 5,0), 99,7 mV (\pm 3,9).

Einzelne Aktionspotentiale ändern sich weder durch orale TBB Vorbehandlung noch durch Gabe eines cAMP-Analogons.
Abbildung 4.2.



Abb. 4.2. Darstellung der Dauer von Aktionspotentialen unter Applikation von TBB bzw cAMP-Analoga. Aus den Spannungsmessungen an isolierten Nervenzellen sind in der Abbildung (A) beispielhaft einzelne Aktionspotentiale eines Kontrolltieres und eines mit Pilocarpin behandelten Tieres dargestellt. In Amplitude und Breite der Aktionspotentiale treten keine signifikanten Differenzen in den unterschiedlichen Gruppen auf. Die Breite eines einzelnen Aktionspotentials bei halbmaximaler Amplitude ist in (B) aufgetragen. Auch hier finden sich keine signifikanten Unterschiede. Das Aktionspotential wird durch einen Stromimpuls von 300 pA über 3 ms ausgelöst.

4.3. Veränderung des Nachpotentials nach einem einzelnen Aktionspotential

4.3.1. Amplitudenveränderung

In diesem Kapitel wird auf die Veränderungen des Nachpotentials eingegangen, zunächst auf die Amplituden der Potentiale. Die Amplitude des Nachpotentials bei den Kontrollen beträgt 4,13 mV (\pm 0,55; n=15), bei zusätzlicher intrazellulärer Gabe von cAMP-Analogon 3,68 mV (\pm 0,71; n=6), bei Gabe von TBB in die Lösung 3,03 mV (\pm 0,10; n=3), nach oraler Applikation von TBB 3,08 mV (\pm 0,42; n=8) und nach oraler Applikation von TBB und intrazellulärer Gabe von cAMP-Analogon 2,41 mV (\pm 0,64; n=6).

In der Gruppe der mit Pilocarpin behandelten Tiere ist die Amplitude ohne weitere Behandlung 3,24 mV (\pm 0,31; n=11), nach intrazellulärer cAMP-Analogon Gabe 5,6 mV (\pm 1,9; n=3), nach Gabe von TBB in die Lösung 2,69 mV (\pm 0,81; n=7), bei längerer TBB Applikation 3,56 ms (\pm 0,36; n=12) und mit zusätzlicher Gabe eines cAMP-Analogons 3,47 ms (\pm 0,93; n=7) groß. Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich.

4.3.2. Veränderung der Länge des Nachpotentials

Neben der Amplitude des Nachpotentials (AHP) gibt auch die Dauer über mögliche Beeinflussung der zellulären Erregbarkeit weitere Aufschlüsse. Hier wird die Zeitkonstante τ bestimmt (wie in Abb. 3.1. gezeigt). In der Gruppe der Kontrolltiere ohne weitere Behandlung liegt τ bei 37,1 ms (± 4,4; n=15), bei intrazellulärer Gabe von cAMP-Analogon verkürzt sich die Zeit auf 19,5 ms (± 2,4; n=6), bei Gabe von TBB in die Lösung liegt τ bei 32,7 ms (± 2,9; n=3), nach oraler Applikation von TBB verlängert sich τ auf 45,0 ms (± 6,4; n=8). Nach oraler Applikation von TBB und intrazellulärer Gabe von cAMP-Analogon liegt die Zeitkonstante bei 12,8 ms (± 4,7; n=6).

Die mit Pilocarpin behandelten Ratten ohne TBB-Gabe haben im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 21,9 ms (\pm 3,1; n=11) ein signifikant kürzeres AHP. Durch orale TBB-Applikation verlängert sich τ auf 39,0 ms (\pm 4,4; n=11). Dieser Effekt lässt sich durch zusätzliche Gabe eines cAMP-Analogons, wie bei den Kontrolltieren, revidieren (14,2 ms (\pm 4,1; n=7)). Eine TBB-Gabe, die nur in die Lösung (inkl. Inkubationszeit 45 - 60 min) erfolgt, hat keinen Effekt (17,5 ms (\pm 3,2; n=6)).

33

Abbildung 4.3.



Abb. 4.3. Nachpotential eines Aktionspotentials. In Abbildung (A) sind die Nachpotentiale nach einem einzelnen Aktionspotential dargestellt. Das Nachhyperpolarisation ist bei den epileptischen Ratten signifikant kürzer. Durch langzeitige orale Applikation von TBB verlängert sich das Potential bei den mit Pilocarpin behandelten Tieren signifikant. Durch zusätzliche intrazelluläre Gabe von 8-CPT-cAMP revidiert sich dieser Effekt in beiden Gruppen. In (B) sind die gemssenen Ergebnisse im Balkendiagramm dargestellt. Es wurde die Zeitkonstante τ bestimmt und aufgetragen. Eine kurzzeitige Gabe von TBB in die Lösung hat keinen signifikanten Effekt.

4.4. Veränderungen des mAHP-abhängigen Stromes im Pilocarpinmodell der Temporallappenepilepsie

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der Messungen in der Spannungsklemme bezüglich des AHP-abhängigen Stromes nach 100 ms Stimulationszeit eingegangen. Hierbei sind zunächst der mittlere Anteil und die Amplitude des Nachpotentials bezogen auf die Zellgröße im Blickpunkt. Ein Maß für die Zellgröße ist die Kapazität einer Zelle.

Vergleicht man zunächst die unbehandelten Wistarratten mit den epileptischen, fällt ein signifikanter Unterschied von 15,72 pA/pF (± 1,14; n=14) zu 10,12 pA/pF (± 1,48; n=14) auf (s. Abb. 4.4.). Um eine Verfälschung der Daten durch eine mögliche Überlagerung mit dem schnellen Anteil des AHP (fAHP) auszuschließen, ist dieses bei allen Messungen durch TEA geblockt.

4.5. Veränderungen des mAHP-abhängigen Stromes durch die Gabe von TBB

Nach dem Vergleich der Kontrollgruppe zu den Gruppen des Epilepsiemodells wird nun die Veränderung durch TBB und cAMP-Analoga betrachtet.

Bei den Kontrolltieren gibt es weder bei oraler TBB Gabe (14,77 pA/pF (± 1,91; n=8)) noch bei Gabe von TBB in die Lösung (15,94 pA/pF (± 2,81; n=7)) signifikante Unterschiede. Die intrazelluläre Applikation von cAMP-Analogon bei unbehandelten Tieren (11,85 pA/pF (± 1,23; n=6)) und bei vorheriger oraler TBB Gabe (13,94 pA/F (± 2,56; n=6)) bewirkt ebenfalls nur leichte, nicht signifikante Unterschiede, wie in Abbildung 4.4. gezeigt. Für epileptische Tiere gilt dies in ähnlicher Weise. Hier zeigt sich bei den Neuronen, die neben Pilocarpin zu Beginn keine weitere Behandlung bekommen, ein mAHP abhängiger Strom von 10,12 pA/pF (± 1,48; n=14). Dieser Wert ist weder bei oraler TBB Gabe (10,83 pA/pF (± 1,54; n=12)) noch bei alleiniger Hinzugabe in die Lösung (9,52 pA/pF (± 1,32; n=9)) signifikant verändert. Die Gabe eines cAMP-Analogon bei vorheriger TBB Gabe (7,69 pA/pF (± 1,41; n=6)) sowie bei unbehandelten Tieren (9,69 pA/pF (± 2,20; n=3)) ergibt auch hier keine signifikanten Unterschiede. In Abbildung 4.4. sind die beschriebenen Veränderungen des mAHP-abhängigen Stromes im Diagramm dargestellt.

Der mAHP abhängige Strom trägt den Daten der vorliegenden Arbeit zufolge nicht zur Verlängerung der Nachhyperpolarisation bei.

Abbildung 4.4.



В

С



Abb. 4.4. Der mAHP-abhängige Strom im Pilocarpinmodell. Abgebildet ist der Strom, der vom mAHP abhängig ist, in der Spannungsklemme. Ausgewertet wird die Amplitude nach einer Depolarisation auf 60 mV, wie sie in Abb. 3.2. dargestellt ist. Der Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den mit Pilocarpin vorbehandelten Tieren ist signifikant. Das mAHP ist jedoch unabhängig von TBB und cAMP-Analoga.

4.6. Veränderungen des sAHP-abhängigen Stromes im Pilocarpinmodell

In der Stromklemme zeigen sich Veränderungen des Nachpotentials sowohl durch TBB als auch durch cAMP-Analoga, jedoch ist keine Veränderung im mAHP-abhängigen Strom messbar. In diesem Abschnitt wird daher auf den Strom, der vom langsamen Potential (sAHP) abhängig ist, eingegangen. Ausgewertet wird hierbei aus der Messung des Nachstromes die Fläche unter der Kurve von 400 ms bis 2400 ms (vgl. hierzu Abb. 3.2.) und zur Größe der Zelle in Bezug gesetzt. Als Maß für die Zellgröße wird wieder die Kapazität gewählt.

Beim Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere und der pilocarpinisierten Tiere besteht kein signifikanter Unterschied. Der sAHP-abhängige Strom liegt bei den Kontrolltieren bei 1,25 pAs/pF (\pm 0,42; n=14) und ist im Vergleich zu den pilocarpinbehandelten Tieren mit 0,77 pAs/pF (\pm 0,32; n=14) etwas geringer (s. Abb. 4.5.). Insgesamt zeigen sich nur sehr kleine Ströme.

4.7. Veränderungen des sAHP-abhängigen Stromes durch die Gabe von TBB

Aus den bisherigen Daten der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass der mittlere Anteil des Nachpotentials bei Epilepsie verringert ist und durch TBB und cAMP-Analoga nicht beeinflusst wird.

Beim langsameren Anteil des Nachpotentials zeigt sich kein Unterschied zwischen Kontrolltieren und den epileptischen Tieren. Auf die Beeinflussbarkeit durch TBB und cAMP-Analoga wird jetzt eingegangen. An den Beispielspuren in Abbildung 4.5. ist zu erkennen, dass die orale TBB Gabe einen deutlichen Effekt auf den vom langsamen Potential abhängigen Strom hat. Während die initialen Amplituden gleich blieben, zeigt sich bei der oralen Gabe von TBB ein langsamerer Abfall des Stromes.

Die vom langsamen Potential abhängige Ladungsmenge erhöht sich bei oraler TBB Gabe um gut 350% auf 4,45 pAs/pF (± 1,33; n=8) bei den Kontrollen, im Vergleich zu 1,25 pAs/pF (± 0,42; n=14) bei den Tieren ohne Vorbehandlung. Bei den epileptischen Tieren erhöht sich die Ladungsmenge um ca. 250% auf 2,04 pAs/pF (± 0,47; n=12). Hier liegt der Vergleichswert bei 0,77 pAs/pF (± 0,32; n=14). Die Steigerung ist jeweils signifikant. In den Schnitten, bei denen TBB nur akut in die extrazelluläre Lösung und nicht oral gegeben wurde, liegt die Ladungsmenge des sAHP im Mittel bei 0,70 pAs/pF (± 0,59; n=7) bei den Kontrollgeweben und 0,53 pAs/pF (± 0,55; n=9) bei den mit Pilocarpin behandelten Präparaten.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den Veränderungen des hinzugekommenen, langsam auftretenden und hyperpolarisierenden Stromes auch um Beeinflussung der Kanäle handelt, die für das sAHP verantwortlich sind, wird 8-CPT-cAMP in die Intrazellularlösung gegeben. Hierbei handelt es sich um ein Analogon des cAMP (Vgl. Einleitungsthema 2.4.). Durch die Applikation verringert sich das sAHP in den Gruppen ohne TBB (Kontrollen: 0,52 pAs/pF (\pm 0,14; n=6); Pilocarpin: 0,52 pAs/pF (\pm 0,14; n=3)) nicht signifikant. In den Gruppen, die TBB chronisch aufnahmen (Kontrollen: 0,29 pAs/pF (\pm 0,14; n=6); Pilocarpin: 0,49 pAs/pF (\pm 0,13; n=6)), ist der Unterschied signifikant. Zur Übersichtlichkeit der genannten Daten sind diese im Diagramm in Abbildung 4.5. dargestellt.

Eine chronische TBB-Vorbehandlung und damit einhergehende CK 2 Blockade führt zu einer deutlichen Erregbarkeitsdämpfung (s. Abschnitt 4.1.), die durch eine erhebliche Steigerung des sAHP-assoziierten Stromes (s. Abschnitt 4.7) bedingt sein könnte.

Abbildung 4.5.







Abb. 4.5. Der sAHP-abhängige Strom im Pilocarpinmodell. Die Abbildung zeigt den vom Nachpotential abhängigen Strom in der Spannungsklemme.

In (A) ist beispielhaft der Strom nach einer Depolarisation von verschiedenen Gruppen dargestellt. Auf die Darstellung der Stimulationsphase ist zur Übersichtlichkeit verzichtet worden. Bereits an den Spuren lässt sich die Amplitude beurteilen, welche in den Abschnitten 4.4. und 4.5. als mAHP-abhängiger Strom ausgewertet wurde. Dieser bleibt sowohl in den Kontrollgruppen als auch bei den epileptischen Tieren durch TBB- und cAMP-Analogon-Gabe unbeeinflusst (Vgl. Abb. 4.4.).Betrachtet man den weiteren Verlauf der Kurve fällt bei den mit TBB oral behandelten Tieren ein deutlich langsamerer Abfall des Stromes auf. Dieser Anstieg kennzeichnet den vom sAHP abhängigen Strom.

Die Abbildung (B) stellt den sAHP-abhängigen Strom als Fläche unter der Kurve im Bereich von 400 ms - 2400 ms (pA*s/pF) und damit als Ladungsmenge von Kontrolltieren und von mit Pilocarpin behandelten Tieren grafisch dar. Hierbei weisen die Gruppen, die TBB getrunken haben, signifikant höhere Werte auf. Weiterhin zeigt sich aus den Daten, dass dieser Effekt durch die intrazelluläre Gabe eines cAMP-Analogon revidierbar ist. TBB nur in der Lösung hat hierbei nicht dieselbe Wirkung. Der Kurvenverlauf dieser Spuren ist denen der nativen Zellen ähnlich.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss der Proteinkinase CK 2 durch Inhibierung über TBB auf die neuronale Aktivität zu untersuchen. Hierbei stehen besonders das Nachpotential und der kalziumabhängige Kaliumstrom im Blickfeld der Betrachtung. Weiterhin soll auf die Auswirkung eventueller Veränderungen des Nachpotentials im Pilocarpin Modell der Temporallappenepilepsie eingegangen werden.

Bisher beschäftigten sich viele Arbeiten über das Verständnis von Epilepsie auf den Vergleich zwischen Erregung und Hemmung (Zhan et al., 2010; Ziburkus et al., 2013) in Form von Änderungen an glutamatergen bzw. GABAergen Rezeptoren (Barnard et al., 1998; Loup et al., 2000; Madsen et al., 2010; Rowley et al., 2012) sowie auf Veränderungen in den Natrium- bzw. Kalziumströmen (Chen et al., 2011; Ellerkmann et al., 2003; Keele et al., 2000; Su et al., 2002). Gebräuchliche Antiepileptika wie Valproat, Phenytoin oder Carbamazepin finden auch an diesen Mechanismen ihren Angriffspunkt (Brodie, 2010; Das et al., 2012).

In dieser Arbeit wird der Kaliumstrom untersucht, der nach einer Erregung auftritt. Aufgrund der Dauer von bis zu zwei Sekunden spielt dieser bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials eine große Rolle (Übersichtsartikel von Andrade et al., 2012). Das langsame Nachpotential ist Thema vieler experimenteller Arbeiten; so ist nach der bisherigen Studienlage u. a. bekannt, dass es einen modulierenden Einfluss auf die Erregbarkeit besitzt sowie der dazugehörige Strom durch cAMP-Analoga und Katecholamine blockierbar ist (Andrade et al., 2012). Über die Veränderung des sAHP bei der Temporallappenepilepsie ist nur wenig bekannt. Es wurde jedoch bereits ein vermindertes sAHP bei durch Hyperthermie induzierten Krampfanfällen am Tiermodell gezeigt (Kamal et al., 2006) und auch im genetischen Modell der genetically epilepsy-prone rat (GEPR) wurde ein verminderter kalziumabhängiger Kaliumstrom festgestellt (Verma-Ahuja et al., 1995). Dies sind Hinweise darauf, dass ein vermindertes sAHP zu einer verstärkten Erregbarkeit führen kann.

In den letzten Jahren legten weitere Studien dar, dass kalziumabhängige Kaliumströme (sowohl die BK-Kanäle als auch die SK-Kanäle) in verschiedenen Epilepsiemodellen am Tier und bei bestimmten Epilepsieformen beim Menschen verringert sind (Lorenz et al., 2007;

41

Oliveira et al., 2010; Pacheco-Otalora et al., 2008; Schulz et al., 2012; Yang et al., 2010), wodurch diese Stromklasse für die Epilepsieforschung interessant wurde. Weiterhin besitzen in der Patientenversorgung bereits eingesetzte Antiepileptika, wie z.B. Carbamazepin und Lamotrigin, zusätzlich zu ihrer hemmenden Wirkung an Natrium- bzw. Kalziumkanälen einen positiven Einfluss auf die Kaliumleitfähigkeit (Zona et al., 1990; Zona et al., 2002) und eine Mutation am Kaliumkanal KCNQ2/3 wurde in einer Form der kindlichen Epilepsie entdeckt (Singh et al., 1998). Nach diesen Forschungsergebnissen wurde versucht, Medikamente zu entwickeln, die die Kaliumleitfähigkeit erhöhen und so eine Übererregbarkeit bremsen. Mit Retigabine steht der erste Kaliumkanalöffner als Antiepileptikum zur Verfügung (Übersichtsartikel von Czuczwar et al., 2010). Seit 2011 ist das Medikament in der EU und der USA zugelassen.

Die vorliegende Arbeit soll weiterhelfen, die Rolle des Kaliumstromes bei der Epilepsie zu klären.

5.1. Orale Applikation von TBB verringert die epileptische Aktivität im neuronalen Netzwerk

Aufbauend auf den bisherigen Betrachtungen zeigt die vorliegende Arbeit, dass die orale Applikation von TBB zu einer deutlich verringerten Erregbarkeit in der CA 1 Region des Hippocampus führt. Bei den Tieren ohne TBB kommt es in allen Hippocampusschnitten nach einer Stunde zu spontanen Erregungen, diese Anzahl verringert sich, wie im Ergebnisteil gezeigt, deutlich bei den mit TBB vorbehandelten Tieren. Bei diesen Gruppen kommt es nur in zwei Hippocampi zu ersten Spontanaktivitäten nach einer Stunde. Wie in der Einleitung dargestellt, handelt es sich bei der CA1 Region um ein Gebiet, das bei der mesialen Temporallappenepilepsie häufig am stärksten betroffen ist (Blümcke et al., 2007) und das daher auch als epileptogene Zone diskutiert wird.

Es zeigt sich ein antikonvulsiver Effekt in vitro in der am stärksten betroffenen Hippocampusregion, auf dessen zellulären Mechanismus im Folgenden eingegangen wird.

5.2. Senkung des mAHP-abhängigen Stromes im Pilocarpinmodell und dessen Unabhängigkeit von TBB

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass es zu einer Reduktion des vom mAHP abhängigen Stromes bei unbehandelten epileptischen Tieren des Pilocarpinmodells im Vergleich zu den Kontrolltieren kommt. In der Arbeit von Schulz et al., 2012 wurde ein für SK-Kanäle typischer Blocker, UCL 1684, eingesetzt. Die Applikation dieses Inhibitors bewirkt eine erniedrigte Amplitude des Nachpotentials und hat keinen Einfluss auf die Dauer des Nachpotentials. Dies bedeutet, dass bei Blockade der SK-Känale das mAHP sinkt und das sAHP unbeeinflusst bleibt. Weiterhin ist bekannt, dass es bei einer Stimulation der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren, die auch durch Pilocarpin stattfindet, über einen Prozess, der von der Proteinkinase CK 2 abhängig ist, zu einer Verminderung der Kalziumsensitivität der SK-Kanäle kommt (Giessel und Sabatini, 2010). Dies ist eine mögliche Erklärung für das leicht verminderte mAHP bei akuter, nur kurz einwirkender Gabe von TBB.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Blockierung der CK 2 durch chronische, langfristige Gabe von TBB bewirkt eine Verlängerung des Nachpotentials, jedoch keine Änderung seiner Amplitude. Die Applikation von cAMP-Analogon bewirkt ebenfalls keine Veränderungen am mAHP-abhängigen Strom und keine Amplitudenveränderung des Nachpotentials in der Stromklemme, sondern verlängert die Dauer des Potentials (sAHP) und erhöht den vom sAHP abhängigen Strom. Diese Daten lassen erkennen, dass die Verringerung der epileptischen Aktivität im neuronalen Netzwerk des Hippocampus nicht auf eine Erhöhung des mAHP zurückzuführen ist, so dass es sich hierbei vermutlich um einen von SK-Kanälen unabhängigen Prozess handelt, da diese vor allem Veränderungen des mittleren Nachpotentials bewirken.

Das mAHP kann somit also einen großen Anteil an einer Übererregbarkeit haben, wie der Unterschied zwischen den Kontrolltieren und dem Pilocarpinmodell zeigt. Aber es ist nicht Ursache der Wirkung des TBB auf die epileptische Aktivität im Hippocampus. Hierzu wird im nächsten Absatz das sAHP betrachtet.

5.3. Steigerung des sAHP-abhängigen Stromes durch TBB

Auf neuronaler Ebene stellen wir fest, dass durch TBB eine Erhöhung des sAHP-abhängigen Stromes erzeugt wird. Diese Verlängerung des Kaliumstromes, auch ohne Amplitudenveränderung, scheint damit einen Einfluss auf die Erregbarkeit zu haben.

Wie bereits erwähnt, konnte in anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass der Kaliumstrom bei einigen Epilepsien verringert ist (Kamal et. al., 2006; Oliveira et al., 2010; Verma-Ahuja et al., 1995). Dies kann als weiteres Indiz für die Beteiligung des AHP an der Erregungsbildung sein, sowohl durch die Verminderung im pathologischen Fall der Epilepsie als auch durch eine Erhöhung als Protektion vor Übererregbarkeit, z. B. durch Magnesiumreduktion, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewendet wird. Die Zunahme des Stromes kann durch die Applikation von cAMP-Analoga rückgängig gemacht werden. Diese Eigenschaft ist für den sAHP-abhängigen Strom gezeigt worden (Madison und Nicoll, 1986) und ist ein Hinweis, dass durch die TBB-Behandlung die für das sAHP verantwortlichen Kanäle beeinflusst und evtl. hochreguliert werden.

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass es durch die Enzymhemmung zu einer Veränderung des gesamten Nachpotentials in der Current-Clamp-Messung kommt, dessen Ursache wahrscheinlich das sAHP ist, welches sich bei Gabe von cAMP-Analoga verringert. Durch die Dauer des langsamen Nachpotentials von mehreren Sekunden trägt es zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei. Die verringerte epileptische Aktivität in der CA 1 Region des Hippocampus kann somit auf die Erhöhung des sAHP zurückzuführen sein.

5.4. Anstieg des sAHP durch Blockierung der CK 2 zeigt keine Pharmakoresistenz im Pilocarpinmodell

Im Vergleich der Kontrolltiere mit den epileptischen Tieren ist zu sehen, dass es in beiden Fällen durch orale Gabe von TBB zu einer Reduktion der spontanen Potentiale im Netzwerk des Hippocampus kommt. Dies kann auf ein erhöhtes sAHP zurückzuführen sein, das sowohl bei behandelten Kontrolltieren und als auch bei epileptischen Tieren erhöht ist. Das sAHP ist beim Modell der Temporallappenepilepsie durch Behandlung mit TBB wieder auf Kontrollniveau gestiegen. Betrachtet man das Nachpotential im Current clamp, führt der langsame Anteil bei den epileptischen Gruppen auch zu einer Verlängerung des gesamten Nachpotentials nach einem einzelnen Aktionspotential. Es ist zu erkennen, dass bei einem pathologischen Zustand der Epilepsie eine Gabe von TBB eine höhere Wirkung zeigt und es hier zu einer Angleichung an das Niveau von Kontrolltieren kommt.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die Erhöhung des sAHP und die antikonvulsive Wirkung auf Magnesiumentzug in vitro keiner Pharmakoresistenz im Pilocarpinmodell der Temporallappenepilepsie unterliegen. Sowohl bei Kontrolltieren als auch bei epileptischen Tieren verlängert sich das Nachpotential, wodurch eine deutlich geringere synchrone Aktivität im Hippocampus resultiert.

Somit könnte die Blockierung der neuronalen CK 2 ein mögliches Ziel für ein neues Antiepileptikum darstellen und weiterhin Wege eröffnen, die Kaliumströme des Nachpotentials genauer zu untersuchen.

Eine weitere Beobachtung, die jedoch nicht quantifiziert wurde und daher keinen Eingang in den Ergebnisteil gefunden hat, ist, dass die epileptischen Ratten bereits weniger ängstlich bzw. aggressiv, z.B. beim Umsetzen und Wiegen durch die orale Gabe von TBB wirken, als nur mit Pilocarpin vorbehandelte Tiere. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass klinisch bedeutsame Verhaltensveränderungen auch beim Menschen, z.B. bei der Temporallappenepilepsie häufige Untersuchungsziele darstellen.

5.5. Rückschlüsse auf die Wirkungskaskade der Proteinkinase CK 2

In der Einleitung wird erwähnt, dass das sAHP von der Konzentration von cAMP abhängig ist. Dieser Zusammenhang wird in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Es kann weiterhin gezeigt werden, dass die durch das TBB beeinflussten Kanäle ebenfalls abhängig von der Konzentration an cAMP sind.

Im folgenden Abschnitt wird auf die Daten eingegangen, in denen TBB nur in die Lösung gegeben wird. Es scheint, dass die Wirkung von TBB nicht auf direkte Kanalbeeinflussung zurückzuführen ist, da bei direkter Wirkung eine Inkubation der isolierten Zellen vor der Messung mit TBB eine ähnlich starke Wirkung haben müsste wie die langzeitigen oralen Gabe des Inhibitors der Proteinkinase CK 2 über vier Tage.

Andere Studien konnten zeigen, dass cAMP in kurzer Zeit (1 - 2 s) das sAHP blockiert (Lancaster et al., 2006). Das cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche über Phosphorylierung u.a. Einfluss auf Kanäle der SK-Kanalfamilie besitzt. Die Phosphorylierung führt zu einer Internalisation des Kanalproteins und damit zu einer AHP-Reduktion (Ren et al., 2006; Lin et al., 2008).

Bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass eine akute Gabe von TBB in der Lösung mit einer Präinkubationszeit von 45 - 60 min nicht den gleichen Effekt hat wie bei einer chronischen oralen Applikation. So erscheint es wahrscheinlich, dass die sAHP-steigernde Wirkung des TBBs nicht direkt über den cAMP-PK A-Weg abläuft. Allerdings ist die Internalisierung eine Erklärung für den etwas geringeren sAHP-abhängigen Strom in den Gruppen der TBB-Gabe in Lösung im Vergleich zu den unbehandelten Gruppen. Auf Grund der lipophilen Eigenschaft des Blockers (Pagano et al., 2008) kann er die Membran passieren, ohne zunächst aktiv in die Zelle transportiert zu werden. Hier liegt nicht der Grund für die fehlende Wirkung bei alleiniger TBB Gabe in Lösung.

Über längere Zeit appliziertes TBB steigert das sAHP. Die Zeit von maximal zehn Minuten, in der TTX und TEA eingewaschen werden, um die schnellen Natriumströme und das fAHP zu blockieren, reicht bereits dazu aus, dass das cAMP-Analogon die Wirkung von TBB verringert und das sAHP wieder reduziert wird. Interessant hierbei ist, dass in allen Gruppen ein relativ konstanter Reststrom bleibt, der weder durch cAMP blockierbar, noch durch TBB beeinflussbar ist. Dies bestärkt die Vermutung, dass es sich bei dem sAHP um ein Potential handelt, das aus mehreren Einzelkomponenten besteht. So lässt es sich gut nachvollziehen,

46

weshalb bis jetzt noch kein spezifischer Kanal ausfindig gemacht werden konnte, wogegen schon früh die BK-Kanäle als zuständige Kaliumkanalfamilie für den schnellen Anteil (fAHP) entdeckt worden sind (Storm, 1987).

Ein weiterer Angriffspunkt der Proteinkinase CK 2 ist die Aktivierung von Calmodulin (Nakajo et al., 1988). Calmodulin führt im phosphylierten Zustand zu einer geringeren Kalziumsensitivät und einer verminderten SK-Kanal Aktivität (Keen et al., 1999; Bildl et al., 2004; Allen et al., 2007). Gegen die Wirkung auf die Anzahl der eingebauten SK-Kanäle spricht, dass in der vorliegenden Arbeit nicht das mAHP reduziert ist, sondern nur das sAHP. Denkbar ist aber eine Veränderung der Kinetik der SK-Kanäle, z.B. eine verlängerte Offenwahrscheinlichkeit.

Der genaue Zusammenhang, wie TBB auf das sAHP wirkt, bleibt dementsprechend noch zu klären. Die Proteinkinase CK 2 phosphoryliert zahlreiche Proteine (Sarno et al., 2001; Meggio und Pinna 2003). Bisher sind aber nur wenige Einflüsse auf Kaliumkanäle bekannt. Genannt sei hier die direkte Phosphorylierung von K_v 3.1-Kanälen (Macica und Kaczmarek, 2001), deren Deaktivierung aber sehr schnell erfolgt (weit unter 200 ms) (Grissmer et al., 1994; Hernandez-Pineda et al., 1999), so dass es unwahrscheinlich ist, dass dieser Kanal die Grundlage des sAHPs ist.

Eine Wirkung über die Transkriptionsebene erscheint möglich. Es kann von einer komplexen Signaltransduktionskaskade ausgegangen werden, die auch eine Hochregulation von bestimmten Kaliumkanälen auf Transkriptionsebene beinhalten könnte. Hier fehlen jedoch noch molekularbiochemische Messungen, um dies zu bestätigen bzw. zu widerlegen.

5.6. Fehlerbetrachtung

Die Strom- und Spannungsmessungen werden an isolierten Zellen durchgeführt. Es ist dadurch möglich, dass Zellen unterschiedlicher Aktivität der Enzyme sowie unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind. Diese können zu Veränderungen an der Zellmembran führen. Allerdings unterliegen alle Messgruppen der gleichen Behandlung und dadurch, dass die Zellen direkt nach der Isolierung gemessen werden, verringert sich dieser Unterschied. Die Zeit, bis an einer Zelle Strom- und Spannungsmessungen vorgenommen werden, ist nicht konstant. Auch aus diesem Grund sind Abweichungen denkbar. Jedoch ist die maximale Abweichung nicht lang genug, um Veränderungen in der Transkriptionsebene auszulösen. Zudem variieren diese Unterschiede nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Das Arbeiten an lebenden Organismen trägt weiterhin zur Varianz bei. Auch das unterschiedliche Trinkverhalten sei genannt, das eine Variable darstellt. Zur Kontrolle dieses Parameters wird die Trinkmenge jedoch über mind. vier Tage vor Medikamentengabe beobachtet, während der Gabe überwacht und bei Änderung der Trinkmenge die Dosierung angepasst, um den Fehler zu minimieren.

Bei der Proteinkinase CK 2 handelt es sich, wie bereits dargestellt, um ein Enzym mit vielfältigen Wirkungen. Ungeachtet des breiten Wirkspektrums wurden keine Nebenwirkungen bei den mit TBB behandelten Tieren festgestellt. Tatsächlich ist jedoch denkbar, dass durch die Blockade der Proteinkinase CK 2 durch TBB sowohl wegen der Lipophilie als auch der nicht überschaubaren Menge an Substraten des Enzyms (Meggio und Pinna, 2003) beim langfristigen klinischen oder experimentellen Einsatz Nebenwirkungen auftreten können. Heparin ist ein häufig angewendetes Medikament, welches auch die Proteinkinase CK 2 inhibiert (Hathaway et al., 1980). Es ist nicht liquorgängig und besitzt daher keine Wirkung auf zentrale Nervenzellen.

5.7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird dargelegt, dass eine orale Gabe von TBB zu einer geringeren Erregbarkeit des hippocampalen Netzwerkes führt. Dies kann u.a. auf einen Anstieg des vom sAHP abhängigen Stromes zurückzuführen sein. Weiterhin zeigt die Arbeit, dass dieser Mechanismus keine Pharmakoresistenz bei länger bestehender Epilepsie aufweist und auch im pathologischen Gewebe zu einer deutlich geringeren epileptischen Aktivität im Hippocampus führt. Es wird die Wichtigkeit des Nachpotentials bei der Epilepsie dargestellt und mit der Inhibition der Proteinkinase CK 2 eine potentiell neue Zielstruktur für ein Antiepileptikum herausgearbeitet.

Es lassen sich neue Ansätze für weitere Forschungsarbeiten ableiten. Die Untersuchung an der Anfallsfrequenz in vivo von epileptischen Tieren bei Gabe von TBB, um herauszufinden, ob es zu einer Verringerung dieser kommt und auch, ob es Folgen bei längerer Einnahme auf die Kognition, die Leberenzymkonzentration oder die Nieren- sowie Herzfunktion besitzt.

Des Weiteren können auch Fragen in der Grundlagenforschung im Bereich des sAHP weiterverfolgt werden. Da es ein sehr kleines Potential ist und nun durch orale TBB Gabe gezielt die Möglichkeit besteht, dieses anzuheben, können eventuell die zugehörigen Ströme besser beurteilt und analysiert werden.

6. Thesen

- 1. Die Temporallappenepilepsie ist eine der häufigsten medikamentenrefraktären Epilepsien.
- Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachpotential nach einer Erregung an Hippocampuszellen der Region CA 1 und deren Veränderung bei Temporallappenepilepsie.
- Die CA 1 Region ist sowohl beim Menschen als auch in dem hier angewendeten Pilocarpinmodell der Ratte am stärksten betroffen.
- Das Potential nach einer Erregung (engl. AHP = Afterhyperpolarisationpotential), das durch einen Kaliumstrom erzeugt wird, lässt sich in drei Phasen unterscheiden: einen schnellen (fAHP), mittleren (mAHP) und einen langsamen Anteil (sAHP).
- 5. Die Anteile unterscheiden sich sowohl im zeitlichen Ablauf wie auch in der pharmakologischen Beeinflussbarkeit, so ist das fAHP durch TEA, das mAHP u.a. durch Apamin und das sAHP durch cAMP-Analoga blockierbar.
- Das fAHP hat große Bedeutung für die schnelle Repolarisation und gewährleistet eine schnelle Folge von Aktionspotentialen. Sowohl das mAHP als auch das sAHP wirken modulierend auf die Erregungsschwelle.
- 7. Das sAHP hat eine Dauer von mehreren Sekunden und ist kalziumabhängig.
- 8. Das mAHP ist in dem Modell der Temporallappenepilepsie erniedrigt.
- 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) ist ein lipophiler Blocker der Proteinkinase CK 2, welche ubiquitär im Körper vorkommt und verstärkt in Nervenzellen zu finden ist.
- 10. Im neuronalen Netzwerk zeigt sich durch eine orale Applikation von TBB über 4 Tage eine Verringerung der durch Magnesiumentzug evozierten epileptischen Aktivitäten in der CA 1 Region und somit eine antikonvulsive Wirkung in vitro.
- Eine orale Vorbehandlung der epileptischen Tiere mit TBB bewirkt auf zellulärer Ebene eine Verlängerung des Nachpotentials und eine Erhöhung des sAHP-abhängigen Stromes, die durch cAMP-Analoga revidierbar ist.
- 12. Eine kurzfristige Applikation von TBB hat weder direkten Einfluss auf das mAHP noch auf das sAHP.

- 13. Die antikonvulsive Wirkung im hippocampalen Netzwerk kann auf den erhöhten, mehrere Sekunden anhaltenden Kaliumstrom zurückzuführen sein.
- 14. Die Wirkung zeigt keine Pharmakoresistenz im Pilocarpinmodell der Temporallappenepilepsie.
- 15. Die Blockierung der Proteinkinase CK 2 stellt eine mögliche neue Zielstruktur für ein Antiepileptikum dar.
- 16. In der Grundlagenforschung lassen die Ergebnisse aus den Experimenten neue Ansätze zur Erforschung an dem sAHP zu, welches ein kleines und damit schwer zu untersuchendes Potential darstellt.
- 17. Die genaue Wirkungskaskade, die durch die Blockierung der Proteinkinase CK 2 beeinflusst wird, bleibt zu klären.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

8-CPT-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)adenosine-3',5'-cyclic monophosphate	
AHP	engl.: Afterhyperpolarisationpotential	
	fAHP = fast AHP	
	mAHP = medium AHP	
	sAHP = slow AHP	
AP	Aktionspotential	
АТР	Adenosintriphosphat	
BK-Kanal	big conductance Potassium channel	
Cf	Schnelle Kapazitätskompensation	
Cs	Langsame Kapazitätskompensation	
CA	Cornu ammonis	
cAMP	cyclic adenosin-mono-phosphate	
CK 2	Casein Kinase 2	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
EEG	Elektroenzephalogramm	
EPSP	exitatorische postsynaptische Potentiale	
GAERS	Genetic Absence epilepsy rat from Strasbourg	
GEPR	genetically epilepsy prone rat	
GTP	Guanosintriphosphat	
HEPES	4-(2-Hydroxiethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure	
i. p.	intraperitoneal	
K _{2P} -Kanal	2-Poren-Kaliumkanal	
K _v 3.1	spannungsabhängiger Kaliumkanal der Familie 3.1	
KG	Körpergewicht	
MRT	Magnetresonanztomografie	
MTS	mesiale temporale Sklerose	
n	Anzahl	

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
р	Fehlerwahrscheinlichkeit
рН	potentia Hydrogenii
RMP	Ruhemembranpotential
Rs	Serienwiderstand
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
SK- Kanal	small conductance Potassium channel
τ	Membranzeitkonstante
ТВВ	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TEA	Tetraethylammonium
TLE	Temporallappenepilepsie
ТТХ	Tetrodotoxin
UCL 1684	6,12,19,20,25,26-Hexahydro-5,27:13,18:21,24-trietheno-1-1,7-
	metheno-7H-dibenzo-[b,n]-[1,5,12,16]tetraazacyclotricosine-
	5,13-diium-dibromide
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1.	Schematische und histologische Darstellung des	2
	Hippocampus	
Abbildung 2.2.	Histologischer Vergleich des Hippocampus zwischen Kontrolltieren	
	und epileptischen Tieren	6
Abbildung 3.1.	Darstellung eines Aktionspotentials	25
Abbildung 3.2.	Darstellung des nachpotentialabhängigen Stromes	26
Abbildung 4.1.	Feldpotentialmessungen nach Magnesiumreduktion	29
Abbildung 4.2.	Darstellung der Dauer von Aktionspotentialen unter Applikation	
	von TBB bzw cAMP-Analoga	32
Abbildung 4.3.	Nachpotential eines Aktionspotentials	34
Abbildung 4.4.	Der mAHP-abhängige Strom im Pilocarpinmodell	36
Abbildung 4.5.	Der sAHP-abhängige Strom im Pilocarpinmodell	39

7.3. Literaturverzeichnis

- Allen D, Fakler B, Maylie J, Adelman JP. (2007) Organization and regulation of small conductance Ca2+-activated K+ channel multiprotein complexes. *J Neurosci* 27: 2369-2376.
- Amaral DG, Witter MP. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.
- Andrade R, Foehring RC, Tzingounis AV. (2012) The calcium-activated slow AHP: cutting through the Gordian knot. *Front Cell Neurosci* 6: 47.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gammaaminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291-313.
- Battistutta R. (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Structural bases of protein kinase CK2 inhibition. *Cell Mol Life Sci* 66: 1868-1889.
- Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G. (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163: 176-179.
- Bender RA, Dubé C, Gonzalez-Vega R, Mina EW, Baram TZ. (2003) Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13: 399-412.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51: 676-685.
- Bildl W, Strassmaier T, Thurm H, Andersen J, Eble S, Oliver D, Knipper M, Mann M, Schulte U, Adelman JP, Fakler B. (2004) Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca(2+)-activated K+ channels and regulates channel gating. *Neuron* 43: 847-858.

- Blanquet PR. (2000) Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous System. *Prog Neurobiol.* 60: 211-246.
- Blümcke I, Kistner I, Clusmann H, Schramm J, Becker AJ, Elger CE, Bien CG, Merschhemke M,
 Meencke HJ, Lehmann T, Buchfelder M, Weigel D, Buslei R, Stefan H, Pauli E,
 Hildebrandt M. (2009) Towards a clinico-pathological classification of granule cell
 dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol* 117: 535–544.
- Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, von Deimling A, Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstöck J, Stefan H, Hildebrandt M. (2007) A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 113: 235-244.
- Bouchet C, Cazavieilh JB (1825) De l'Epilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale, recherches sur la nature et le siège de ces deux maladies. *Arch Gen med* 9: 510-542.
- Brodie MJ. (2010) Antiepileptic drug therapy the story so far. Seizure 19: 650-655.
- Carr MF, Frank LM. (2012) A single microcircuit with multiple functions: state dependent information processing in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol.* 22: 704-708.
- Cendes F, Andermann F, Carpenter S, Zatorre RJ, Cashman NR. (1995) Temporal lobe epilepsy caused by domoic acid intoxication: evidence for glutamate receptormediated excitotoxicity in humans. *Ann Neurol* 37: 123-126.
- Cendes F. (2004) Febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 17: 161-164.
- Charriaut-Marlangue C, Otani S, Creuzet C, Ben-Ari Y, Loeb J. (1991) Rapid activation of hippocampal casein kinase II during long-term potentiation. *PNAS* 88: 10232-10236.
- Chao CC, Ma YL, Lee EH. (2007) Protein kinase CK2 impairs spatial memory formation through differential cross talk with PI-3 kinase signaling: activation of Akt and inactivation of SGK1. *J Neurosci* 27: 6243-6248.
- Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, Yaari Y. (2011) An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J Neurophysiol* 105: 117-129.

- Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Huganir RL. (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24: 10248-10259.
- Czuczwar P, Wojtak A, Cioczek-Czuczwar A, Parada-Turska J, Maciejewski R, Czuczwar SJ. (2010) Retigabine: the newer potential antiepileptic drug. *Pharmacol Rep* 62: 211-219.
- Das N, Dhanawat M, Shrivastava SK. (2012) An overview on antiepileptic drugs. *Drug Discov Ther* 6: 178-193.
- Ellerkmann RK, Remy S, Chen J, Sochivko D, Elger CE, Urban BW, Becker A, Beck H. (2003) Molecular and functional changes in voltage-dependent Na(+) channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. *Neuroscience* 119: 323-333.
- Fernandez de Sevilla D, Garduno J, Galvan E, Buno W. (2006) Calcium-activated afterhyperpolarizations regulate synchronization and timing of epileptiform bursts in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 96: 3028-3041.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46: 470-472.
- Ford KJ, Arroyo D, Kay J, Lloyd EE, Bryan RM Jr, Sanes J, Feller MB. (2013) A role for TREK1 in generating the slow afterhyperpolarization in developing starburst amacrine cells. *J Neurophysiol* 109: 2250-2259.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD. (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 34: 774-780.
- Giessel AJ, Sabatini BL. (2010) M1 muscarinic receptors boost synaptic potentials and calcium influx in dendritic spines by inhibiting postsynaptic SK channels. *Neuron* 68: 936-947.
- Goddard GV. (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214: 1020-1021.

- Green JD und Arduini AA (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol* 17: 533-557.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1227–1234.
- Gu N, Hu H, Vervaeke K, Storm JF. (2008) SK (KCa2) channels do not control somatic excitability in CA1 pyramidal neurons but can be activated by dendritic excitatory synapses and regulate their impact. *J Neurophysiol* 100: 2589-2604.
- Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF. (2005) Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 566: 689-715.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.
- Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW.
 (2006) Small-conductance Ca2+-activated K+ channel type 2 (SK2) modulates
 hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26: 1844-1853.
- Harvey AS, Grattan-Smith JD, Desmond PM, Chow CW, Berkovic SF. (1995) Febrile seizures and hippocampal sclerosis: frequent and related findings in intractable temporal lobe epilepsy of childhood. *Pediatr Neurol* 12: 201-216.
- Hathaway GM, Lubben TH, Traugh JA. (1980) Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem* 255: 8038-8041.
- Hathaway GM, Traugh JA. (1983) Casein kinase II. Methods Enzymol 99: 317-331.
- Hernández-Pineda R, Chow A, Amarillo Y, Moreno H, Saganich M, Vega-Saenz de Miera EC, Hernández-Cruz A. Rudy B. (1999) Kv3.1-Kv3.2 channels underlie a high-voltageactivating component of the delayed rectifier K+ current in projecting neurons from the globus pallidus. *J Neurophysiol* 82: 1512–1528.
- Hille B. (1970) Ionic channels in nerve membranes. Prog Biophys Mol Biol 21: 1-32.

- Hotson JR, Prince DA. (1980) A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 43: 409-419.
- Janszky J, Janszky I, Schulz R, Hoppe M, Behne F, Pannek HW, Ebner A (2005) Temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Predictors for long-term surgical outcome. *Brain* 128: 395–404.
- Jobe PC, Mishra PK, Adams-Curtis LE, Deoskar VU, Ko KH, Browning RA, Dailey JW. (1995) The genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *Ital J Neurol Sci* 16: 91-99.
- Kamal A, Notenboom RG, de Graan PN, Ramakers GM (2006) Persistent changes in action potential broadening and the slow afterhyperpolarization in rat CA1 pyramidal cells after febrile seizures. *Eur J Neurosci* 23: 2230-2234.
- Keele NB, Zinebi F, Neugebauer V, Shinnick-Gallagher P. (2000) Epileptogenesis up-regulates metabotropic glutamate receptor activation of sodium-calcium exchange current in the amygdala. *J Neurophysiol* 83: 2458-2462.
- Keen JE, Khawaled R, Farrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP, Maylie J. (1999) Domains responsible for constitutive and Ca(2+)dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *J Neurosci* 19: 8830-8838.
- King D, Spencer S (1995) Invasive electroencephalography in mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* 12: 32-45.
- Kirschstein T. (2008) Wie entsteht das EEG? Neurophysiol Lab 30: 29-37.
- Krnjević K, Lisiewicz A. (1972) Injections of calcium ions into spinal motoneurones. *J Physiol* 225: 363-390.
- Krnjević K, Puil E, Werman R. (1978) EGTA and motoneuronal after-potentials. *J Physiol* 275: 199-223.
- Lancaster B, Adams PR. (1986) Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 55: 1268-1282.
- Lancaster B, Hu H, Gibb B, Storm JF. (2006) Kinetics of ion channel modulation by cAMP in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 576: 403-417.

- Lancaster B, Nicoll RA. (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 389: 187-203.
- Lee WS, Ngo-Anh TJ, Bruening-Wright A, Maylie J, Adelman JP. (2003). Small conductance Ca2+-activated K+ channels and calmodulin: cell surface expression and gating. *J Biol Chem* 278: 25940-25946.
- Lin MT, Lujan R, Watanabe M, Adelman JP, Maylie J. (2008) SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 11: 170-177.
- Litchfield DW. (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369: 1-15.
- Lorenz S, Heils A, Kasper JM, Sander T. (2007) Allelic association of a truncation mutation of the KCNMB3 gene with idiopathic generalized epilepsy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 10-13.
- Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM. (2000) Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 20: 5401-5419.
- Macica CM, Kaczmarek LK. (2001) Casein kinase 2 determines the voltage dependence of the Kv3.1 channel in auditory neurons and transfected cells. *J Neurosci* 21: 1160-1168.
- Madison DV, Nicoll RA. (1986) Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, in vitro. *J Physiol* 372: 221-244.
- Madsen KK, White HS, Schousboe A. (2010) Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther* 125: 394-401.
- Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. (2010) Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol* 67: 470-478.
- Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A. (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl* 35: 37-69.
- Martinerie J, Adam C, Le Van Quyen M, Baulac M, Clemenceau S, Renault B, Varela FJ. (1998) Epileptic seizures can be anticipated by non-linear analysis. *Nature Medicine* 4: 1173 – 1176.
- Meggio F, Pinna LA. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? FASEB J 17: 349-368.

- Mody I, Lambert JD, Heinemann U. (1987) Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 57: 869-888.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 73: 1-60.
- Nakajo S, Masuda Y, Nakaya K, Nakamura Y (1988) Determination of the phosphorylation sites of calmodulin catalyzed by casein kinase 2. *J Biochem* 104: 946-951.
- Oliveira MS, Skinner F, Arshadmansab MF, Garcia I, Mello CF, Knaus HG, Ermolinsky BS, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER. (2010) Altered expression and function of smallconductance (SK) Ca(2+)-activated K+ channels in pilocarpine-treated epileptic rats. *Brain Res* 1348: 187-199.
- Pacheco Otalora LF, Hernandez EF, Arshadmansab MF, Francisco S, Willis M, Ermolinsky B, Zarei M, Knaus HG, Garrido-Sanabria ER. (2008) Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1200: 116-131.
- Pagano MA, Bain J, Kazimierczuk Z, Sarno S, Ruzzene M, Di Maira G, Elliott M, Orzeszko A, Cozza G, Meggio F, Pinna LA. (2008) The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochem J* 415: 353-365.
- Pedarzani P, Storm JF. (1993) PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K+ current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron* 11: 1023-1035.
- Pinna LA, Meggio F. (1997) Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* 3: 77-97.
- Reigel CE, Dailey JW, Jobe PC. (1986) The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. *Life Sci* 39: 763-774.
- Ren Y, Barnwell LF, Alexander JC, Lubin FD, Adelman JP, Pfaffinger PJ, Schrader LA, Anderson AE. (2006) Regulation of surface localization of the small conductance Ca2+-activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem 281: 11769-11779.

- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H. (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int* 61: 546-558.
- Roxo MR, Franceschini PR, Zubaran C, Kleber FD, Sander JW. (2011) The limbic system conception and its historical evolution. *ScientificWorldJournal*. 11: 2428-2441.
- Sadler RM. (2006) The syndrome of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical features and differential diagnosis. *Adv Neurol* 97: 27-37.
- Sander JW, Shorvon SD. (1996) Epidemilogy of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychatry* 61: 433-443.
- Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D, Pinna LA. (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496: 44-48.
- Scheibel ME, Crandall PH, Scheibel AB. (1974) The hippocampal-dentate complex in temporal lobe epilepsy. A Golgi study. *Epilepsia* 15: 55-80.
- Schulz R, Kirschstein T, Brehme H, Porath K, Mikkat U, Köhling R. (2012) Network excitability in a model of chronic temporal lobe epilepsy critically depends on SK channelmediated AHP currents. *Neurobiol Dis* 45: 337-347.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, Adelman JP. (2001) Structure of the gating domain of a Ca2+-activated K+ channel complexed with Ca2+/calmodulin. *Nature* 410: 1120-1124.
- Schwartzkroin PA, Stafstrom CE. (1980) Effects of EGTA on the calcium-activated afterhyperpolarization in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Science* 210: 1125-1126.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M. (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18: 25-29.
- Soeder BM, Gleissner U, Urbach H, Clusmann H, Elger CE, Vincent A, Bien CG. (2009) Causes, presentation and outcome of lesional adult onset mediotemporal lobe epilepsy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80: 894-899.

- Soh H, Tzingounis AV. (2010) The specific slow afterhyperpolarization inhibitor UCL2077 is a subtype-selective blocker of the epilepsy associated KCNQ channels. *Mol Pharmacol* 78: 1088-1095.
- Soto D, Pancetti F, Marengo JJ, Sandoval M, Sandoval R, Orrego F, Wyneken U. (2004) Protein kinase CK2 in postsynaptic densities: phosphorylation of PSD-95/SAP90 and NMDA receptor regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 542-550.
- Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T. (2002) Small conductance Ca2+-activated K+ channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. J Neurosci 22: 10163-10171.
- Stefan H, Hildebrandt M, Kerling F, Kasper BS, Hammen T, Dörfler A, Weigel D, Buchfelder M, Blümcke I, Pauli E. (2009) Clinical prediction of postoperative seizure control: structural, functional findings and disease histories. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80: 196-200.
- Stocker M, Krause M, Pedarzani P. (1999) An apamin-sensitive Ca2+-activated K+ current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Scl USA* 96: 4662-4667.
- Storm JF. (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.* 385: 733-759.
- Storm JF. (1989) An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.* 409: 171-190.
- Su H, Sochivko D, Becker A, Chen J, Jiang Y, Yaari Y, Beck H. (2002) Upregulation of a T-type Ca2+ channel cau-ses a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* 22: 3645-3655.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26: 321-330.
- Timm F. (1958) Zur Histochemie der Schwermetalle: Das Sulfid-Silberverfahren. *Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin* 46: 706-711.
- Tombaugh GC, Rowe WB, Rose GM. (2005) The slow afterhyperpolarization in hippocampal CA1 neurons covaries with spatial learning ability in aged Fisher 344 rats. *J Neurosci* 25: 2609-2616.

- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.
- Van Paesschen W. (2004) Qualitative and quantitative imaging of the hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 14: 373-400.
- Verma-Ahuja S, Evans MS, Pencek TL. (1995) Evidence for decreased calcium dependent potassium conductance in hippocampal CA3 neurons of genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Res* 22: 137-144.
- Wyneken U, Smalla KH, Marengo JJ, Soto D, de la Cerda A, Tischmeyer W, Grimm R, Boeckers TM, Wolf G, Orrego F, Gundelfinger ED. (2001) Kainate-induced seizures alter protein composition and N-methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience* 102: 65-74.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395: 503-507.
- Yang J, Krishnamoorthy G, Saxena A, Zhang G, Shi J, Yang H, Delaloye K, Sept D, Cui J. (2010) An epilepsy/dyskinesia-associated mutation enhances BK channel activation by potentiating Ca2+ sensing. *Neuron* 66: 871-883.
- Ye ZY, Li DP, Li L, Pan HL. (2011) Protein kinase CK2 increases glutamatergic input in the hypothalamus and sympathetic vasomotor tone in hypertension. *J Neurosci* 31: 8271-8279.
- Yue C, Yaari Y. (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 4614-4624.
- Zhan RZ, Timofeeva O, Nadler JV. (2010) High ratio of synaptic excitation to synaptic inhibition in hilar ectopic granule cells of pilocarpine-treated rats. *J Neurophysiol* 104: 3293-3304.
- Ziburkus J, Cressman JR, Schiff SJ. (2013) Seizures as imbalanced up states: excitatory and inhibitory conductances during seizure-like events. *J Neurophysiol* 109: 1296-12306.

- Zona C, Tancredi V, Longone P, D'Arcangelo G, D'Antuono M, Manfredi M, Avoli M. (2002) Neocortical potassium currents are enhanced by the antiepileptic drug lamotrigine. *Epilepsia* 43: 685-690.
- Zona C, Tancredi V, Palma E, Pirrone GC, Avoli M. (1990) Potassium currents in rat cortical neurons in culture are enhanced by the antiepileptic drug carbamazepine. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 545-547.

7.4. Veröffentlichungsverzeichnis

Originalarbeiten

- Schulz R, Kirschstein T, **Brehme H**, Porath K, Mikkat U, Köhling R. (2012) Network excitability in a model of chronic temporal lobe epilepsy critically depends on SK channel-mediated AHP currents. *Neurobiol Dis* 45: 337-347.
- **Brehme H**, Kirschstein T, Schulz R, Köhling R. (2014) In vivo treatment with the casein kinase inhibitor 4,5,6,7-tetrabromotriazole augments the slow afterhyperpolarizing potential and prevents acute epileptiform activity. *Epilepsia.* 55: 175-183.

Wissenschaftliche Vorträge

Brehme H, Nachpotentiale bei chronischer Epilepsie am Pilocarpinmodell. *16. Treffen der* Ostseephysiologen in Kiel, 07.05.2011

Posterbeiträge auf Kongressen

- **Brehme H**, Kirschstein T, Schulz R, Köhling R.: Influence of casein kinase 2 inhibition on afterhyperpolarisation potential in epileptic tissue. *DPG (Deutsche Physiologische Gesellschaft) Kongress in Mainz*, 13.03. - 15.03.2014
- **Brehme H**, Kirschstein T, Schulz R, Köhling R.: Chronic casein kinase 2 inhibition increases afterhyperpolarisation potential and reduces epileptiforme activity. *DGfE (Deutsche Gesellschaft für Epilepsie) Kongress in Bonn*, 14.05. - 17.05.2014

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, für die Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Köhling und PD Dr. med. Kirschstein für die Vergabe dieses interessanten Themas, für die Betreuung und die Unterstützung während der Doktorarbeit. Weiterhin sei hier Dr. med. Robert Schulz gedankt, an dessen Doktorarbeit sich meine angeschlossen hat, für den Aufbau und die Weitergabe des Messplatzes.

Mein Dank gilt weiterhin allen Angestellten des Institutes für Physiologie für das Arbeitsklima, die Hilfen im Umgang mit den Geräten, Chemikalien, etc. Besonderen Dank hierbei an Marco Rohde.

Es sei hier meinen Freunden vom Jonglierkurs, vom Improvisationstheater sowie vom Akrobatikkurs zu danken, die dafür gesorgt haben, dass ich zwischendurch Abstand vom Studium gewinnen konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Rostock,

Hannes Brehme