



Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie

der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Köhling

***Die stereotaktische Injektion von Patienten-Liquor mit GAD-Enzephalitis fördert die
Entstehung spontaner epileptischer Aktivität im Hippocampus der Ratte***

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Bernd Frerker, geb. am 08.07.1987 in Düsseldorf

Rostock, Mai 2017

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. E. Reisinger

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. med. habil T. Kirschstein, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. U. Walter, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Bien, Epilepsie-Zentrum Bethel, Bielefeld

Datum der Einreichung: 29.07.2016

Datum der Verteidigung: 26.04.2017

Für meine Mutter und meinen Bruder, die mich stets unterstützten

Im Gedenken an meinen verstorbenen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Was ist Epilepsie?	1
1.2	Die GAD-Enzephalitis – Eine Form der limbischen Enzephalitis	1
1.2.1	Historische Entwicklung	1
1.2.2	Die Bedeutung der Glutamatdecarboxylase und der GAD-Ak	3
1.3	Aufbau des Hippocampus	7
1.3.1	Histologischer Aufbau des Hippocampus	7
1.3.2	Trisynaptischer Erregungsweg im Hippocampus	8
1.4	Exzitatorische und Inhibitorische Rezeptoren	10
1.4.1	Der NDMA-Rezeptor	10
1.4.2	Der GABA-Rezeptor	12
1.5	Die verschiedenen Epilepsiemodelle	13
1.5.1	Das evozierte Potenziale im Magnesiummangel-Modell	13
1.5.2	Das Epilepsie-Modell „Gabazin“	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Verwendete Chemikalien für die Lösungszubereitung	16
2.1.2	Verwendete Begasungen	16
2.1.3	Verwendete Pharmaka für die Tierpräparation und die Messungen	16
2.1.4	Verwendete Substanzen zur intrazerebralen Injektion	17
2.1.5	Verwendetes Mehr- und Einwegmaterialien	17
2.1.6	Verwendete Geräte und Software	18
2.1.7	Verwendete Lösungen	19

2.2	Methoden	21
2.2.1	Genehmigung zur Vornahme von Studien an lebenden Wirbeltieren	21
2.2.2	Operative Vorbereitung elektrophysiologischer Messungen	21
2.2.3	Messung von evozierten Feldpotenzialen	27
2.2.4	Kriterien zur Auswertung der Messergebnisse	32
2.2.5	Auswertung und Darstellung der Messergebnisse	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Allgemeine Informationen	36
3.2	Perioperative Mortalität	36
3.3	Spreading Depression	37
3.4	Ausgewählte Beispieldaten zu den durchgeföhrten Messungen	38
3.5	Charakterisierung von Feldpotenzialen	39
3.5.1	Morphologie von Feldpotenzialen	39
3.5.2	Mittlere Dauer der Feldpotenziale	51
3.5.3	Mittlere Anzahl der Potenziale	52
3.6	Ergebnisse aus der 1. Versuchsreihe – ACSF-Lösung: 0 Mg^{2+}	54
3.6.1	Grafische Aufarbeitung	54
3.6.2	Ergebnisdarstellung	55
3.7	Ergebnisse aus der 2. Versuchsreihe – ACSF-Lösung: 0 Mg^{2+} plus Gabazin	56
3.7.1	Grafische Aufarbeitung	56
3.7.2	Ergebnisdarstellung	57
3.8	Ergebnisse aus der 3. Versuchsreihe – ACSF-Lösung: Mg^{2+} plus Gabazin	58
3.8.1	Grafische Aufarbeitung	58
3.8.2	Ergebnisdarstellung	59
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	60

4	Diskussion	61
4.1	Kritische Bewertung der angewandten Methoden	61
4.1.1	Rechtfertigung der Epilepsiemodelle	61
4.1.2	Stereotaktische hippocampale Injektion	62
4.1.3	Verwendete GAD-Ak	62
4.1.4	Durchflussrate der extrazellulären ACSF-Stammlösung	63
4.2	Überprüfung zugrunde liegender theoretischer Modelle auf ihre Gültigkeit	63
4.2.1	Die sogenannte Baseline	65
4.2.2	Epilepsiomodell der 1. Versuchsreihe	65
4.2.3	Epilepsiomodell der 2. Versuchsreihe	66
4.2.4	Epilepsiomodell der 3. Versuchsreihe	67
4.2.5	Potenzialdauer und Potenzialmorphologie	67
4.2.6	Zusammenfassung	68
4.3	Was ist die pathophysiologische Rolle der GAD-Ak?	69
4.3.1	Internalisierung von Antikörpern und Interaktion mit dem Zielantigen	69
4.3.2	Können GAD-Ak in ein Neuron aufgenommen werden?	71
4.3.3	Sind die bisherigen Erkenntnisse auf die GAD-Enzephalitis übertragbar?	71
4.3.4	Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	75
4.3.5	Alternative Erklärungsansätze für die Pathophysiologie der GAD-Ak	76
5	Zusammenfassung	79
6	Thesen	80
7	Anhang	81
7.1	Abbildungsverzeichnis	81
7.2	Tabellenverzeichnis	82
7.3	Literaturverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

2-APV	2-amino-5-phosphonovaleric acid (NMDA-Antagonist)
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic- acid
CA	Cornu ammonis
CaCl ₂	Calciumchlorid
CRMP5	collapsin response-mediator protein 50
SCLC	small-cell-lung-cancer (kleinzelliges Bronchialkarzinom)
d.F.	der Fälle
DG	Dentate gyrus (Gyrus dentatus)
DM1	Diabetes mellitus Typ 1
EEG	Elektroenzephalografie
EPSP/EPSC	Exzitatorische postsynaptische Potenziale/Ströme (currents)
GABA	gamma-aminobutyric-acid
GAD	glutamt-acid-decarboxylase
GAD-Ak/anti-GAD	Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HHV	Humanes herpes virus
HSV	Herpes simplex virus
i.p.	Intraperitoneal
ILAE	international league against epilepsy
IPSP/IPSC	Inhibitorische postsynaptische Potenziale/Ströme (currents)
KCl	Kaliumchlorid
LE	limbische Enzephalitis
LTD	Langzeitdepression (long-term-depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (long-term-potentiation)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MRT	Magnetresonanztomografie
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	non-small-cell-lung-cancer (Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom)
PALP	Pyridoxalphosphat
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SPS	Stiff-person-Syndrom
TLE	Temporallappenepilepsie
VGAT	vesicular GABA transporter
VGKC	voltage-gated-potassium-channel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 WAS IST EPILEPSIE?

Der Begriff *Epilepsie* leitet sich von dem altgriechischen Wort ἐπίληψις (epílēpsis) ab, in der deutschen Bedeutung übersetzt mit „Angriff oder Überfall“ und wurde erstmals im 16. Jahrhundert aus dem lateinischen „epilepsia“ übernommen. Epilepsie steht für ein neurologisches Krankheitsbild, bei dem es zu unkontrollierten, synchronen und paroxysmalen Entladungen zentralnervöser Neurone mit der Folge eines Krampfes kommt, weshalb im deutschen Sprachraum auch „das Krampfleiden“ als Synonym verwendet wird. Das klinische Erscheinungsbild eines Krampfanfalls variiert in Abhängigkeit von der Lokalisation im ZNS, d.h. es können motorische, sensible oder vegetative Anfälle auftreten. Eingeteilt, in Anlehnung an die Internationale Liga gegen Epilepsie (ILAE, International League Against Epilepsy), werden die Epilepsien in fokale und generalisierte Anfälle. Erstere betreffen nur ein bestimmtes Areal im ZNS, wobei noch weiter zwischen einfach-fokalen Anfällen (ohne Bewusstseinsstörung) und komplex-fokalen Anfällen (mit Bewusstseinsstörung) unterschieden wird. Primär generalisierte Anfälle gehen von mehreren Foki aus und betreffen meist das gesamte Großhirn. Typisch ist hierbei eine Bewusstseinsstörung bis hin zur Synkope mit retro- und/oder anterograder Amnesie. Weiterhin können primär fokale Anfälle sekundär generalisieren. In diesem Zusammenhang ist die Temporallappenepilepsie (TLE) die häufigste Form einer fokalen Epilepsie und hat über den im Temporallappen lokalisierten Hippocampus Auswirkungen auf das limbische System. Dieser Aspekt erscheint interessant, da die TLE ein Symptom der limbischen Enzephalitis (LE) ist.

1.2 DIE GAD-ENZEPHALITIS – EINE FORM DER LIMBISCHEN ENZEPHALITIS

1.2.1 Historische Entwicklung

Die Arbeitsgruppe *Brierley et al* beschrieb 1960 erstmals den Begriff der limbischen Enzephalitis. Sie berichtete von 3 Patienten mit Zeichen einer subakuten Enzephalitis, von denen 2 Patienten eine Tumorerkrankung hatten, ein kausaler Zusammenhang wurde jedoch für unwahrscheinlich angesehen. Diesen Zusammenhang erkannten *Corsellis et al (1968)* erst 8 Jahre später, die anhand eigener Patienten und retrospektiver Fallberichte eine Assoziation von Tumorerkrankungen und dem Auftreten der LE herstellten. Aufgrund fehlender diagnostischer Möglichkeiten galt die LE lange Zeit als eine seltene Erkrankung. Dank

moderner bildgebender Verfahren wie der EEG, der MRT und der Liquordiagnostik wurde jedoch eine zunehmend größere Zahl von Patienten identifiziert. Typisch für die klassische Form dieser Erkrankung ist eine MR-morphologisch nachweisbare inflammatorische, uni- oder bilaterale Affektion des Hippocampus im Temporallappen als Teil des limbischen Systems, einhergehend mit insbesondere temporal lokalisierten Veränderungen im EEG und einer Symptomtrias bestehend aus einer Temporallappenepilepsie, progredientem Verlust des Kurzzeitgedächtnisses und dem Auftreten psychiatrischer Krankheitsbilder wie Depression oder einer gesteigerten Reizbarkeit (Tüzün *et al*, 2007). Während im EEG nahezu immer pathologische Veränderungen gesehen werden, können im MRT in bis zu 25% der Fälle keine Pathologien erkannt werden (Finelli *et al*, 2011). Neuere Publikationen zeigen zudem, dass eine strikt begrenzte Inflammation des Temporallappens im Sinne der klassischen limbischen Enzephalitis eher die Ausnahme ist, vielmehr können auch andere Hirnregionen betroffen sein (Gultekin *et al*, 2000). Die klassische beschriebene Diagnostik erlaubte ferner keine ätiologische Erklärung des Krankheitsbildes, dazu waren invasive diagnostische Methoden notwendig, beispielsweise Virus-Antigen- oder Antikörperbestimmungen im Serum und Liquor der Patienten. Hierdurch konnten unterschiedliche ätiologische Faktoren ausgemacht werden, es handelt sich heute im Wesentlichen um viral- oder autoimmunbedingten Enzephalitiden. Die Antikörper der Autoimmunenzephalitiden sind dabei entweder gegen Zelloberflächenantigene (überwiegend Rezeptorproteine) oder gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind. Tabelle 1 gibt einen ätiologischen Überblick.

Tabelle 1: Ätiologie der klassischen Form der limbischen Enzephalitis (Auswahl)

Viral	Autoantikörper (autoimmunbedingt)	
	Intrazelluläre Antigene	Zelloberflächenantigene
HSV	Anti-Hu	Anti-NMDA-R
HHV-6	Anti-Ma2	Anti-VGKC
	Anti-CV2/CRMP5	Anti-AMPA-R
	Anti-Amphiphysin	Anti-GABA-R
	Anti-GAD	

modifiziert nach Tüzün *et al*, 2007 und Finelli *et al*, 2011

HSV = Herpes-simplex-Virus, HHV-6 = Humanes-herpers-virus, CRMP5 = collapsin response-mediator protein 5, GAD = glutamat-acid-decarboxylase, NMDA-R = N-Methyl-D-Aspartat-receptor, VGKC = voltage-gated-potassium-channel (Kalium), AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid-receptor, GABA = gamma-aminobutyric-acid

Neben den in Tabelle 1 genannten Viren führen auch Cytomegalieviren (CMV) oder HI-Viren (humane Immundefizienz-Virus) zu Enzephalitiden, deren Krankheitsbild jedoch von der klassischen Form der LE abweicht. Die Klärung der Ätiologie erscheint dennoch problematisch, da in 85% aller Fälle keine Ursache der LE gefunden wird (Granerod *et al*, 2010) und von einer idiopathischen Genese ausgegangen werden muss. Der Ursachenfindung kommt jedoch eine wichtige Bedeutung zu, da insbesondere die Autoimmunencephalitiden mit **intrazellulären Antigenen** als Zielstruktur der Antikörper häufig mit Tumorerkrankungen assoziiert sind und damit eine paraneoplastische Genese zugrunde liegen kann. Assoziierte Tumorerkrankungen finden sich bei gegen **Zelloberflächenantigene** gerichtete Antikörpern seltener, wurden aber beispielsweise bei ovariellen Tumoren beschrieben (Dalmau *et al*, 2007; Finelli *et al*, 2011). Anti-Hu-Ak sind häufig mit einem SCLC assoziiert (Graus *et al*, 2001; Dalmau *et al*, 1992; Alamowitch *et al*, 1997), in ca. 50% d.F. können Antikörper nachgewiesen werden. Tumorerkrankungen, welche mit Anti-Ma2 assoziiert sind, treten bei jüngeren Menschen als Hodentumor (Volz *et al*, 1999) oder bei älteren Menschen als NSCLC auf (Dalmau *et al*, 2004; Mathew *et al*, 2007). Eine Assoziation von Tumoren des Thymus findet sich bei Anti-CV2/CRMP5 (Antoine *et al*, 1995). Therapiemöglichkeiten mit gutem Ansprechen bestehen in der operativen Entfernung des Tumors bei paraneoplastischer Genese, ergänzt durch eine antivirale oder antikonvulsive Medikation, Immuntherapie mit Glukokortikoiden oder Immunglobulinen, oder in Plasmaaustauschverfahren. In diesem Zusammenhang nehmen Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase (GAD-Ak) eine besondere Stellung ein. Erst in den letzten Jahren wurde zunehmend über Patienten mit einer GAD-Enzephalitis (anti-GAD-Enzephalitis) berichtet. Es handelt sich um eine Autoimmunenzephalitis mit Nachweis von GAD-Ak, entweder paraneoplastischer (Saiz *et al*, 2008), non-paraneoplastischer oder viraler Genese (Malter *et al*, 2010). Die Besonderheit liegt in sehr unterschiedlichen Ansprechraten GAD-assoziierter LE auf die geschilderten Therapieoptionen (Finelli *et al*, 2011).

1.2.2 Die Bedeutung der Glutamatdecarboxylase und der GAD-Ak

1.2.2.1 GAD-Ak treten bei einem Spektrum unterschiedlicher Erkrankungen auf

Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase wurden erstmals in Zusammenhang mit dem Stiff-Person-Syndrom (SPS) beschrieben, welches häufig mit hohen GAD-Titern und dem Diabetes mellitus Typ 1 (DM1) assoziiert sein kann (Solimena *et al*, 1988). Zwei Jahre später konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des DM1 ebenfalls im Zusammenhang mit

Antikörpern gegen die GAD in β -Zellen des Pankreas Zellen steht (Baekkeskov *et al*, 1990). Weitere GAD-assoziierte Krankheitsbilder sind die zerebelläre Ataxie (Honorat *et al*, 2001) und die (therapierefraktäre) Epilepsie (Giometto *et al*, 1998; Peltola *et al*, 2000). Auch diese Erkrankungen treten häufig assoziiert mit dem Diabetes mellitus Typ 1 auf (Saiz *et al*, 2008), ebenfalls einhergehend mit hohen GAD-Ak-Titern. Ferner bestätigten Saiz *et al* mögliche Assoziationen der GAD-Ak mit malignen Erkrankungen. Im Zusammenhang mit der LE jedoch erfolgten erst in den vergangenen Jahren umfassende, vorwiegend klinisch orientierte Studien. So zeigten Mälter *et al* (2010), dass ein Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie mit Glukokortikoiden in Verbindung mit Antikonvulsiva bei GAD-Ak-positiver LE deutlich schlechter ausfällt im Vergleich zur anti-VGKC LE. Deutlich bessere Ansprechraten lassen sich mit Plasmaaustauschverfahren erzielen, wie Matà *et al* (2008) zeigten, wobei auch über weniger wirksame Fallberichte über diesen Therapieansatz existieren (Harding *et al*, 1989). Im Hinblick auf das Auftreten von Antikörpern sowohl im Serum als auch **im Liquor** wird diese Problematik plausibel, da es sich bei Serum und Liquor um zwei voneinander getrennte Kompartimente handelt und damit Plasmaaustauschverfahren keinen (direkten) Einfluss auf den Liquor haben. Die durchgeführten Studien zeigten damit eine klinische Relevanz der GAD-Ak im Rahmen der LE und anderer GAD-Ak-assozierter Erkrankungen auf, während die pathophysiologische Rolle noch nicht umfassend geklärt werden konnte und weiterführende Untersuchungen notwendig sind (Mälter *et al*, 2010). Meinck *et al* (2001) schätzten anhand der bis dato publizierten Literatur ein, dass GAD-Ak diagnostische Marker neurologischer oder nicht-neurologischer Erkrankungen sein können, die neuropathophysiologische Wirkung bisher jedoch ungeklärt blieb. Konkretisiert wurde diese Problematik von Vincent (2008), es wurden weiterführende systematische Untersuchungen zur pathophysiologischen Relevanz der GAD-Ak gefordert.

1.2.2.2 Die GAD ist das Schlüsselenzym der GABA-Synthese

GABA, der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS, entsteht durch eine Pyridoxalphosphat (PALP) -abhängige Decarboxylierung von Glutamat (Abbildung 1-1). Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutamatdecarboxylase katalysiert (Mälter *et al*, 2010), welches selektiv in GABAergen Neuronen und den β -Zellen des Pankreas zu finden ist (Saiz *et al*, 2008).

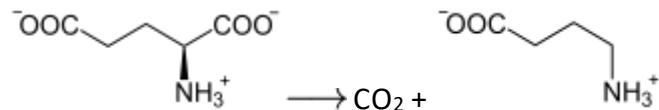


Abbildung 1-1: durch Glutamatdecarboxylase katalysierte Reaktion

Durch eine Decarboxylierung von Glutamat entsteht GABA, dabei wird CO_2 freigesetzt. (übernommen aus: Wikipedia.org, Stichwort: Glutamatdecarboxylase, 22.11.2015)

Von diesem Enzym sind zwei Isoformen bekannt, GAD65 und GAD67, die Namensgebung basierte auf ihrem Molekulargewicht (*Soghomonian et al, 1998*). Im Gegensatz zu anderen Neurotransmittern bestehen einige Besonderheiten: Die Isoformen stammen **(1)** von unterschiedlichen Genen und sind **(2)** unterschiedlich in den Neuronen lokalisiert, wie *Erlander et al (1991)* zeigen konnten. Auch wenn beide Isoformen sowohl im Zytosol als auch membrangebunden auftreten, so findet sich die Isoform GAD65 überwiegend in den terminalen Endigungen der Axone, während GAD67 überwiegend im Zytosol oder an den Dendriten lokalisiert ist. Ursache hierfür sei eine erhöhte Affinität von GAD65 zu Membranen wie die der neuronalen Vesikel, welche letztendlich in die terminalen Endigungen transportiert werden. Ergänzend sei erwähnt, dass GAD67 mit GAD65 Heterodimere bilden kann und somit auch in terminalen Nervenendigungen gefunden wird (*Sloviter et al, 1996*). Die Affinität zu Membranen beruht auf dem N-terminalen Ende dieses Enzyms (ein Protein), welches neben der Interaktion mit Membranen auch an der Steuerung und Regulation intrazellulärer Prozesse teilnimmt. Der C-Terminus enthält das katalytische Zentrum mit Bindungsstellen für PALP (*Qu et al, 1998*). Darüber hinaus liegen **(3)** 50% der GAD als Apoenzym (apoGAD, inaktives Enzym ohne den Cofaktor PALP) vor (*Martin et al, 1993*). Der Anteil von apoGAD65 ist im Vergleich zu apoGAD67 wesentlich größer, zudem ist apoGAD67 unter normalen Bedingungen nahezu vollständig mit PALP gesättigt und daher enzymatisch aktiv (*Kaufman et al, 1991*). Eine schnelle Überführung in das (aktive) Holoenzym gelingt durch Assoziation von Apoenzym und Cofaktor durch eine Depolarisation (*Miller et al, 1979*). **GAD65 ist daher mengenmäßig die häufigere Isoform**, woraus eine besondere Bedeutung in der kurzfristigen Regulation und Erhöhung der GABA-Konzentration resultiert, was bei synaptischen Übertragungsprozessen essentiell ist. Dem entgegengesetzt zeigten jedoch Knockout-Versuche (GAD65^{-/-} und GAD67^{-/-}), dass **GABA hauptsächlich durch GAD67 produziert wird**. Ursache hierfür ist möglicherweise eine höhere Aktivität von GAD67 aufgrund der beschriebenen nahezu vollständigen Sättigung mit PALP unter normalen Bedingungen

(*Soghomonian et al, 1998*). Auf Basis dieser Erkenntnisse haben die beiden Isoformen voneinander abweichende Funktionen in der Zelle (*Soghomonian et al, 1998*): GAD65 hat ihre wesentliche Bedeutung in der synaptischen Transmission, während GAD67 in der Regulation des intrazellulären Metabolismus beteiligt zu sein scheint; es sei angemerkt, das GABA in den Citratzyklus, ein wichtiger Stoffwechselweg der zellulären Energieproduktion, eingeschleust werden kann (*Martin et al, 1993*).

1.2.2.3 Unklare Pathophysiologie der GAD-Ak

GAD-Ak sind Immunglobuline vom Typ IgG, die gegen die GAD gerichtet sind und deshalb auch als Autoantikörper bezeichnet werden. GAD als wichtigstes GABA-synthetisierendes Enzym im ZNS (*Lernmark et al, 1996*) wird immer wieder im Zusammenhang mit diesen Autoantikörpern und damit assoziierten Erkrankungen beschrieben, unklar ist bislang die neuropathophysiologische Bedeutung der GAD-Ak. Erste Untersuchungen zur Klärung erfolgten mit GAD-Ak haltigen Seren und Liquores von an SPS erkrankten Patienten. Durch eine Inkubation **in vitro** dieser Patientenproben mit „crude rat cerebellar extracts, CRCE“ wurde eine Inhibition der GABA-Synthese aufgrund verminderter Enzymaktivität nachgewiesen (*Dinkel et al, 1998*), die genauen pathophysiologischen Mechanismen blieben jedoch unklar. Zwei Jahre später, ebenfalls **in vitro** durchgeführt, zeigten Experimente von *Mitoma et al (2000)* eine verminderte synaptische GABAerge Transmission in zerebellären Hirnschnitten der Ratte unter Verwendung GAD-AK haltiger Seren bzw. Liquores von Patienten mit zerebellärer Ataxie. Die genaue neuropathophysiologische Bedeutung blieb weiterhin unklar, aktuellere Daten scheinen diese Hypothesen jedoch zu bestätigen (*Vianello et al, 2008*). Dem gegenübergestellt finden sich kaum Publikationen über die Wirkung der GAD-Ak, welche bei der anti-GAD-Enzephalitis gefunden werden können, im Allgemeinen gibt es nur wenige Berichte über die Bedeutung der GAD-Ak **in vivo**.

1.3 AUFBAU DES HIPPOCAMPUS

Der Kortex des Telencephalons (z. dt.: Endhirn oder Großhirn) gliedert sich in den Allokortex und den Isokortex, wobei ebenfalls eine dazwischenliegende Schicht, der Mesokortex, beschrieben wird. Aus phylogenetischen Gründen wird der Hippokampus (alternativ: Archikortex) dem Allokortex zugeordnet. Dieser besteht aus dem Gyrus dentatus (DG), dem Cornu ammonis (CA) und dem Subiculum ([Abbildung 1-2](#)).

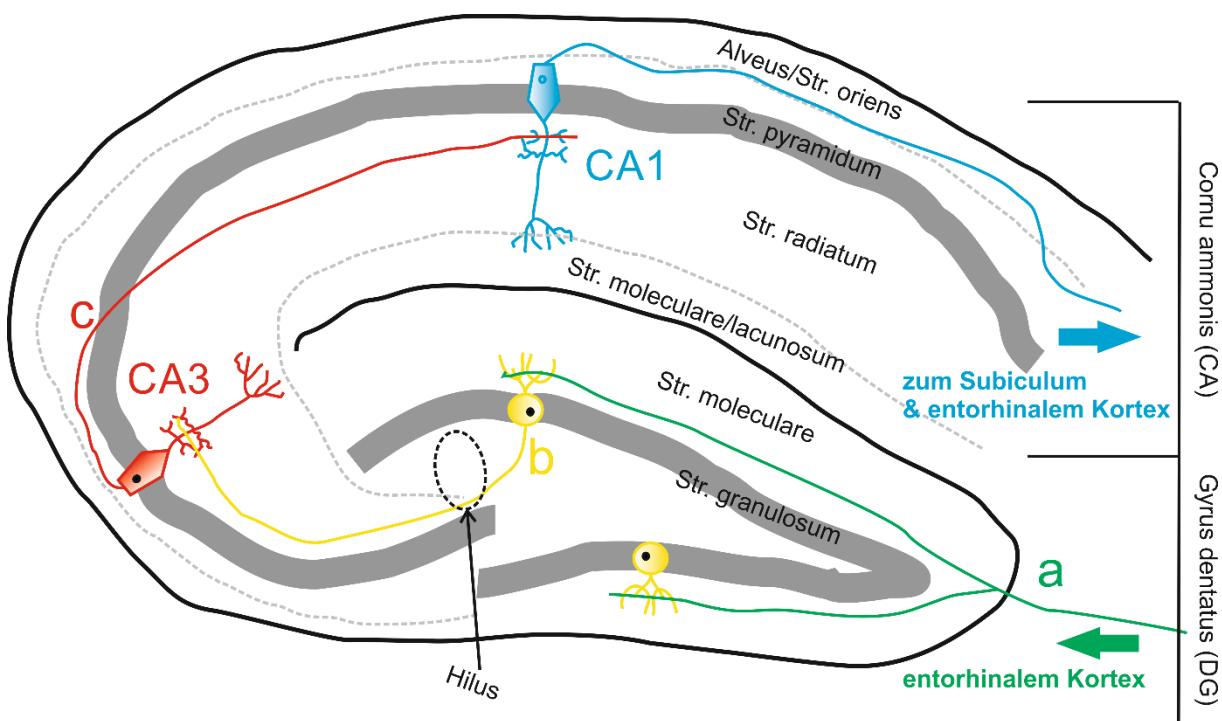


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Hippocampusformation

Dargestellt ist der Hippocampus mit dem Cornu ammonis (CA, Ammonshorn) und dem Gyrus dentatus (DG). (a): Tractus perforans; (b): Körnerzelle mit Moosfasern; (c): Pyramidenzelle mit Schaffer-Kollateralen

Zusammen mit dem Kortex entorhinalis formiert sich die sogenannte Hippocampusformation. Der paarige Hippocampus befindet sich im Temporallappen in direkter Nachbarschaft zu den Seitenventrikeln und stellt damit die mediale Begrenzung des Temporallappens dar (*Lopes da silva et al, 1990*).

1.3.1 Histologischer Aufbau des Hippocampus

Bereits in nativen histologischen Schnitten fallen zwei ineinandergreifende, C-förmige Zellschichten auf, die vom Stratum pyramidale des Cornu ammonis und dem Stratum granulosum des Gyrus dentatus gebildet werden ([Abbildung 1-2](#)). Typisch, wie auch für andere

Strukturen des Gehirns, ist eine histologische Schichtung des CA und DG. Der **Gyrus dentatus** besteht aus drei Schichten: 1. Stratum moleculare mit den Dendriten der Körnerzellen, 2. Stratum granulosum mit den Zellkörpern der Körnerzellen und 3. Hilum (oder Hilus), welches überwiegend Faserverbindungen enthält, u.a. das *Moosfasersystem* (Axone der Körnerzellen), worüber synaptische Verbindungen mit den CA3-Pyramidenzellen gebildet werden. Dem gegenübergestellt besteht das **Cornu ammonis** aus ca. 5 Schichten. Das Stratum moleculare/lacunosum enthält im Wesentlichen apikale Dendriten der Pyramidenzellen des Stratum pyramidale. Im Stratum radiatum verlaufen die *Schaffer-Kollateralen*, also die Axone der CA3-Pyramidezellen, welche in der CA1-Region Synapsen mit den Dendriten der dort gelegenen Pyramidenzellen ausbilden. Die Zellkörper der Pyramidenzellen bilden das sog. Stratum pyramidale. Schließlich existiert noch das Stratum oriens, durch welches überwiegend die CA1-Pyramidenzell-Axone ziehen und über das Subiculum den entorhinalen Kortex erreichen. Neben der Schichtung lässt sich das Cornu ammonis in 4 Abschnitte unterteilen, den Regionen CA1-CA4. Die CA4-Region stellt den Übergang vom Gyrus dentatus in das Ammonshorn dar und bildet den sogenannten Hilus, durch den das Moosfasersystem die CA3-Pyramidenzellen erreicht. Die CA1-Region geht in das **Subiculum** über, welches damit zwischen dem Cornu ammonis und dem **Kortex entorhinalis** liegt. Hippocampale Efferenzen enden in diesem Kortex. Vom entorhinalen Kortex wiederum gelangen Afferenzen über den *Tractus perforans* in den Gyrus dentatus, womit letztlich ein kreisförmiges Erregungssystem gebildet wird (*Lopes da silva et al, 1990*).

1.3.2 Trisynaptischer Erregungsweg im Hippocampus

Bereits 1934 beschrieb *Lorente de Nò* und später *Blackstad (1956)* die Faserverbindungen des Hippocampus. In den nachfolgenden Jahren führten die Untersuchungen von *Andersen et al (1971)* zu der Hypothese eines lamellenartig aufgebauten Fasersystems innerhalb des Hippocampus. Neuere Untersuchungen hingegen scheinen dieser Hypothese zu widersprechen und es wurde ein 3-dimensionaler Aufbau des Fasersystems postuliert, in dem die exzitatorischen Faserverbindungen einen trisynaptischen Verschaltungsweg formen (*Amaral and Witter, 1989*).

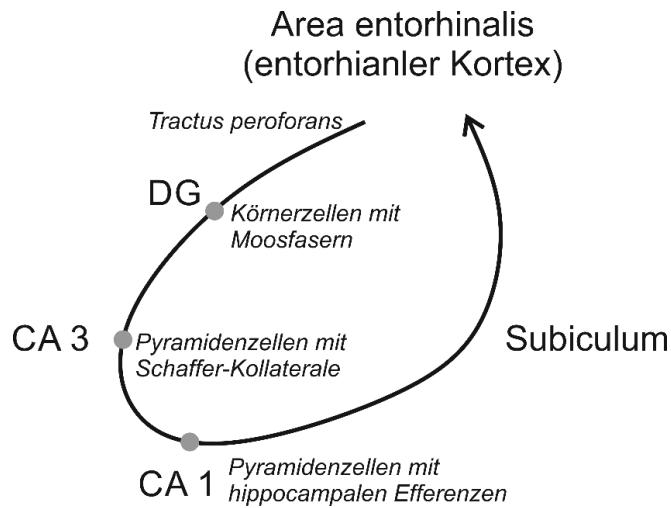


Abbildung 1-3: Trisynaptischer Erregungsweg im Hippocampus (vereinfachtes Schema);

Über die trisynaptische Verschaltung gelangen entorhinal Afferenzen in einem kreisförmigen Prozess als hippocampale Efferenz zurück in den entorhinalen Kortex. DG = Gyrus dentatus, CA = Cornu ammonis

Innerhalb des Hippocampus werden die Afferenzen über einen trisynaptischen Weg verschaltet (Abbildung 1-3). Hierzu zählen die Körnerzellen (mit Moosfasern), die CA3-Pyramidenzellen (mit Schaffer-Kollateralen) sowie die CA1-Pyramidenzellen mit ihren Axonen. Die wichtigsten Afferenzen gelangen aus dem entorhinalen Kortex über den Tractus perforans in den Hippocampus und werden zunächst auf die Körnerzellen des Gyrus dentatus verschaltet. Ca. 85% der hippocampalen Synapsen werden mit den terminalen Endigungen des Tractus perforans gebildet (*Matthews et al, 1976*). Die Axone der Körnerzellen ziehen als Moosfasern durch den Hilus (Abbildung 1-2) zu den Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region des Cornu ammonis und bilden dort synaptische Verbindungen aus. Die Axone dieser Pyramidenzellen wiederum enden als Schaffer-Kollateralen an den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen im Stratum radiatum. Von hier gelangen die Efferenzen über das Subiculum zurück in den entorhinalen Kortex. Der wichtigste Transmitter hierbei ist **Glutamat**, der aufgrund seiner depolarisierenden Wirkung zu den exzitatorischen Transmittern gezählt wird. Die zellulären Antworten auf diesen Transmitter beruhen maßgeblich auf dem NMDA-Rezeptor, schätzungsweise 80% aller Rezeptoren des Hippocampus sind auf diesen Subtyp zurückzuführen (*Greenamyre et al, 1985*). Daneben findet sich ubiquitär im Hippocampus der inhibitorische GABA-Rezeptor, dessen Wirkung hypopolarisierend ist.

1.4 EXZITATORISCHE UND INHIBITORISCHE REZEPTOREN

1.4.1 Der NDMA-Rezeptor

1.4.1.1 Aufbau des NMDA-Rezeptors

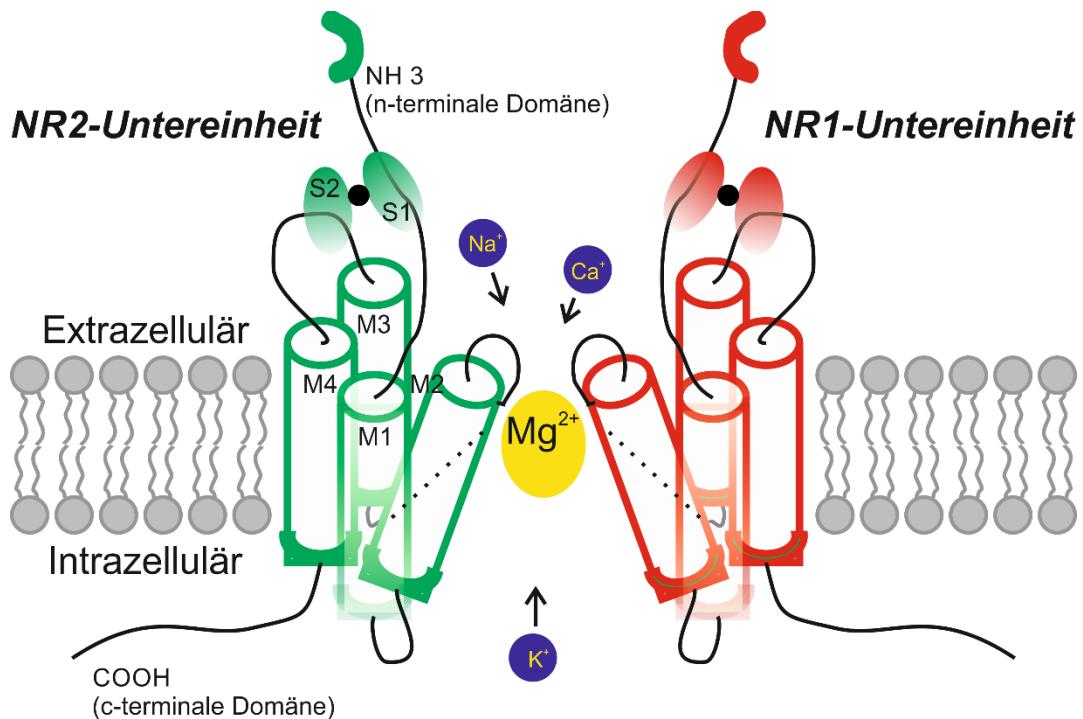


Abbildung 1-4: Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptorkanals

Dargestellt sind 2 Untereinheiten des Rezeptors, NR1 und NR2, die aus 4 Transmembrandomänen (M1-M4) bestehen. Extrazellulär befindet sich 2 Ligandenbindungsdomänen S1 und S2, welche für die Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung benötigt werden. Grau dargestellt: Zellmembran

Glutamatrezeptoren sind ionotrope, ligandengesteuerte, exzitatorische Ionenkanäle, zu denen der NMDA-Rezeptor (NMDA = N-Methyl-D-Aspartat), der AMPA-Rezeptor (AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid) und der Kainat-Rezeptor gezählt werden. Sie lösen ein exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP) aus. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie wird ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung postuliert (Dingledine et al, 1999). In den 1990er Jahren wurde intensiv die Struktur des NMDA-Rezeptors (Abbildung 1-4) untersucht. Die Topologie konnte dabei einheitlich geklärt werden: Verschiedene Arbeitsgruppen wie Wo and Oswald (1994) oder Bennet und Dingledine (1995) zeigten durch Analyse des N- und C-terminalen Endes, dass eine Rezeptor-Untereinheit (NR1 bzw. NR2) aus 3 transmembranären Domänen (M1, M3, M4) besteht, während sich die M2-Domäne von der zytoplasmatischen Seite kommend im Sinne eines „re-entrant membrane loop“ in den transmembranären Komplex einfügt. Damit liegt das N-terminale Ende extrazellulär, während

sich das C-terminale Ende der zytoplasmatischen Seite zugewandt befindet. Problematisch stellte sich die Analyse der Stöchiometrie der Untereinheiten dar. Allgemein akzeptiert werden für den Aufbau des Rezeptors die Untereinheiten NR1 und NR2, daneben wird auch eine NR3-Untereinheit beschrieben. *Premkumar et al (1997)* postulierten ein Pentamer, bestehend aus 3 NR1-Untereinheiten und 2 NR2-Untereinheiten, während u.a. *Béhé et al (1995)* eine tetramere Konfiguration aus 2 NR1- und 2 NR2-Untereinheiten schlussfolgerten. Moderne Kristallstrukturanalysen favorisieren derzeit die tetramere Konfiguration (*Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004*), die Arbeitsgruppe um *Furukawa* hielt 2005 jedoch fest, dass eine allumfassende Analyse der Grundstruktur ist bisher noch nicht gelungen ist. Es sind 4 Subtypen der NR2-Untereinheit bekannt (NR2 A-D), während von der NR1-Untereinheit, abhängig vom Spliceprodukt, 8 Isoformen bekannt sind. Die intrazellulären Anteile der Untereinheiten binden an Strukturproteine der Zellmembran bzw. des Zytoskeletts oder enthalten für die weiterführende Signaltransduktionen Kinasen, während der extrazelluläre Anteil die für die Rezeptoraktivierung notwendigen Ligandenbindungsdomänen enthält (*Furukawa et al, 2005*). Strukturanalysen zeigten, dass diese Domänen von zwei extrazellulären Komponenten, der S1-Domäne und der S2-Domäne gebildet werden. Die S1-Domäne liegt auf der angrenzenden M1-Aminosäuresequenz, während die S2-Domäne auf dem M3-M4-loop liegt (*Dingledine et al, 1999; Sun et al, 1998*). Die bevorzugten aktivierenden Liganden sind Glutamat (bindet an die NR2-Untereinheit) und Glycin (bindet an die NR1-Untereinheit).

1.4.1.2 Funktion des NMDA-Rezeptors und mit ihm assoziierte Erkrankungen

Für die Aktivierung des Rezeptors und die damit einhergehende Öffnung („gating“) ist die gleichzeitige Bindung von Glutamat und Glycin notwendig (*Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004*). Physiologisch ist die Offenwahrscheinlichkeit jedoch durch eine spannungabhängige Blockade der Pore durch ein Mg^{2+} -Ion abhängig. Diese Blockade lässt sich durch eine gleichzeitige Depolarisation der Prä- und Postsynapse aufheben. Durch dieses sog. „double-gating“ nimmt der NMDA-Rezeptor eine Sonderstellung ein. Der Rezeptorkanal ist permeable für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} . Insbesondere dem Ca^{2+} -Influx wird die intrazelluläre Rezeptorwirkung zugesprochen. Dieser Influx hat eine wichtige Bedeutung in der Entwicklung synaptischer Plastizität, welche durch die Langzeit-Potenzierung (LTP, engl.: long-term potentiation) bzw. Langzeit-Depression (LTD, long-term depression) moduliert wird. Dadurch wird der Rezeptor immer wieder im Zusammenhang mit höheren Hirnfunktionen wie Gedächtnis und Lernen

gebracht, weshalb er Ansatz neurologischer Erkrankungen wie z.B. **Epilepsie**, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose oder der Alzheimer-Erkrankungen ist. Die Sekretion von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas wird u.a. durch Glutamatrezeptoren reguliert, weshalb auch die Entwicklung des Diabetes in Zusammenhang mit dem Rezeptor diskutiert wird (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004).

1.4.1.3 Bedeutung des NMDA-Rezeptors für diese Arbeit

Im Rahmen der GAD-Enzephalitis hat der Rezeptor keine bekannte Bedeutung, eignet sich aber durch seine physiologischen Eigenschaften zur Untersuchung der Wirkung der GAD-Antikörper auf elektrische Aktivität im Hippocampus. So kann durch Entfernung des Magnesiums die Rezeptoraktivierung erleichtert werden. Dies ist die Grundlage des Epilepsiemodells, welches in dieser Arbeit verwendet wurde (Kap. 1.5).

1.4.2 Der GABA-Rezeptor

Bei diesem Rezeptortyp handelt es um einen ligandengesteuerten, inhibitorischen Rezeptor, der weiter unterteilt wird in den GABA_A – und GABA_B-Rezeptor. Aktiviert wird er durch GABA (γ -aminobutyric-acid). Der Typ-B-Rezeptor ist ein metabotroper, G-Protein gekoppelter Rezeptor, dessen Wirkung nach Ligandenbindung über ein G_i-Protein vermittelt wird. Ähnlich den Glutamatrezeptoren handelt es sich bei den Typ-A-Rezeptoren um ligandenaktivierte, ionotrope Ionenkanäle. Über eine Regulation des Cl⁻-Stroms lösen diese Rezeptoren jedoch ein inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP) aus (Aktories et al, *Pharmakologie und Toxikologie*, Aufl. 10, S. 127). Sein struktureller Aufbau besteht aus 5 Untereinheiten (pentamere Stöchiometrie), von denen jede 4 Transmembrandomänen besitzt. Die Untereinheiten bestehen dabei aus 2 α -Untereinheiten (1-6), 2 β -Untereinheiten (1-3) und einer weiteren Untereinheit γ , δ , ε oder π , die häufigste Kombination ist 2 α 2 β 1 γ (Wong et al, 2015; Schmidt et al, *Physiologie des Menschen*, 31. Aufl., S. 64). Der Typ-A-Rezeptor kommt ubiquitär im ZNS vor.

1.5 DIE VERSCHIEDENEN EPILEPSIEMODELLE

1.5.1 Das evozierte Potenziale im Magnesiummangel-Modell

Unter evozierten Potenzialen versteht man die im ZNS gemessene Antwort auf die Reizung eines Sinnesorgans oder Nervs. Beispiele aus der Neurophysiologie und dem klinischen Alltag sind u.a. das visuell-evozierte Potenzial und das akustisch-evozierte Potenzial, mit dessen Hilfe diagnostische Untersuchungen am lebenden Menschen durchgeführt werden können (*Schmidt et al, Physiologie des Menschen, 31. Auflage, S. 174*).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von GAD-Antikörper auf die epileptische Aktivität im Hippocampus der Ratte untersucht. Es war daher notwendig, spontane elektrische Aktivität im Hippocampus zu evozieren, um diesen Effekt beschreiben zu können. Zur Realisierung erscheint der NMDA-Rezeptor sinnvoll, da er, wie in Kap. 1.4.1 beschrieben, als exzitatorischer Rezeptor im Hippocampus gilt und NMDA-Antagonisten wie 2-APV (2-amino-5-phosphonovaleric acid) antiepileptische Eigenschaften aufzeigen (*Stanton et al, 1986*). Seine Aktivierung erfolgt physiologisch durch Ligandenbindung. Dies kann experimentell durch elektrische Reizung oder dem Entfernen von Magnesium gefördert werden. Hierdurch hebt sich der spannungsabhängige Porenblock auf, wodurch sich spontan evozierte Potenziale ausbilden.

Es war schon hinreichend bekannt, dass der NMDA-Rezeptor durch Magnesium blockiert ist und die NMDA-Rezeptor-Antworten von der extrazellulären Magnesiumkonzentration abhängig sind. So zeigten *Ault et al (1980)*, dass sich die NMDA-Antworten bei Erniedrigung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration unterhalb der physiologischen Werte deutlich verstärkten. Weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen zeigten eine Spannungsabhängigkeit der Blockade des NMDA-Rezeptors durch Magnesium, woraus ein spannungs- und magnesiumabhängiger Membranwiderstand (und darüber eine Regulation des transmembranären Stroms) resultiert: Eine Reduktion des Membranwiderstandes und damit eine Erhöhung des Stroms lässt sich durch Entfernung von extrazellulärem Magnesium erzielen; dieser Effekt ist spannungsabhängig (*Nowak et al, 1984; Mayer et al, 1984*). Es zeigte sich, dass die grundlegenden Eigenschaften des Kanals (Öffnungswahrscheinlichkeit bzw. Öffnungsduer, Öffnungsrate, Leitfähigkeit) in magnesiumfreier Umgebung unabhängig von der Membranspannung sind. In Anwesenheit von Magnesium kam es jedoch zu

signifikanten Änderungen der Leitfähigkeit in Abhängigkeit vom Membranpotenzial, was letztlich eine spannungsabhängige Blockade des Kanals durch Mg^{2+} -Ionen impliziert. Hieraus wurde die Strom(I)-Spannungskurve(U) des NMDA-Rezeptors entwickelt. Diese Ergebnisse wurden von *Crunelli et al (1894)* bestätigt und eine transmitterähnliche exzitatorische Wirkungsweise Mg -freier extrazelluläre Lösungen hieraus abgeleitet. Verschiedene Arbeitsgruppen haben damit den Einfluss von extrazellulärem Magnesium auf den NMDA-Rezeptor untersucht. Zusammengefasst werden damit die depolarisierenden (exzitatorischen) NMDA-Rezeptorantworten in Anwesenheit von Magnesium durch einen spannungsabhängigen Mg -Block und einem erhöhten Membranwiderstand antagonisiert, durch Entfernung von Magnesium reduzieren sich die Effekte, spontane Aktivität entsteht.

1.5.2 Das Epilepsie-Modell „Gabazin“

Gabazin mit der Summenformel $C_{15}H_{17}N_3O_3 \cdot HBr$ und dem chemischen Namen *2-(3-Carboxypropyl)-3-amino-6-(4 methoxyphenyl)pyridaziniumbromid* ist ein allosterischer GABA-A-Rezeptor-Antagonist. Seine Wirkung beruht auf einer Blockade transmembranärer Ströme, die durch Bindung von GABA an den Rezeptor ausgelöst werden. Es handelt sich um $Cl^{(-)}$ -Ströme. Interessanterweise ist Gabazin in der Lage, GABA-induzierte Ströme potent zu blockieren, während es die Ströme von Agonisten wie Steroiden (z.B. Alphaxalone) oder Barbituraten (z.B. Pentobarbital) nur bedingt hemmt (*Ueno et al, 1997*). Hieraus resultiert eine desinhibierende Wirkung, wodurch Gabazin in der Lage ist, ähnlich dem Magnesiummangel-Modell, die Ausbildung epileptiformer spontaner Aktivität zu fördern. *Behrens et al (2007)* haben diesen Effekt in magnesiumhaltigen extrazellulären Lösungen nachgewiesen. Die Wirkung von Antikörpern auf die Entwicklung von Spontanaktivität kann daher mit Gabazin ebenfalls untersucht werden.

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bisherige Beschreibungen der Pathophysiologie der GAD-Ak erfolgten im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wie dem SPS, der zerebellären Ataxie oder dem Diabetes mellitus (*Dinkel et al, Mitoma et al*). Vermutlich bewirken GAD-Ak eine Störung der GABAergen Transmission, eine umfassende Klärung dieses Effektes gelang jedoch bislang nicht. Diese Antikörper treten auch bei der GAD-Enzephalitis mit assoziierter Temporallappenepilepsie auf, eine autoimmune Genese wird ebenfalls vermutet. Durch

Inkubation hippocampaler Neurone mit GAD-positiven Seren wurde in der Tat eine spezifische Immunreaktion GABAergen Neuronen nachgewiesen (Vianello *et al*, 2006). Zwei Jahre später untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe erstmals den Einfluss von GAD-Ak haltigen Seren und Liquores von Epilepsiepatienten auf kultivierte hippocampale Neurone mittels Patch-Clamp-Messungen (Vianello *et al*, 2008), es zeigte sich eine erhöhte Spontanaktivität aufgrund supprimierter inhibitorischer Potenziale durch GAD-Ak, vereinbar mit zuvor publizierten Daten. In allen genannten Fällen wurden die elektrophysiologischen Experimente **in vitro** durchgeführt. Die benötigten Zellen wurden aus Rattenhirnen gewonnen und dann entweder mit GAD-Ak haltigen Seren oder Liquores inkubiert oder während laufender Messung perfundiert. Die Bedeutung **in vivo** ist daher ebenfalls ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher der Einfluss der GAD-Ak nach stereotaktischer Injektion **in vivo** auf hippocampale elektrische Aktivität **in vitro** weiter untersucht werden.

Geklärt werden soll unter anderem:

- Welche pathophysiologischen Effekte hat der Liquor von Patienten mit GAD-Enzephalitis und assoziierter Epilepsie **in vivo**?
- Sind diese Effekte konform zu den bisher vermuteten Effekten **in vitro**?

Zur Klärung dieser Frage werden

- GAD-Ak haltige Liquorproben stereotaktisch in den Hippocampus injiziert,
- anschließend Schnitte des Hippocampus für elektrophysiologische Messung spontaner Aktivität angefertigt,
- die erhobenen Daten mit Kontrollgruppen verglichen und in Bezug zu bisher publizierten Daten gesetzt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Verwendete Chemikalien für die Lösungszubereitung

Tabelle 2: Chemikalien für die Lösungszubereitung

Chemikalie	Hersteller/Bestellnummer	Einheiten
CaCl ₂	Sigma, D/C5080	147,019 (g/mol)
D-(+)-Glucose	Sigma, D/G7528	180,16 (g/mol)
Gabazin (Hydrobromid)	Tocris, UK/SR95531	10 (mg)
HCl, rauchend 37%	Merck, D/1.09057.1000	
KCl	Sigma, D/P9333	74,55 (g/mol)
MgCl ₂	Sigma, D/M8266	95,21 (g/mol)
NaCl	Sigma, D/S7653	58,44 (g/mol)
NaH ₂ PO ₄	Merck, D/1.06346.1	137,99 (g/mol)
NaH ₂ PO ₄	Sigma, D/S8282	119,98 (g/mol)
NaHCO ₃	Sigma, D/401676	84,01 (g/mol)
NaOH	Merck, D/1.09137.1000	1 (mol/l)
Sucrose	Sigma, D/S7903	342,3 (g/mol)

2.1.2 Verwendete Begasungen

Tabelle 3: Verwendete Gase für Tierpräparation und Messungen

Pharmaka	Hersteller
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde, D-Wiesbaden
Sauerstoff (100% O ₂)	Linde, D-Wiesbaden

2.1.3 Verwendete Pharmaka für die Tierpräparation und die Messungen

Tabelle 4: Pharmaka für Tierpräparation und Messungen

Pharmaka	Hersteller
Diethylether getrocknet 8254, 74,12 g/mol	J.T. Baker, NL
Ketanest Injektionslösung 25 mg/ml	Pfizer, D
Novaminsulfon-Tropfen 500 mg/ml	Ratiopharm, D
Rompun 2%	Bayer Vital, D

2.1.4 Verwendete Substanzen zur intrazerebralen Injektion

Tabelle 5: Substanzen zur intrazerebralen Injektion aus humanem Material (Liquor GAD-Antikörper)

Nummer	Patienteninformation	Titer	Bezugsquelle
1. (886)	GAD-Ak assoziierte Epilepsie Pat.: 18 Jahre, weiblich Entnahme am 30.04.2007	1:1000	Prof. Dr. Christian G. Bien Epilepsie-Zentrum Bethel Deutschland
2. (2526)	GAD-Ak assoziierte Epilepsie Pat.: 27,5 Jahre, weiblich Entnahme am 22.01.2010	1:256	Prof. Dr. Christian G. Bien Epilepsie-Zentrum Bethel Deutschland

Tabelle 6: Substanzen zur intrazerebralen Injektion aus kommerzielle Herstellung

Substanz	Hersteller
NaCl 0,9% (physiologische Kochsalzlösung)	Braun, D

2.1.5 Verwendetes Mehr- und Einwegmaterialien

Tabelle 7: Mehr- und Einwegmaterial

Substanz	Hersteller
Borosilikatröhrchen	Science Products, D
Glasflaschen, 1000ml	Schott, D
Glasflaschen, 2000ml	Schott, D
Guillotine (small animal decapitator)	Stoelting, USA
Infusionssysteme	Braun, D
Injektionsnadel 75N	Hamilton AG, CHE
Messkolben, 1000ml	Hirschmann, D
Messkolben, 2000ml	Hirschmann, D
Messkolben, 500ml	Hirschmann, D
Pipette, 10µl – 100µl	Eppendorf, D
Pipette, 100µl – 1000µl	Eppendorf, D
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Greiner Bio-One, A
Polyester-S PET-Faden grün, geflochten, nicht resorbierbar, 90cm, 2x HR17 5/0	Catgut, D
Rasierklingeln aus Stahl	Campden Instruments, GB
Rundfilterpapier, 55mm Durchmesser	Carl Roth, D

Sekundenkleber	UHU, D
Silberdraht 0,005 Zoll	Science Products, D
Stereotaxie-Apparatur SR-5N Nr. 01025	Narishige, Japan

2.1.6 Verwendete Geräte und Software

Tabelle 8: Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Analog-Digital-Verstärker, Power 1401	CED, UK
Aufbewahrungskammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, D
Bad Haake 5P	Thermo, D
Badthermostat Haake C 10	Thermo, D
Faradaykäfig, Eigenbau,	IPHYS, Rostock, D
Interfacekammer, BSC-HAT	Havard Apparatus, USA
Kaltlichtquelle, KL 1500 LCD	Schott, D
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, D
Magnetrührer, RET-GS	IKA, D
Magnetrührer, RH basic 2	IKA, D
Mikroskop, Leica MZ6	Leica, D
Osmometer, Knauer Osmometer Automatic	Knauer GmbH, D
Personal Computer	Intel Core i5, Windows 7, von HP, D
pH-Meter, CG840	Schott, D
Pipettenziehgerät, PIP5	HEKA Elektronik, D
Rasierapparat, HS7801	Severin, D
Rollerpumpe (peristaltisch), Perimax	Spetec, D
Schnittkammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, D
Signal 2.16	CED, UK
Temperaturregler, TC-10	npi electronic, D
Tisch, schwingungsgedämpft	TMC, USA
Verstärker, EXT-08 und DPA-2FX	npi electronic, D
Vibratom, Integralslice 7550 MM	Campden Instruments, UK
Waage, MC-1 Analytic AC 120S	Sartorius, D
Zahnbohrer, TCM 300	Nouvg, D

2.1.7 Verwendete Lösungen

Für die durchgeführten Versuchsreihen wurden zwei verschiedene, selbständige hergestellte Lösungen verwendet, deren Funktion entweder in der Aufrechterhaltung eines physiologischen extrazellulären Milieus oder in der Reduktion des Sauerstoffverbrauchs durch Kühlung bestand. Es handelte sich hierbei um eine ACSF-Stammlösung und um eine Sucrose-Lösung, wobei die ACSF-Lösung unterschiedlich angesetzt wurde.

2.1.7.1 Die ACSF-Stammlösung

Die ACSF-Lösung (engl.: artificial cerebrospinal fluid) ist eine Carbonat-/Bicarbonat gepufferte, dem extrazellulären Liquor der Ratte adaptierte Lösung, die in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen für drei Indikationen genutzt wurde: Zum einen diente sie der Sicherstellung des Überlebens der Hippocampusschnitte in einem speziell für die Aufbewahrung angefertigtem Behälter. Zum anderen diente sie der Versorgung der Hirnschnitte während einer laufenden Messung, dazu wurde Lösung dem Messkammersystem zugeführt. Schließlich wurden die Messelektroden zur Herstellung eines elektrisch leitenden Stromkreises mit ACSF-Lösung gefüllt. Die Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung einer ACSF-Stammlösung

Substanz	MW [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	125
NaHCO ₃	84,01	21
KCl	74,56	3
NaH ₂ PO ₄	120	1,25
CaCl ₂	147,02	2,5
MgCl ₂ *	95,22	1
Glucose	180,2	13

pH-Wert: 7,4 ; Osmolarität: 299-306 mosmol

(*entfällt bei Mg-freier Lösung)

Im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihen wurden eine Mg²⁺-haltige bzw. eine Mg²⁺-freie ACSF-Lösung verwendet, Gabazin konnte zusätzlich gelöst werden. Die Osmolarität der Mg²⁺-haltigen Lösung betrug im Durchschnitt 303 mosmol/kg H₂O, die der Mg²⁺-freien Lösung lag im Durchschnitt bei 300 mosmol/kg H₂O.

2.1.7.2 Die Saccharose-Lösung

Die eisgekühlte Saccharose-Lösung (Sucrose-Lösung) diente zur Kühlung des herauspräparierten Rattenhirns, wodurch der Sauerstoffverbrauch während der Anfertigung hippocampaler Schnitte reduziert werden sollte. Die Osmolarität betrug im Schnitt 326 mosmol/kg H₂O, die Zusammensetzung ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 10: Zusammensetzung einer Sucrose-Stammlösung

Substanz	MW [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	87
Sucrose	342,3	75
NaHCO ₃	84,01	25
KCl	74,56	2,5
NaH ₂ PO ₄	137,99	1,25
CaCl ₂	147,02	0,5
MgCl ₂	95,22	7
Glucose	180,16	10

pH-Wert: 7,4 ; Osmolarität: 326-328mosmol

2.1.7.3 Titration der Lösungen und Kontrolle der Osmolarität

Der pH-Wert aller Lösungen wurde bei Raumtemperatur unter Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) unter Zuhilfenahme eines pH-Meters mittels HCl bzw. NaOH auf 7,40 titriert. Anschließend erfolgte mit einem Osmometer die Kontrolle der Osmolarität der angesetzten Lösung. Diese sollte innerhalb der in Tabelle 9 und Tabelle 10 genannten Referenzbereiche liegen, ggf. konnte durch Zugabe von destilliertem Wasser oder Glucose die Osmolarität angepasst werden. Bis zur Verwendung lagerten die Lösungen dann in Flaschen luftdicht abgefüllt bei 4-7°C.

2.2 METHODEN

Alle nachstehenden Methoden wurden nach Einweisung durch Herrn PD Dr. med. Kirschstein, Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Rostock, in eigener Leistung angewandt. In die Auswertung sind daher nur Versuchstiere eingegangen, die durch den Verfasser dieser Arbeit selbstständig operiert, präpariert und gemessen wurden.

2.2.1 Genehmigung zur Vornahme von Studien an lebenden Wirbeltieren

Die internationalen Richtlinien zur ethischen Vornahme von experimentellen Studien an lebenden Tieren wurden eingehalten (European Community Council). Hierfür wurde nach dem Tierschutzgesetz unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-017/11 (Versuchsleiter Herr PD Dr. med. Timo Kirschstein) eine Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittesicherheit und Fischerei MV, Abt. Veterinärdienste, Ernährungswissenschaft, Tierzucht, erteilt. Dabei wurden in allen Fällen weibliche Wistar-Ratten (von: Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere waren bei Lieferung 20-30 Tage alt und hatten ein Ausgangsgewicht von 130-150g. Für die Injektion war jedoch ein Gewicht von mindestens 170g notwendig, weshalb man die Tiere zunächst wachsen ließ. Eine ausreichende Wasser- und Futterversorgung waren zu jeder Zeit gewährleistet. Die Haltung erfolgte bis zur stereotaktischen Injektion in Käfigen mit jeweils maximal 2 Tieren, nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere vereinzelt gehalten.

2.2.2 Operative Vorbereitung elektrophysiologischer Messungen

Vor jeder elektrophysiologischen Messung wurde bei allen Versuchstieren über ein stereotaktisches Verfahren eine der in Tabelle 5 und Tabelle 6 angegebenen Substanz in den Hippocampus injiziert. Anschließend erfolgten einen Tag später die Präparation des Rattenhirns und die Anfertigung der Hippocampusschnitte für die geplanten Feldpotenzialmessungen.

2.2.2.1 *Stereotaktische operative hippocampale Injektion*

Die Versuchstiere wurden zunächst unter der Verwendung von Ketanest-S® (Wirkstoff: Esketaminhydrochlorid) und Rompun® (Wirkstoff: Xylazin) analgesiert, narkotisiert und relaxiert. Dabei wurden Ketanest und Rompun im Verhältnis 7:1 aufgezogen und

gewichtsadaptiert (0,5ml auf 100g Körpergewicht) i.p. injiziert. Die Narkosetiefe wurde über einen Schmerzreiz am Fuß des Tieres geprüft, im Schnitt wurde eine für die Operation ausreichende Tiefe gewichtsabhängig nach 10-30 Minuten erreicht. Bei Bedarf konnte über eine weitere individuell angepasste Injektion von Ketanest-S® die Narkose vertieft werden. Für den Fall, dass auch bei einer Re-Injektion von Ketanest-S® die gewünschte Narkosetiefe nicht erreicht wurde, ließ man das Tier unter Insufflation von 100%igem Sauerstoff aufwachen. Erst bei Ausbleiben einer Reflexantwort auf den Schmerzreiz wurde mit der Operation begonnen. Es erfolgte dann eine Rasur des Kopfes mithilfe eines Elektrorasierers, wobei der Bereich zwischen Ohrenansatz bis zu den Augen rasiert wurde. Anschließend wurde das Versuchstier auf eine Stereotaxievorrichtung gelegt. Zur Verhinderung von Positionsveränderung während der Bohrung und Injektion wurde das Tier an Nase und Ohren fixiert (siehe [Abbildung 2-1](#)). Beachtet werden musste, dass keine zervikalen Blutgefäße abgeklemmt wurden, damit die Sauerstoffversorgung des Gehirns sichergestellt war. Ferner wurde eine 120 Watt starke Glühbirne zur Wärmestrahlung verwendet, um eine Unterkühlung des Tieres während der Operation zu vermeiden.

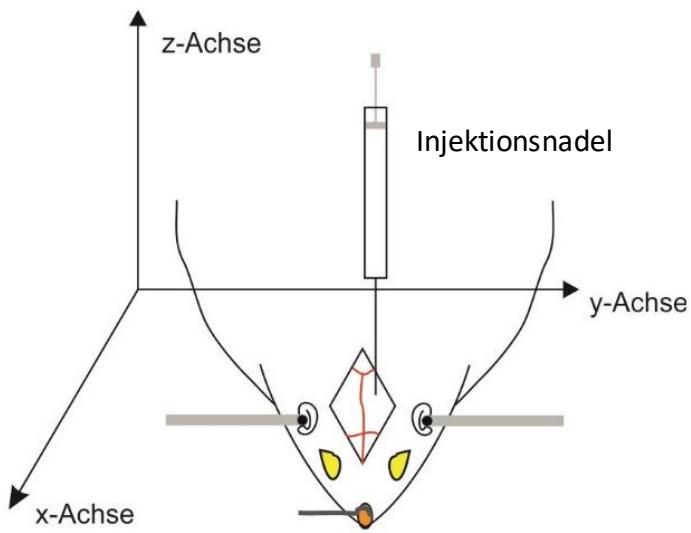
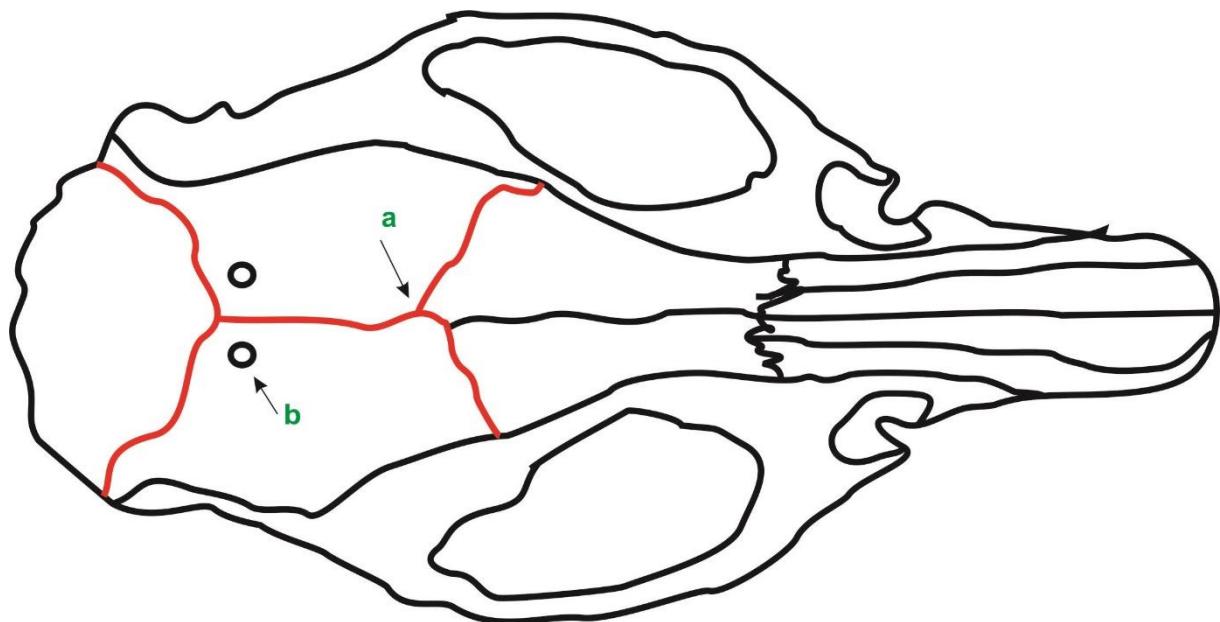


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Tieroperation, Ansicht von oben auf

Der Schädelknochen liegt frei, Blick auf das Bregma. Die Spitze der Injektionskanüle kann in allen Raumrichtungen bewegt werden. Sie wird auf das Bregma gesetzt, anhand des Koordinatensystems des Stereotaxie-Tisches wird die relative Position des Bregmas im Raum abgelesen. Daraus wird mittels Korrekturkoordinaten die Position der Trepanationslöcher errechnet. Zur Vermeidung von Kopfbewegungen während der Operation ist das Tier an Ohren und Nase fixiert.

Zur Vermeidung einer zu starken Austrocknung der Augen wurde jeweils ein Tropfen physiologische Kochsalzlösung auf die Augen gegeben. Nach einer erneuten Prüfung auf einen Schmerzreiz wurde dann mit einem Skalpell ein medianer Hautschnitt von ca. 2cm Länge gesetzt, sodass das Periost des Schädelknochens frei lag. Dieses wurde mit einem Skalpell entfernt. Ausgetretenes Blut wurde mit einem saugfähigen Tuch aufgenommen, ggf. erfolgte eine Reinigung des Schädelknochens mit steriler physiologischer Kochsalzlösung. Anschließend wurde das Bregma aufgesucht, jener Punkt, an dem die Sutura coronalis und Sutura sagittalis aufeinander treffen (a in [Abbildung 2-2](#)). Die Koordinaten dieses Punktes konnten an der Stereotaxievorrichtung abgelesen werden, indem man die Spitze der Injektionsnadel direkt über dem Bregma positionierte. Mithilfe dieser Koordinaten wurde anschließend die relative die Position des Hippocampus und damit Position der Bohrlöcher am Schädel (b in [Abbildung 2-2](#)), durch die die Injektion erfolgen sollte, rechnerisch ermittelt. Dazu wurden folgende Korrekturkoordinaten verwendet: anteroposterior 5,2mm (x-Achse), lateral $\pm 4,3\text{mm}$ (y-Achse) und vertikal 4,8mm (z-Achse). Zur Erleichterung der Kraniotomie erfolgte vor Bohrung eine Filzstiftmarkierung der errechneten Bohrlochkoordinaten.



[Abbildung 2-2:](#) Schematische Darstellung eines Rattenschädels, Ansicht von oben, handgemalt

Rot hervorgehoben sind zur besseren Orientierung die Schädelnähte Sutura sagittalis (mittig), Sutura lambdoidea (hinten) und Sutura coronalis (vorn) mit **Bregma (a)** und **Injektionsstellen beidseits (b)**. Die Injektionsstellen wurden über ein stereotaktisches Verfahren berechnet und mit einem Filzstift markiert.

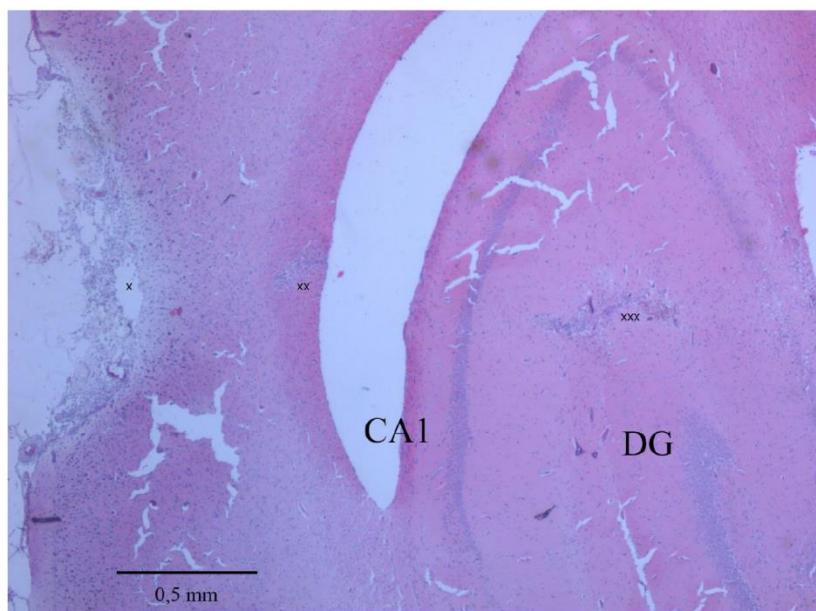


Abbildung 2-3: Durch eine Injektionsnadel verursachte Läsion im Hippocampus.

Übernommen aus: Till Würdemann, Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktionalität des NMDA-Rezeptors an Körnerzellen des Gyrus dentatus bei Anti-NMDA-Rezeptorenzephalitis im Tiermodell der Ratte, Rostock, Juli 2013; erstellt von Prof. Dr. Christian G. Bien, Epilepsie-Zentrum Bethel. Die Kreuze markieren die Position des Einstichkanals in den Hippocampus. CA1-Region, DG = Gyrus dentatus.

Nach der Trepanation des Schädelns wurden die Injektionsnadel (Hamilton AG) mit 5 μ l einer der Substanzen aus Tabelle 5 oder Tabelle 6 aufgezogen. Die Injektionsnadel wurde über dem linken bzw. rechten Bohrloch positioniert und die korrekte Position anhand der berechneten x- und y- Koordinaten verifiziert. Anschließend wurde die Injektionsnadel durch das Bohrloch langsam in das Gehirn eingeführt, die Eindringtiefe entsprach der korrigierten z-Koordinate. In Abbildung 2-3 ist die Läsion im Hippocampus zu erkennen, welche durch die Injektionsnadel hinterlassen wird. Zur Adaption des Gehirns an die Nadel erfolgte zunächst eine zweiminütige Diffusionsphase, in der sich das Gewebe vollständig um die Injektionsnadel legen sollte. Anschließend wurden alle 2 Minuten jeweils 0,5 μ l der Testsubstanz in das Gehirn injiziert nach dem Schema

Injektion → 2 Minuten Adoptions-/Diffusionsphase

Die zweiminütigen Pausen zwischen den Injektionsintervallen waren notwendig, damit die Testsubstanz in das umgebende Gewebe diffundieren konnte. Bei zu kurzen Injektionsintervallen bestand die Gefahr, dass durch steigenden intrazerebralen Druck die

Testsubstanz entlang des Stichkanals aus dem Bohrloch herausgedrückt wurde. Nach erfolgreicher Injektion der 5µl wurde die Spritze langsam entfernt und gereinigt. Es erfolgte dann analog zum beschriebenen Verfahren die Injektion der gleichen Testsubstanz in das kontralaterale Bohrloch. Anschließend wurde das Tier aus der Fixierung heraus gelöst. Der Wundverschluss erfolgte mit einem nicht-resorbierbaren Faden. Abhängig von der Schnittlänge wurden dabei 3-6 Einzelknopfnähte oder eine durchgehende Naht verwendet. Zum Abschluss folgte eine Aufwachphase, in der das Tier bis zum Aufwachen 100%igen Sauerstoff erhielt. In die Trinkflasche wurden ein Teelöffel Glucose und zur Analgesie Novaminsulfon-ratiopharm® (Metamizol-Tropfen), 30 Tropfen auf 500ml, hinzugeben. Die Glucose sollte als Geschmacksträger die Tiere zum Trinken des im Wasser gelösten Schmerzmittels animieren. Die operierten Tiere wurden dann vereinzelt gehalten. Es stand ausreichend Trinkwasser und Nahrung zur Verfügung. Die elektrophysiologische Messung der Feldpotenziale erfolgte einen Tag nach stattgehabter Operation. Dazu war eine Präparation des Rattenhirns notwendig.

2.2.2.2 Präparation des Rattenhirns und Anfertigung hippocampaler Schnitte

Für die elektrophysiologischen Feldpotenzialmessungen wurden Schnitte des Hippocampus benötigt. Diese wurden nach Anfertigung am selben Tag für die geplanten Messungen verwendet, nicht genutzte Schnitte wurden abends verworfen, da ein Überleben in der ACSF-Stammlösung über einen Zeitraum von über 24 Stunden hinaus nicht garantiert werden konnte. Zunächst wurde das Tier unter einem Abzug mit 20ml Diethylether narkotisiert, damit die nachfolgende Dekapitation mit einer Guillotine von dem Tier nicht bewusst wahrgenommen wurde. Eine Erfolgskontrolle erfolgte durch einen Schmerzreiz wie in Kap. 2.2.2.1 dargestellt. Die Dekapitation erfolgte dann schnell direkt kaudal der Ohren. Zur Vermeidung von hypoxischen Hirnschäden mussten die im Folgenden beschriebenen Schritte schnell erfolgen. Unmittelbar nach der Dekapitation wurde mit einem Skalpell ein medianer Hautschnitt der Kopfhaut gesetzt (entlang der Naht) und der Schädelknochen damit erneut freigelegt. Mit einer spitzen Schere wurden über das Foramen magnum der Schädelknochen eröffnet: Zuerst wurde beidseits das Os occipitale/Os parietale von der Schädelbasis durchtrennt, anschließend erfolgte ein Schnitt entlang der Sutura sagittalis (oberhalb der Fissura longitudinalis cerebri). Mit einer Pinzette wurde dann die linke und rechte Schädelkalotte inklusive der darunter liegenden Dura mater entfernt ([Abbildung 2-4](#)).

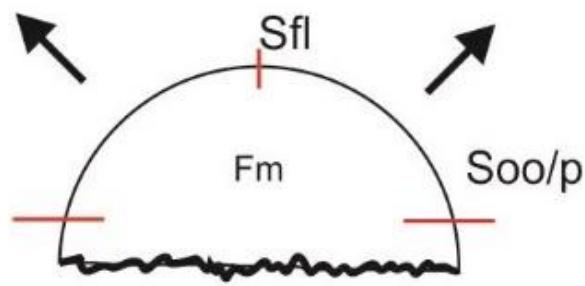


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung mit Blick auf das Foramen magnum (Fm) von kaudal

Die drei roten Linien markieren die Position der 3 Scherenschnitte. 2 Schnitte erfolgen zur Durchtrennung des Os occipitale bzw. Os parietale (Soo/p), ein Schnitt erfolgt entlang der Fissura longitudinalis (Sfl). Die Schädelkalotte ließ sich dann in zwei Teilen abheben (schwarze Pfeile).

Von dem nun sichtbar freiliegenden Gehirn wurde mit einem Skalpell das Kleinhirn abgetrennt. Das Großhirn wurde mit einem Spatel vorsichtig von der Schädelbasis gelöst und in eine Carbogen-begaste, eisgekühlte Sucrose-Lösung eingetaucht. Durch den Kühleffekt reduzierten sich die Stoffwechselaktivität und die Gefahr einer zunehmenden Hirnschädigung durch Hypoxie. Im folgenden Schritt wurde das Gehirn unter Verwendung von Sekundenkleber auf dem Schnittblock einer selbstgebauten Schnittkammer fixiert. Dazu trocknete man das Gehirn schnell auf einem Filterpapier und positionierte es mittig, mit der Hirnbasis nach oben zeigend, auf dem Schnittblock ([Abbildung 2-5](#)). Die Kammer wurde sofort mit Carbogen-begaster, eisgekühlter Sucrose-Lösung aufgefüllt, zur Optimierung des Kühleffektes wurde die Kammer bis auf halbe Höhe des Schnittblocks mit Sucrose-Lösung aufgefüllt und im Kühlschrank über Nacht tiefgefroren. Anschließend wurden mit dem Vibratom auf Höhe des Hippocampus 400µm dicke, transversale (horizontale) Hirnschnitte angefertigt, die Schnittdicke ließ sich am Vibratom individuell einstellen. Die angefertigten Schnitte trennte man vorsichtig mit umgebogenen Injektionskanülen vom Restgewebe und transferierte diese mittels Pipette in die mit ACSF-Stammlösung gefüllte, Carbogen-begaste, selbstgebaute Aufbewahrungskammer. Sinnvoll war, die Pia mater mithilfe einer Pinzette von der Hirnoberfläche zu entfernen, um Zug auf das Hirngewebe während des Slice-Vorganges zu vermeiden. Die angefertigten Hirnschnitte inkubierten und adaptierten dann für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur unter Carbogen-Begasung in der Aufbewahrungskammer. Während dieser Zeit erfolgte sinnvollerweise die Vorbereitung des Messplatzes.

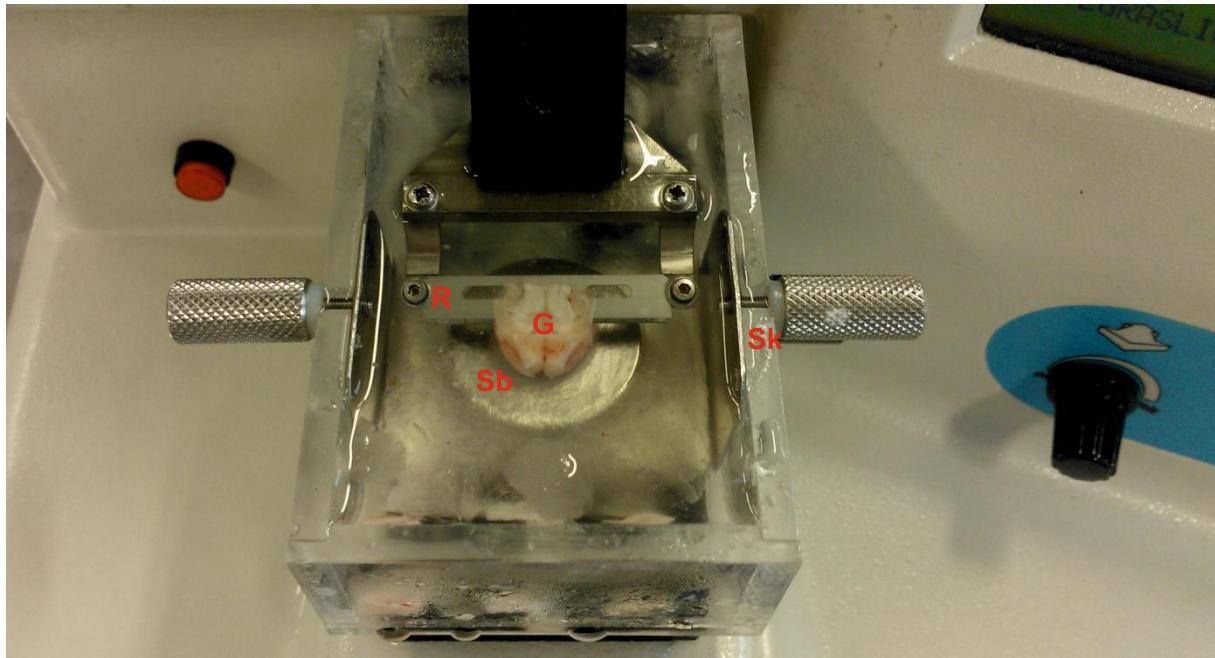


Abbildung 2-5: Gehirn in der Schnittkammer eines Vibratoms, Ansicht von oben

Das **Gehirn (G)** wurde mit Sekundenkleber auf dem **Schnittblock (Sb)** fixiert. Die **Schnittkammer (Sk)** wurde dann mit eisgekühlter Sucrose-Lösung aufgefüllt. Zu sehen ist ferner, wie die **Rasierklinge (R)** durch Vibration und Lateralbewegungen 400 μ m dicke Schnitte anfertigt.

2.2.3 Messung von evozierten Feldpotenzialen

2.2.3.1 Definition der Versuchsreihen

Tabelle 11: Übersicht über die *Messphasen* der drei Versuchsreihen

Versuchsreihe	ACSF-Stammlösung (Phase 1) 1-20 Min.	ACSF-Stammlösung (Phase 2) 21-150 Min.	Testsubstanz	Kontrolle
I	+ Mg ²⁺	0 Mg ²⁺	GAD-Ak 1.	NaCl 0,9%
II	+ Mg ²⁺	0 Mg ²⁺ + Gabazin	GAD-Ak 2.	NaCl 0,9%
III	+ Mg ²⁺	+ Mg ²⁺ + Gabazin	GAD-Ak 2.	NaCl 0,9%

In dieser Arbeit wurde als wesentliche elektrophysiologische Methode die extrazelluläre Ableitung von Feldpotenzialen in hippocampalen Schnitten verwendet. Hierbei wurden die angefertigten Schnitte des Hippocampus in eine Messkammer gelegt und mittels extrazellulären Elektroden spontane Aktivität aufgezeichnet. Das hierbei verwendete Protokoll war stets das Gleiche, lediglich die Zusammensetzung der ACSF-Stammlösung und darin gelöste pharmakologische Substanzen variierten (Tabelle 11). Nur so war ein Vergleich zwischen den Versuchsreihen möglich.

2.2.3.2 *Messprotokoll: Ablauf einer Messung*

Zu Beginn wurde in einer 10 minütigen **Reinigungsphase** eine ACSF-Stammlösung mit Mg^{2+} (ohne Zusatz) in das Messkammersystem geleitet. Dies diente zum einen der Reinigung der Messkammer, zum anderen sollte in dieser Zeit die Messkammer auf die gewünschte Temperatur ($T=32\text{ }^{\circ}\text{C}$) erhitzt werden. Erst dann wurden Hirnschnitte in der Kammer platziert. Anschließend adaptierten die Hirnschnitte während der **Adaptionsphase** unter Verwendung von Mg^{2+} -haltiger ACSF-Stammlösung (ohne Zusatz) für 20 Minuten in der Messkammer. Die Messelektroden wurden dann platziert und die Aufzeichnung über das Computerprogramm Signal® (CED Software) gestartet. Jede Messung gliederte sich dann in **zwei Messphasen** (Tabelle 11). In den ersten 20 Minuten (*Phase 1*) wurde die sogenannte Baseline aufgezeichnet, hierbei wurde stets bei allen Versuchen Mg^{2+} -haltige ACSF-Stammlösung ohne Zusätze verwendet. Die *zweite Phase* dauerte unter Verwendung der in Tabelle 11 aufgeführten ACSF-Stammlösung 130 Minuten. Jede Aufzeichnung wurde also nach insgesamt 150 Minuten beendet. Damit beträgt die Gesamtdauer aller 3 Phasen (Reinigung, Adaption und eigentliche Messung) 180 Minuten. Das oben beschriebene Protokoll wurde streng eingehalten, um Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Versuchsreihen zu gewährleisten.

2.2.3.3 *Herstellung von Messelektroden zur Ableitung extrazellulärer Feldpotenziale*

Die Herstellung der Messelektroden erfolgte mit einem vertikalen Pipettenzieher. An jedem Versuchstag wurden je nach Bedarf bis zu 6 oder mehr neue Glaspipetten hergestellt. In den Pipettenzieher wurde dazu ein Borosilikatröhrchen eingespannt und somit eine Glaspipette durch Einwirkung von Hitze und Schwerkraft gezogen. Mit einer Präzisionspipette erfolgte dann eine Befüllung der hergestellten Glaspipette mit Mg^{2+} -haltiger ACSF-Stammlösung. Als Elektrode wurde anschließend ein chlorierter Silberdraht in die Glaspipette eingeführt. Dank der ACSF-Lösung konnte somit ein elektrisch leitender Kontakt zwischen Silberdraht und Pipettenspitze hergestellt werden. Die auf diese Weise hergestellte Messelektrode wurde in die Stative am Messplatz eingespannt. Messelektroden wurden für maximal einen Versuch und nur am Tag der Herstellung verwendet. Dadurch sollten Störungen aufgrund veralteter Messelektroden ausgeschlossen werden. Nicht verwendete Messelektroden wurden bis zur Nutzung für maximal einen Tag sicher in einer speziell angefertigten Petrischale mit Schaumstofffüllung aufbewahrt.

2.2.3.4 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes

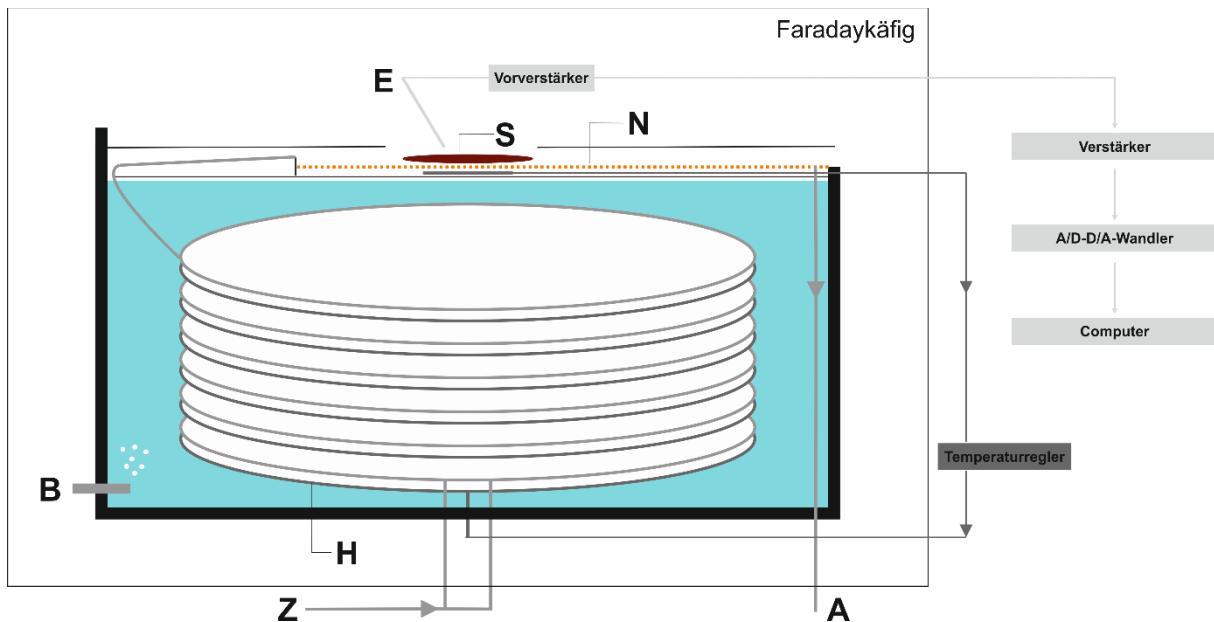


Abbildung 2-6: Schematischer Aufbau eines elektrophysiologischen Messplatzes

Dargestellt ist die Messkammer (Havard Apparatus) in einem Faradayschen Käfig. Getragen wird der Aufbau von einem schwingungsgedämpften Tisch (nicht dargestellt); Zulauf (Z), Ablauf (A), Heizelement (H), Begasung (B), Extrazellularelektrode (E), Hirnschnitte (S), Nylon-Netz (N)

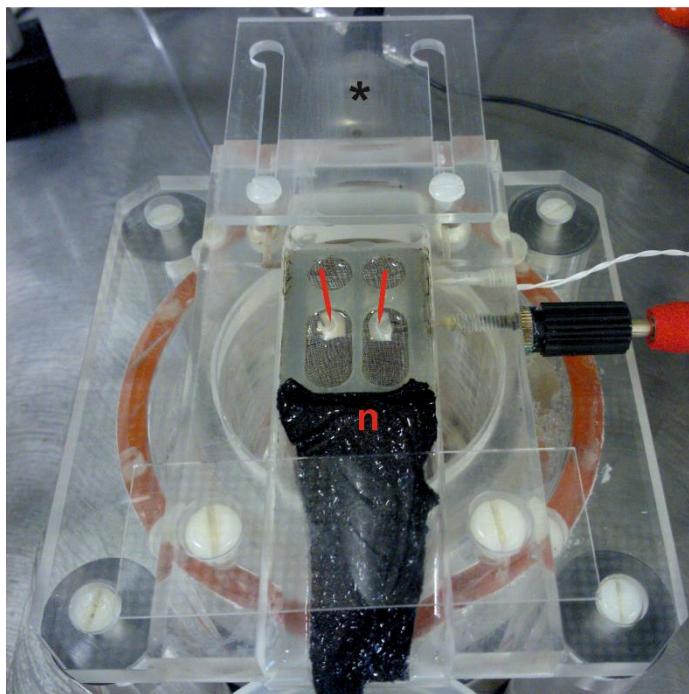
Wichtige Voraussetzung war die Abschirmung der Messvorrichtung gegenüber externen Störeinflüssen. Dazu wurde die Messkammer innerhalb eines Faradayschen Käfigs auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut (Abbildung 2-6, Tisch und Käfig nicht dargestellt). In die Messkammer konnten zwei Hirnschnitte (S) gleichzeitig auf einem Nylon-Netz (N) platziert werden, wodurch zwei parallel laufende Datenaufzeichnungen möglich waren. Über einen Zulauf (Z) wurde die ACSF-Stammlösung in ein spiralförmiges Schlauchsystem geleitet und durch das mit destilliertem Wasser gefüllte Kammerbecken nach oben zu den Hirnschnitten geführt, wodurch diese mit einer konstanten Flussrate umspült wurden. Über den Ablauf (A) wurde die ACSF-Stammlösung in einem Plastikbehälter gesammelt und am Ende des Tages verworfen. Parallel zu diesem Schlauchsystem lief ein Heizelement (H), welches die Temperatur mittels dem Temperaturregler konstant auf $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hielt. Die Ableitung der Feldpotenziale erfolgte mit selbstgefertigten Extrazellularelektroden (E). Diese waren mit einem Verstärker verbunden, das Signal gelangte von dort über einen Analog-Digital-Wandler in den Computer und wurde mit der Software Signal® aufgezeichnet und digital gespeichert. Eine kontinuierliche Begasung (B) mit Carbogen erfolgte.

2.2.3.5 Vorbereitung des Messplatzes und der Messung

Während die Hirnschnitte für mindestens eine Stunde in der Aufbewahrungskammer unter Carbogen-Begasung inkubierten, erfolgte die Vorbereitung des Messplatzes. Die benötigten ACSF-Stammlösungen (Tabelle 11) wurden in einem Heizbecken (32°C) neben dem Faradaykäfig unter Carbogen-Begasung erwärmt. Parallel erfolgte eine kontinuierliche Carbogen-Begasung der AquaDest gefüllten Messkammer, Computer und die benötigten Geräte wurden eingeschaltet. Über ein Infusionssystem und eine peristaltische Pumpe waren die ACSF-Stammlösungen im Heizbecken mit der Messkammer verbunden, sodass die darin liegenden Schnitte kontinuierlich von ACSF-Stammlösung umspült werden konnten. Die Geschwindigkeit der Pumpe war so eingestellt, dass der Boden der Messkammer leicht benetzte und ein dezenter Flüssigkeitsfilm auf den Hirnschnitten entstand. Nachdem ACSF-Stammlösung sichtbar das Kamersystem erreicht hatte, konnte die Heizung der Messkammer eingestellt werden. Diese Heizung hielt die Temperatur der Messkammer konstant auf $32 \pm 0,5$ °C. Während die Messkammer auf 32°C erhitzte, wurden die Elektroden für die Feldpotenzialmessungen angefertigt (Kap. 2.2.3.3) und auf den Stativen eingespannt. Bei erreichten 32°C konnten die Hirnschnitte in die Messkammer gelegt und die Ableitungselektroden in den vorgesehenen Hirnregionen platziert werden. Nach einer 20 minütigen Adaption der Schnitte begann dann die elektronische Aufzeichnung der Spontanaktivität über die Datenerfassungs- und Analysesoftware Signal® (Version 2.16). In den ersten 20 Minuten erfolgte die Aufzeichnung unter Verwendung von Mg^{2+} -haltiger ACSF-Stammlösung, dann wurde, abhängig von der Versuchsreihe, für weitere 130 Minuten auf eine in Tabelle 11 genannte ACSF-Lösung gewechselt. Eine Lagekontrolle der platzierten Ableitungselektroden über einen elektrischen Stimulationsreiz erfolgte nicht, da dies die Entwicklung von spontaner Aktivität hätte beeinflussen können. Des Weiteren musste darauf geachtet werden, dass sich kein Kondenswasser an den Ableitungselektroden niederschlug; es bestand die Gefahr, dass ein Tropfen Kondenswasser in die Messkammer auf die Schnitte fiel und in der Folge die Schnitte sich bewegten. Kondenswasser konnte ohne Störung der laufenden Messung mit einem saugfähigen Tuch von den Messelektroden abgenommen werden.

2.2.3.6 Platzierung der Messelektroden

A



B



Abbildung 2-7: Platzierung der Elektroden im Hippocampus, CA1-Region

(A) Blick von oben auf die Messkammer, zwei Hirnschnitte wurden bereits auf einem Nylonnetz (n) eingelegt. Nachträglich wurden 2 Elektroden (rot) eingezeichnet, die in der CA1-Region des Hippocampus platziert wurden. Die mit dem Sternchen (*) markierte Platte wurde während der laufenden Messung über die Hirnschnitte geschoben. (B) Stativ, ohne eingespannte Elektrode. Mittels der Drehgewinde (x: anteroposterior, y: lateral, z: vertikale Bewegung) konnte die Halterung in allen Raumrichtungen bewegt werden.

Zunächst wurden die Elektroden in die vorgesehenen Stativen eingespannt. Die Stativen wurden dann so neben die Messkammer gestellt, dass sich die Spitzen der Elektroden 1 cm oberhalb der Hirnschnitte befanden. An den Stativen befanden sich Drehgewinde, mit denen die Halterung in allen Raumrichtungen bewegt werden konnte (Abbildung 2-7). Auf diese Weise wurden die Elektrodenspitzen als erstes in der horizontalen Ebene (x,y) über die CA1-Region des Hippocampus positioniert. Anschließend wurden die Elektroden in der vertikalen Richtung (z) soweit nach unten bewegt, bis die Elektrodenspitze sichtbar in die ACSF-Stammlösung eintauchte. Die beschriebenen Vorgänge wurden durch ein Lichtmikroskop beobachtet, welches oberhalb der Messkammer frei beweglich montiert wurde. Ein versehentliches Durchstechen der Hirnschnitte mit der Messelektrode wurde vermieden. Durch die starke Vergrößerung konnte ferner die korrekte Positionierung der Elektrode knapp oberhalb der CA1-Region verifiziert werden.

2.2.4 Kriterien zur Auswertung der Messergebnisse

2.2.4.1 Aufnahmekriterien von Messungen in die Auswertung

In die Auswertung gingen nur Schnitte von Tieren ein, die ich als Verfasser der Arbeit selber operiert und präpariert hatte. Eine Messung wurde nur dann aufgenommen, wenn spontane Aktivität bis zum Ende der Messung auftrat. Diese Messungen wurden ausgewertet. Messungen, bei denen im Verlauf über einen Zeitraum von mehr als 5 Minuten keine Potenziale aufgezeichnet werden konnten, wurden nicht berücksichtigt. Bei einem erregungsfreien Intervall von weniger als 5 Minuten erfolgte eine Mittelung: Über einen Zeitraum von 3 Minuten vor und nach diesem Intervall wurde die durchschnittliche Anzahl der Potenziale pro Minute ermittelt. Der so errechnete Mittelwert galt dann ersatzweise für die nicht registrierten Potenziale. Es durfte in jeder Messung nur ein erregungsfreies Intervall von maximal 5 Minuten auftreten. Tiere mit einem Gewicht über 260g wurden ebenfalls nicht mit in die Auswertung aufgenommen, da die Treffsicherheit des Hippocampus bei der hippocampalen Injektion negativ mit dem Alter bzw. dem Körpergewicht korreliert. Schließlich wurden Messungen verworfen, bei denen Überlagerungsartefakte durch Rauschen eine Auswertung unmöglich machten.

2.2.4.2 Auswahlkriterien der Feldpotenziale während der Auswertung

Bei den Messungen wurde die Aktivität von zwei Hirnschnitten gleichzeitig aufgezeichnet. Zunächst mussten daher Artefakte ausgeschlossen werden. Als Artefakt galt, wenn in beiden Aufzeichnungen ein morphologisch gleich aussehendes Potenzial exakt zum selben Zeitpunkt auftrat. Um derartige Artefakte von echten Spontanaktivitäten unterscheiden zu können, erfolgte eine morphologische Auswertung. Es zeigte sich, dass sich vereinzelt auftretende Artefakte morphologisch deutlich von den regelmäßig auftretenden spontanen Potenzialen unterschieden. So musste ein Potenzial mindestens eine Amplitude von 0,1mV haben und durfte frühestens nach 20 Minuten auftreten (früher auftretende Potenziale wurden immer als Artefakt gewertet). Weiterhin wurden monomorphe, polymorphe und iktale Potenziale differenziert.

2.2.4.3 Kriterien zur Ermittlung der Potenzialdauer

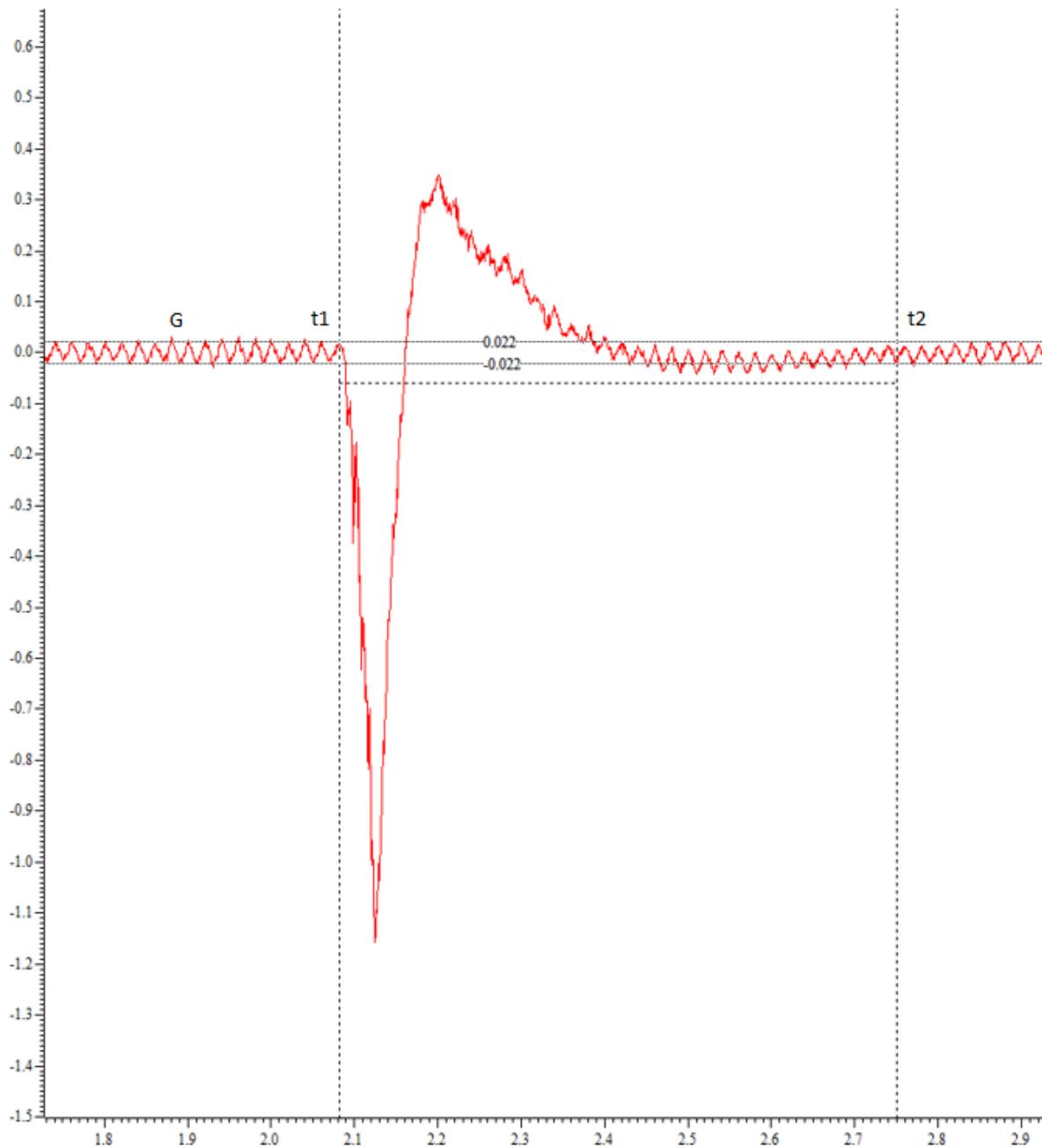


Abbildung 2-8: Ermittlung der Potenzialdauer als Δt

x-Achse: Zeit t in Sekunden, y-Achse: Amplitude A in mV. G: Grundrauschen ohne sichtbare Erregung. t1: Zeitpunkt der De-/Hyperpolarisation eines Potenzials, t2: Zeitpunkt der vollständigen Repolarisation; $\Delta t = t2 - t1$

Der **Zeitpunkt t1**, welcher den Beginn eines Potenzials darstellt, ist charakterisiert durch die einleitende De- oder Hyperpolarisation eines Potenzials (Abbildung 2-8) und ist gut zu erkennen. **t2** kennzeichnet den Zeitpunkt der vollständigen Repolarisation. Dieser Punkt ist erreicht, wenn die Amplitude auf das **Grundrauschen G** abgefallen ist. Die Zeitdifferenz $\Delta t = t2 - t1$ ergibt dann die Dauer eines Potenzials.

2.2.5 Auswertung und Darstellung der Messergebnisse

Die Auswertung und weitere Aufarbeitung der Messdaten wurde mit den kommerziellen Softwareprogrammen **Signal 2.16**, **MS Excel 2010** und **Sigma Plot 11.0** realisiert. Mittels **CorelDRAW X6** erfolgte die weitere Bearbeitung von Diagrammen und Abbildungen. Die Dissertationsschrift wurde mit **MS Word 2010** verfasst.

2.2.5.1 Vorgehen beim Auswerten der Rohdaten

Zunächst wurden alle aufgezeichneten Daten anhand der in Kap. 2.2.4 dargestellten Kriterien analysiert und die geeigneten Hirnschnitte ausgewählt. In einem ersten Schritt erfolgte dann eine qualitative Auswertung durch exakte Analyse der evozierten Feldpotenziale, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Artefakte zu vermeiden. Anschließend wurden die Daten quantitativ durch Auszählung der Feldpotenziale ausgewertet. Die Anzahl der evozierten Feldpotenziale wurde mit *Signal® 2.16* ermittelt. In diesem Softwareprogramm gelten 30 Sekunden aufgezeichnete Messung als „1 Frame“, bei 150 Minuten Messdauer hatte damit jede Messung 300 Frames. Da zeitgleich 2 Hirnschnitte gemessen werden konnten, galten 600 Frames jeder Messung auszuzählen. Dazu zählte man die Anzahl der spontanen Feldpotenziale je Frame unter Anwendung der oben beschriebenen Kriterien und trug die Ergebnisse in eine Excel-Tabelle ein. In Abhängig von der durchgeführten Versuchsreihe (Tabelle 11) und injizierten Substanz (Tabelle 5 und Tabelle 6) wurden die Ergebnisse einer der 6 Versuchsgruppen zugeordnet:

Tabelle 12: Gruppenzuordnung

Versuchsreihe	GAD-Gruppe	Kontroll-Gruppe
I	Gruppe I-A	Gruppe I-B
II	Gruppe II-A	Gruppe II-B
III	Gruppe III-A	Gruppe III-B

In jeder Gruppe wurde anschließend ein Mittelwert aus allen Messdaten errechnet und in einem Punktediagramm grafisch dargestellt. Auf der x-Achse wurde die Zeit im Verlauf über 150 Minuten, auf der y-Achse die Anzahl der Potenziale je 30 Sekunden (bzw. Frame) aufgetragen, als Einheit wurde $\left[\frac{1}{min}\right]$ festgelegt, also die Anzahl der evozierten Feldpotenziale

je Minute. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde ebenfalls mittels Excel berechnet und dargestellt.

2.2.5.2 Darstellung von Mittelwerten

Zur deskriptiven Darstellung der Messergebnisse war die Ermittlung vom arithmetischen Mittelwert (\bar{x}), der Standardabweichung (SD, *standard deviation*) und dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error oft he mean*) notwendig. Diese Werte wurden unter Verwendung folgender Formeln berechnet:

Arithmetisches Mittel

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standardfehler des Mittelwertes

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Hiermit ließen sich alle Daten als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler des Mittelwertes nach der Form $\bar{x} \pm SEM$ darstellen.

2.2.5.3 Signifikanztestung

Zur Signifikanztestung wurden die Daten mit *Sigma Plot 11.0* statistisch ausgewertet. Die wesentlich angewandten Tests waren der Shapiro-Wilk-Test (normal verteilte Daten) und der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (nicht normalverteilte Daten).

3 ERGEBNISSE

3.1 ALLGEMEINE INFORMATIONEN

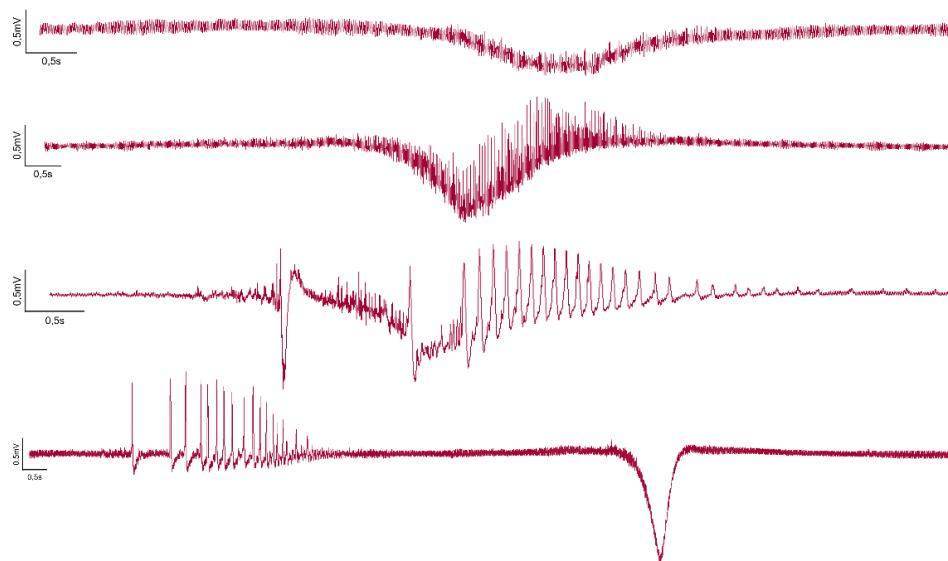
Schon während den ersten Datenaufzeichnungen wurde deutlich, dass die Feldpotenziale keine einheitliche Form hatten und auch die Dauer unterschiedlich ausfiel. Neben der Auszählung der Feldpotenziale erfolgten daher zur näheren Charakterisierung eine Auswertung des morphologischen Erscheinungsbildes und die Ermittlung der durchschnittlichen Dauer der Potenziale. Dazu wurden Kriterien festgelegt, die im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben werden. Alle in die Auswertung eingegangenen Tiere waren weibliche Wistar-Ratten, denen in jeder Versuchsreihe GAD-Antikörper (886 bzw. 2526, *GAD-Gruppe*) oder physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, *Kontroll-Gruppe*) in den Hippocampus injiziert wurden. Mit Ausnahme von zwei Tieren wurden alle Messungen einen postoperativen Tag später durchgeführt; die Messung der beiden anderen Tiere erfolgte am 2. postoperativen Tag. Bei insgesamt 3 durchgeführten Versuchsreihen standen damit Tiere aus 6 verschiedenen Gruppen zur Auswertung zur Verfügung. Es gingen nur Hirnschnitte von Tieren in die Auswertung ein, die den Kriterien zur Auswahl von Hirnschnitten entsprachen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden nur Hirnschnitte ausgewertet, die am selben Setting elektrophysiologisch gemessen wurden.

3.2 PERIOPERATIVE MORTALITÄT

In der ersten Versuchsreihe wurden 24 Tiere operiert, von denen 2 Tiere perioperativ verstarben. Ein weiteres Tier von insgesamt 9 operierten Tieren verstarb perioperativ in der 2. Versuchsreihe. Erfreulicherweise traten in der letzten Versuchsreihe bei 12 operierten Tieren perioperativ keine Verluste auf. Damit sind nur 3 von 45 Tieren verstorben, die Mortalitätsrate betrug damit 6,67%.

3.3 SPREADING DEPRESSION

A



B

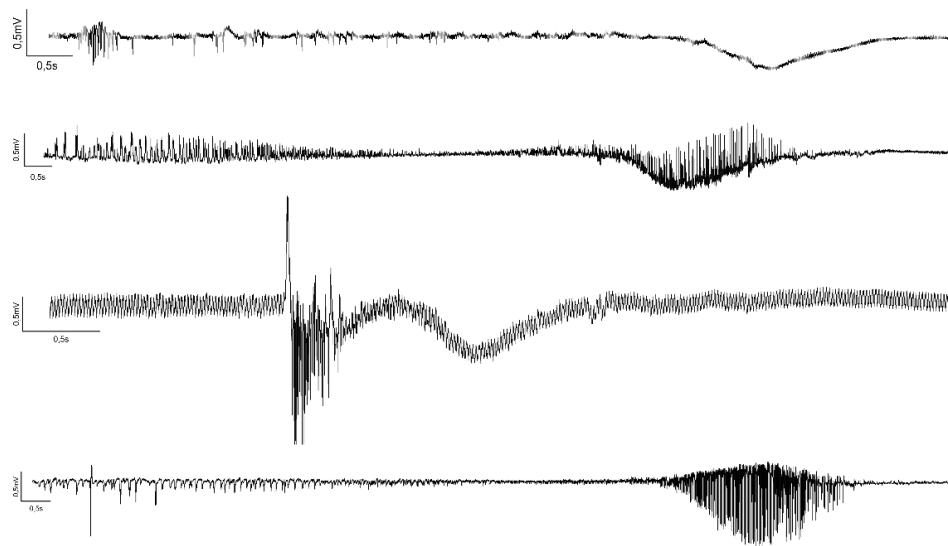


Abbildung 3-1: Spreading Depression

(A) Beispiele aus der GAD-Gruppe. (B) NaCl-Gruppe

Eine Auffälligkeit bei der Auswertung waren die in [Abbildung 3-1](#) dargestellten anfallsartigen Serien mit einer ausgeprägten, langen Hyperpolarisation – die sogenannte Spreading-Depression. Nach solchen Anfällen waren die Hirnschnitte für mehrere Minuten refraktär und das Aktivitätsniveau vor diesen Anfällen wurde selten wieder erreicht. Damit erfüllten diese Schnitte nicht die Anforderungen und konnten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Diese Anfallsserien traten in allen sechs Versuchsgruppen auf

3.4 AUSGEWÄHLTE BEISPIELSPUREN ZU DEN DURCHGEFÜHRTEN MESSUNGEN

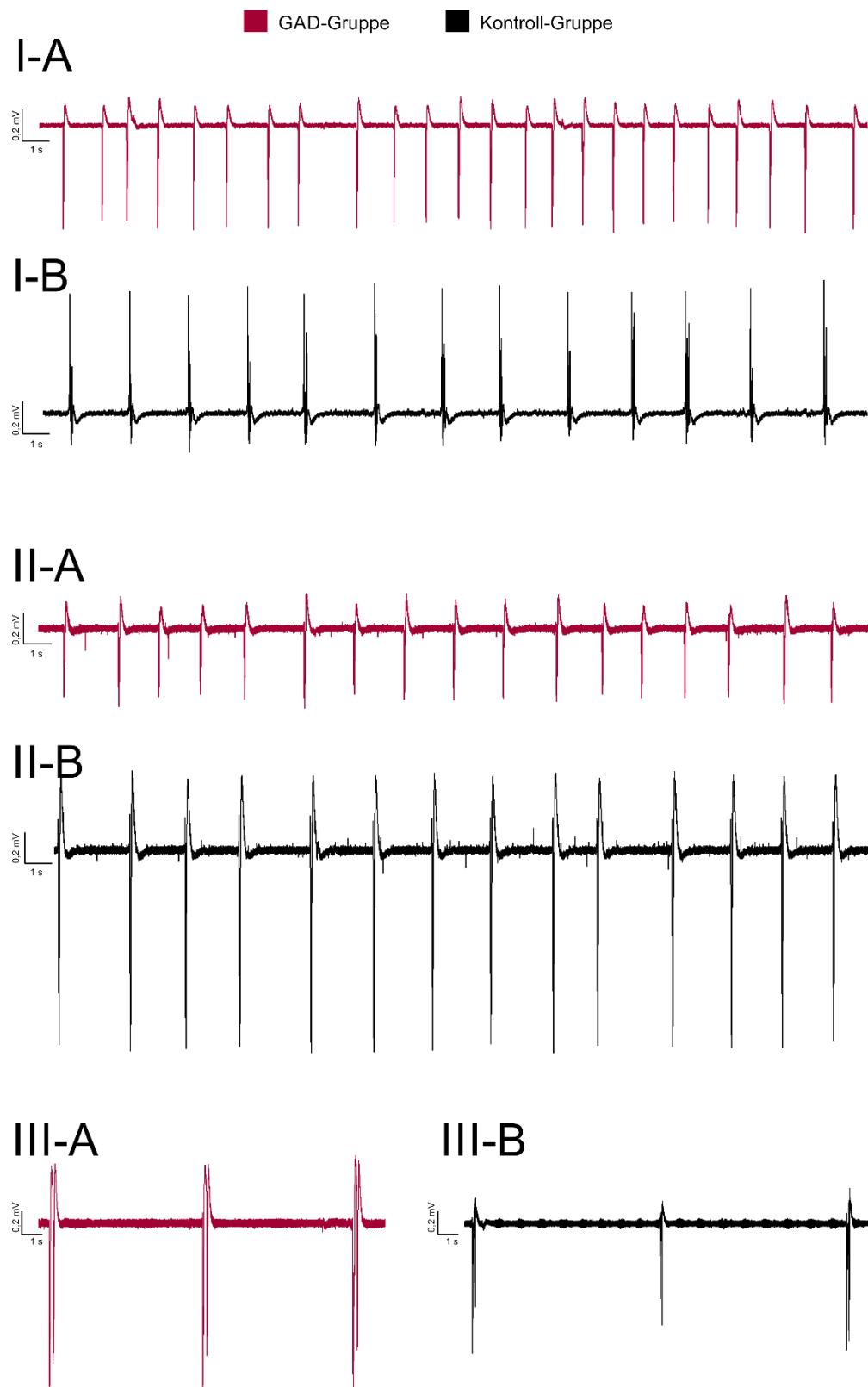


Abbildung 3-2: Ausgewählte Beispieldaten aus den durchgeföhrten Datenaufzeichnungen

Versuchsreihe I: GAD-Gruppe (I-A) und NaCl-Gruppe (I-B); Versuchsreihe II: GAD-Gruppe (II-A) und NaCl-Gruppe (II-B); Versuchsreihe III: GAD-Gruppe (III-A) und NaCl-Gruppe (III-B)

Zu Beginn der Datenerfassung wurde, unabhängig von der intrahippocampal injizierten Substanz, die sogenannte Baseline oder Nulllinie ([Abbildung 3-3](#)) aufgezeichnet, bei der keine evozierten Potenziale entstanden sind.



Abbildung 3-3: Beispiel einer sogenannten Baseline, dargestellt sind 30 Sekunden

Es ist deutlich zu sehen, dass keine spontanen Feldpotenziale im Verlauf der Zeit entstehen. Diese Spur ist repräsentativ für alle durchgeführten Messungen, da alle Hirnschnitte erst nach dem Wechsel der ACSF-Stammlösung während der laufenden Messung spontane Aktivität entwickelten (> 20 Minuten).

Alle Schnitte zeigten diese Linie für mindestens 20 Minuten, also eben mindestens solange, während eine Mg^{2+} -haltige ACSF-Stammlösung (ohne Zusatz) in die Messkammer geleitet wurde. Erst nach dem Wechsel der ACSF-Stammlösung wurden im weiteren Verlauf, mit variierender Latenz in Abhängigkeit von der aktuell eingestellten Geschwindigkeit der peristaltischen Pumpe, evozierte Potenziale registriert ([Abbildung 3-2](#)). Diese waren im äußeren Erscheinungsbild sehr unterschiedlich, auch die Dauer variierte. Deshalb war es sinnvoll, im Vorfeld die Morphologie und Dauer zu beurteilen. So wurde bereits im Vorfeld sichergestellt, dass die Kriterien zur Auswahl von Hirnschnitten korrekt angewandt und Fehler bei der nachfolgenden Auszählung der Feldpotenziale vermieden wurden.

3.5 CHARAKTERISIERUNG VON FELDPOTENZIALEN

3.5.1 Morphologie von Feldpotenzialen

3.5.1.1 Artefakte

Systematische bzw. zufällige Fehler (Abweichungen) führen zu Beeinflussung des *wahren Wertes*, jenem Messergebnis, welches man bei einer fehlerfreien Messung erhalten würde. In dieser Arbeit waren zufällige Fehler von Bedeutung, welche durch äußere Einflüsse die Messaufzeichnung störten und zu Artefakten führten. Da stets zwei Hirnschnitte gleichzeitig registriert wurden, entstanden derartige Artefakte zeitgleich in beiden Messspuren ([Abbildung 3-4](#)).

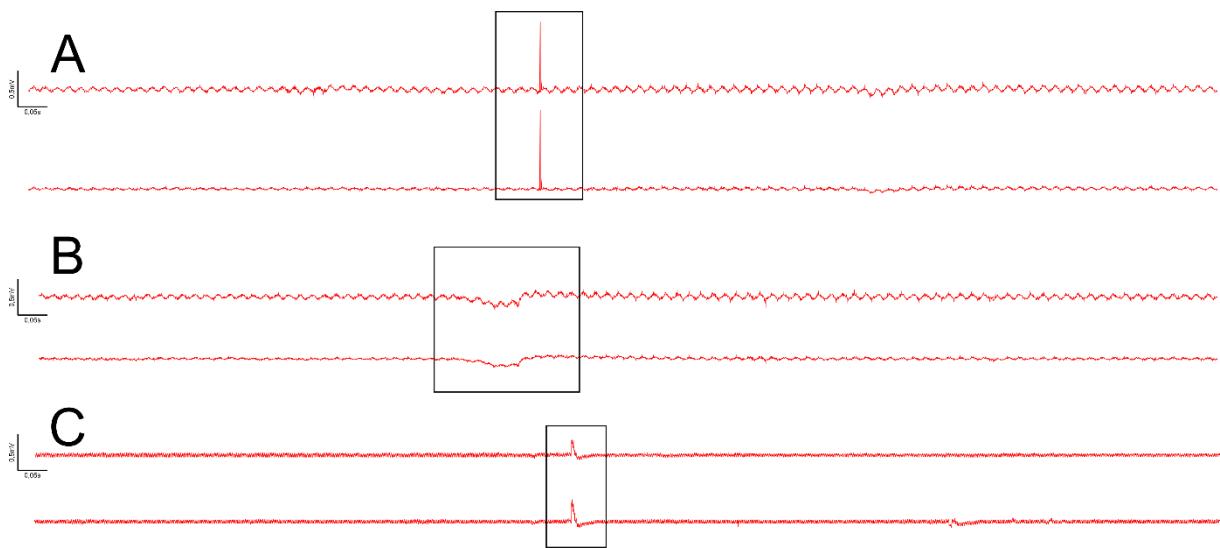


Abbildung 3-4: Beispiele für Registrierungen von Artefakten

Dargestellt sind Artefakte aus verschiedenen Datenaufzeichnungen (A-C). Diese treten stets zum gleichen Zeitpunkt auf und besitzen eine identisch oder zumindest ähnlich aussehende Form. (A) Artefakte bei externen Störungen hinter der Elektrode. (B+C) Artefakte bei externen Störeinflüssen vor der Elektrode.

Artefakte waren morphologisch nicht einheitlich, es zeigte sich, dass hierdurch Rückschlüsse auf den Entstehungsort möglich wurden. Die in (A) dargestellten Artefakte entstanden durch externe Störung der elektrischen Verbindungskabel und Geräte zwischen Messelektrode und Verstärker. Typisch ist ein Potenzial hoher Amplitude und sehr kurzer Dauer ($t < 0,001s$), welches beispielsweise durch versehentlichen Kontakt mit elektrischen Kabeln entstanden ist. Direkte oder indirekte Einflüsse auf die Messkammer, die Hirnschnitte oder zuführenden Lösungs- oder Begasungssysteme verursachten die in (B) und (C) dargestellten Artefakte, typischerweise mit einer niedrigen Amplitude und längerer Dauer. Insbesondere die in (C) dargestellten Artefakte sind verwechselbar mit echten Potenzialen, weshalb hier ein Vergleich der Morphologie mit anderen registrierten Potenzialen essentiell war. Es war natürlich möglich, dass auch zwei wahre Feldpotenziale zur gleichen Zeit entstanden sind. Als Artefakt wurde daher gewertet, wenn sich zeitgleich registrierte Potenziale morphologisch ähneln (oder identisch sind) und sich von den sonst registrierten, spontan evozierten Potenzialen morphologisch unterschieden. Artefakte traten zufällig in allen registrierten Messungen auf, ohne die laufende Aufzeichnung negativ zu beeinflussen. Von daher war es legitim, als Artefakt gewertete Potenziale in der weiteren Auswertung konsequent zu ignorieren.

3.5.1.2 Erläuterungen zu der Darstellung der Potenzialmorphologie

In den Abbildung 3-6 bis einschließlich Abbildung 3-11 werden die verschiedenartig aufgezeichneten Potenziale mit ihrer Morphologie, den 6 Versuchsgruppen getrennt zugeordnet, dargestellt. Hierbei wurde eine fortlaufende Nummerierung in jeder Gruppe gewählt, wobei jede einzelne Nummer einer einzelnen, separat durchgeföhrten Messung entspricht. Bei jeder Messung wurde die Spontanaktivität von zwei Hirnschnitten gleichzeitig registriert, sodass in jeder Reihe Potenziale von einem oder zwei unterschiedlichen Hirnschnitten dargestellt werden (für eine genaue Auftrennung siehe unten). Betrachtet man die einzelnen Potenziale, fällt zunächst eine für alle Gruppen einheitliche Grundform der Feldpotenziale auf (Abbildung 3-5). Es bestand zum einen die Möglichkeit einer Hyperpolarisation mit nachfolgender Depolarisation, zum anderen die spiegelbildliche Variante mit einer Depolarisation, gefolgt von einer Hyperpolarisation. Des Weiteren konnte nach der einleitenden Hyper- oder Depolarisation bei orientierender Betrachtung auch unmittelbar folgend eine Repolarisation auftreten.



Abbildung 3-5: Darstellung der Grundform registrierter Potenziale

(A) Potenzial mit einer Hyperpolarisation und nachfolgender Depolarisation. (B) Potenzial mit einer Depolarisation und nachfolgender Hyperpolarisation.

Zur deskriptiven Beschreibung wurden die Potenziale in 3 Gruppen eingeteilt: In Abhängigkeit von der Häufigkeit bzw. der Dauer traten die Potenziale dabei einzeln oder als Serie von Potenzialen, entweder komplex oder gar iktal, auf. Definitionsgemäß waren damit einzelne Potenziale immer monomorph, während Potenzialserien sowohl monomorph als auch polymorph auftreten können. Beispelpotenziale wurden ausgewählt und in den folgenden Abbildungen dargestellt.

3.5.1.3 Morphologie der Potenziale aus der 1. Versuchsreihe (0 Mg)

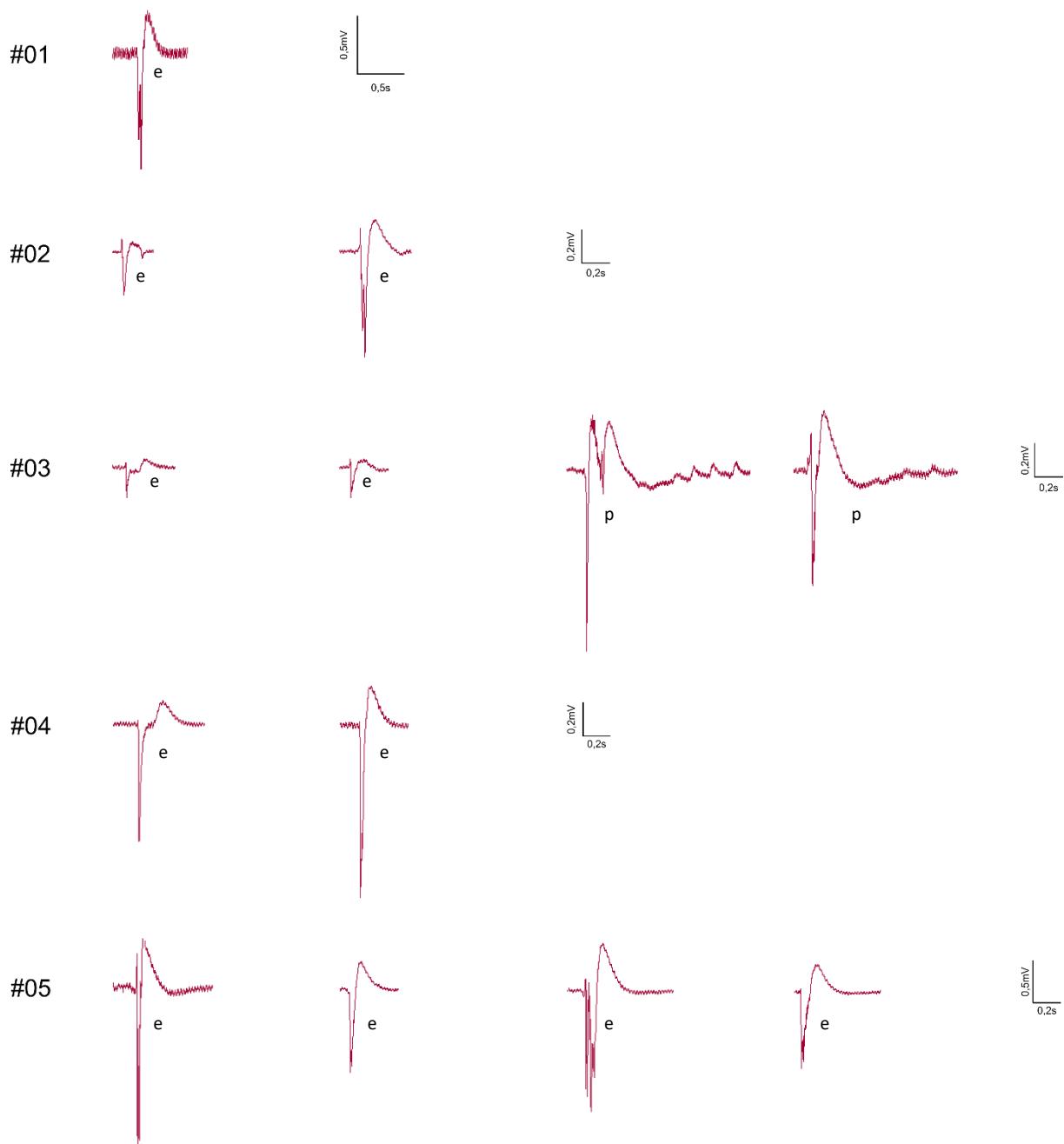
A

Abbildung 3-6: (A) Darstellung verschiedener Potenziale, 1. Versuchsreihe, GAD-Gruppe
e=einzel, m=monomorph, p=polymorph, i=iktal

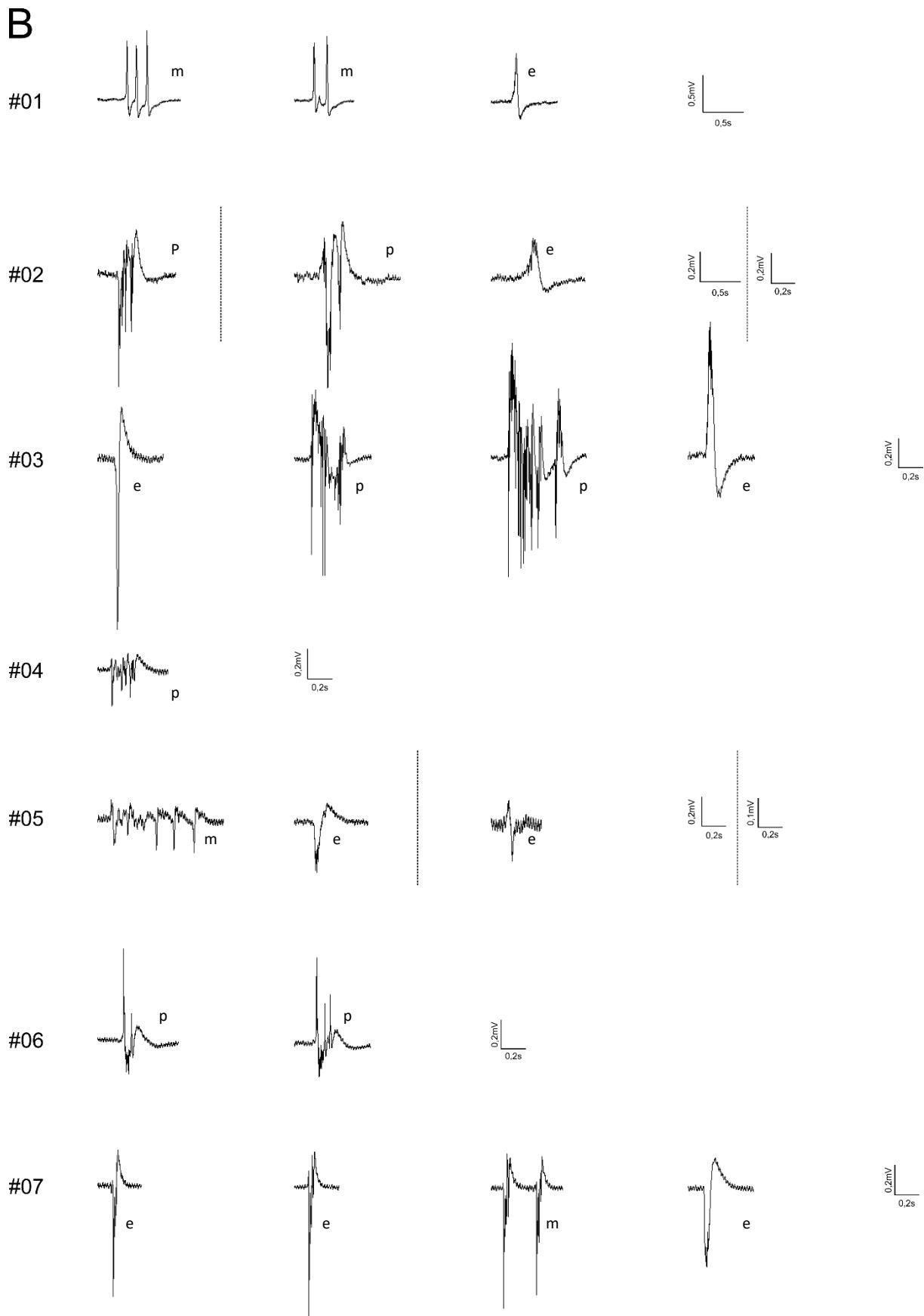


Abbildung 3-7: (B) Darstellung verschiedener Potenziale, 1. Versuchsreihe, NaCl-Gruppe
e=einzeln, m=monomorph, p=polymorph, i=iktal

3.5.1.4 Morphologie der Potenziale aus der 2. Versuchsreihe (0Mg + Gabazin)

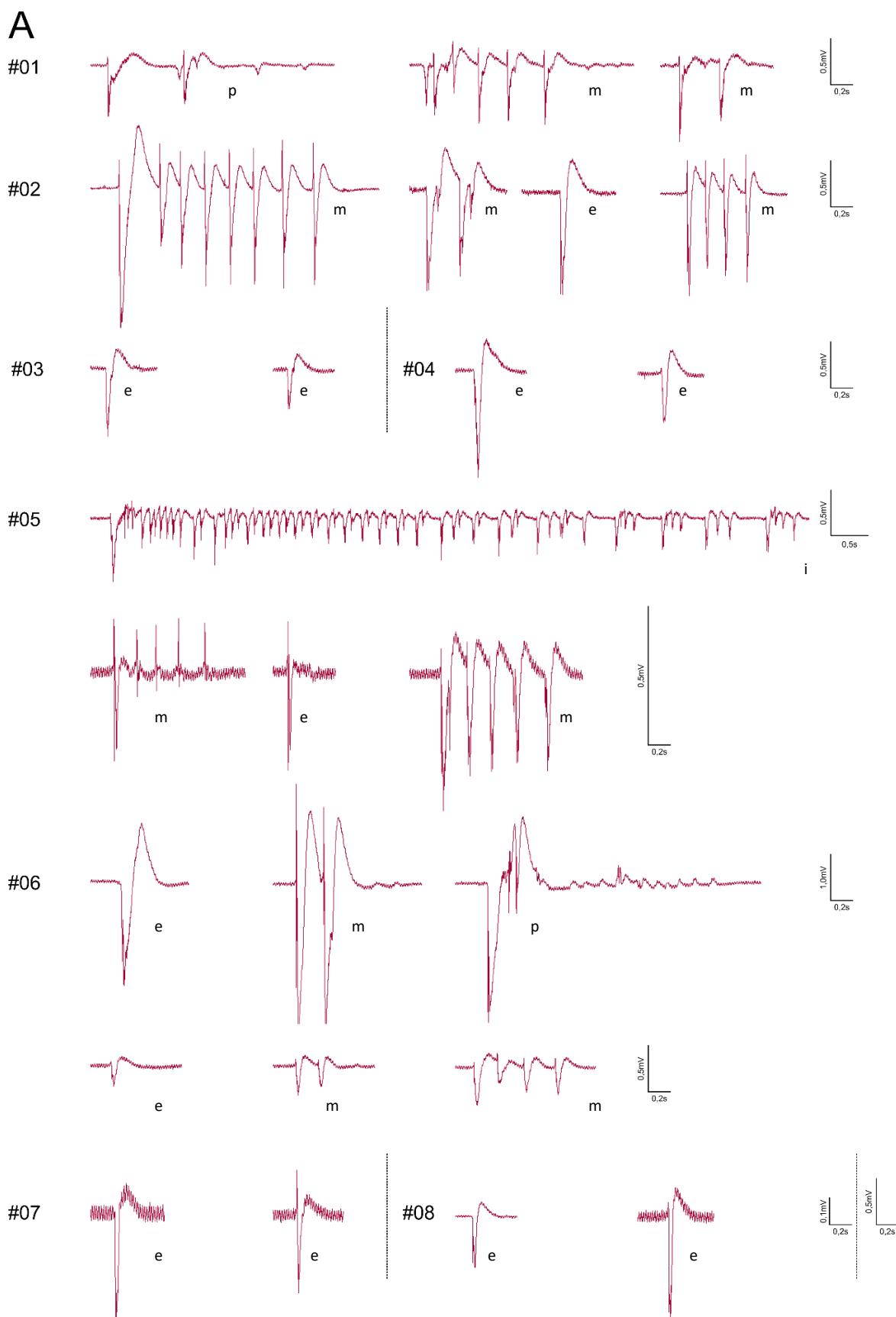


Abbildung 3-8: (A) Darstellung verschiedener Potenziale, 2. Versuchsreihe, GAD-Gruppe
e=einzeln, m=monomorph, p=polymorph, i=iktal

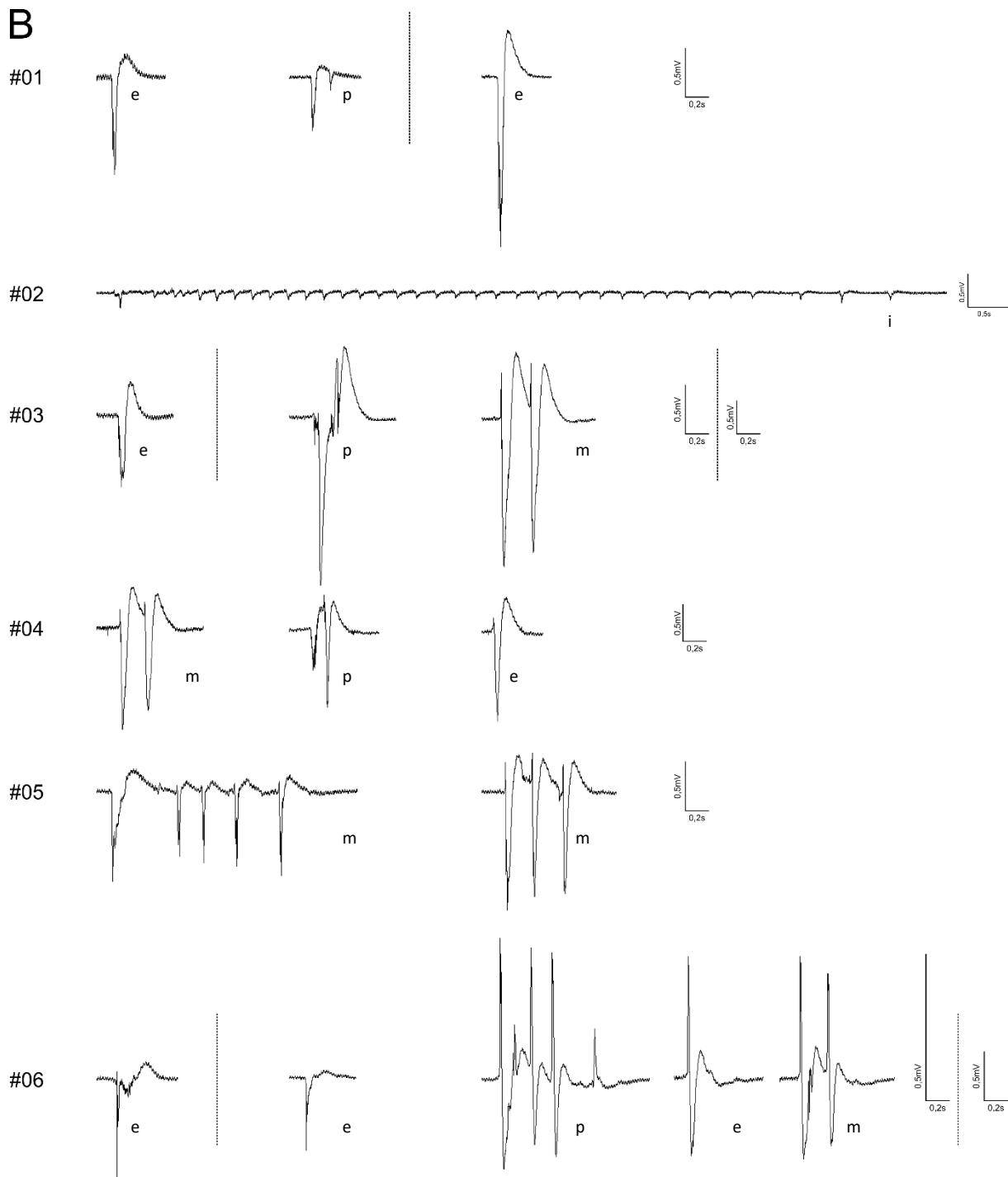


Abbildung 3-9: (B) Darstellung verschiedener Potenziale, 2. Versuchsreihe, NaCl-Gruppe
e=einzel, m=monomorph, p=polymorph, i=iktal

3.5.1.5 Morphologie der Potenziale aus der 3. Versuchsreihe (Gabazin)

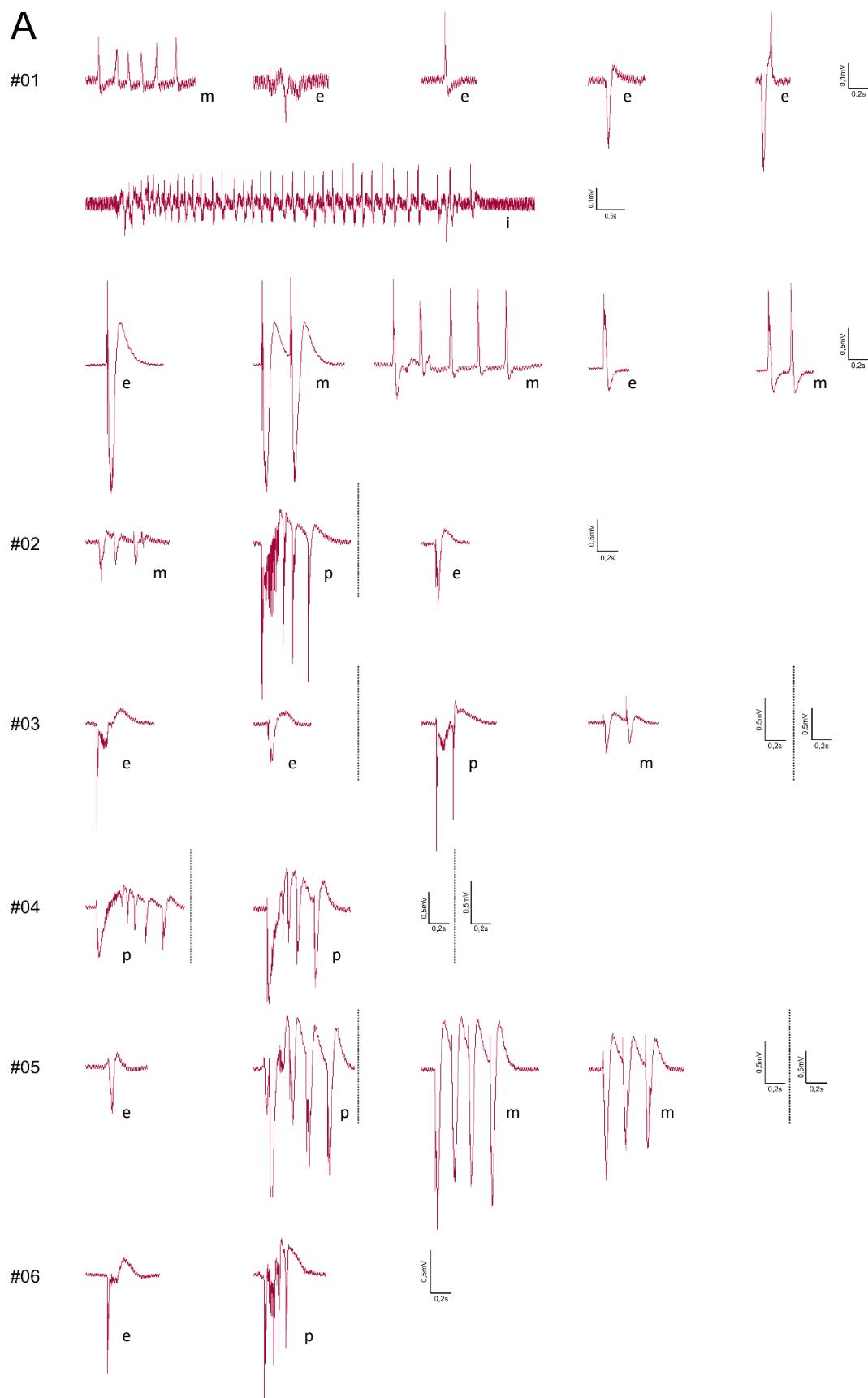


Abbildung 3-10: (A) Darstellung verschiedener Potenziale, 3. Versuchsreihe, GAD-Gruppe
e=einzeln, m=monomorph, p=polymorph, i=iktal

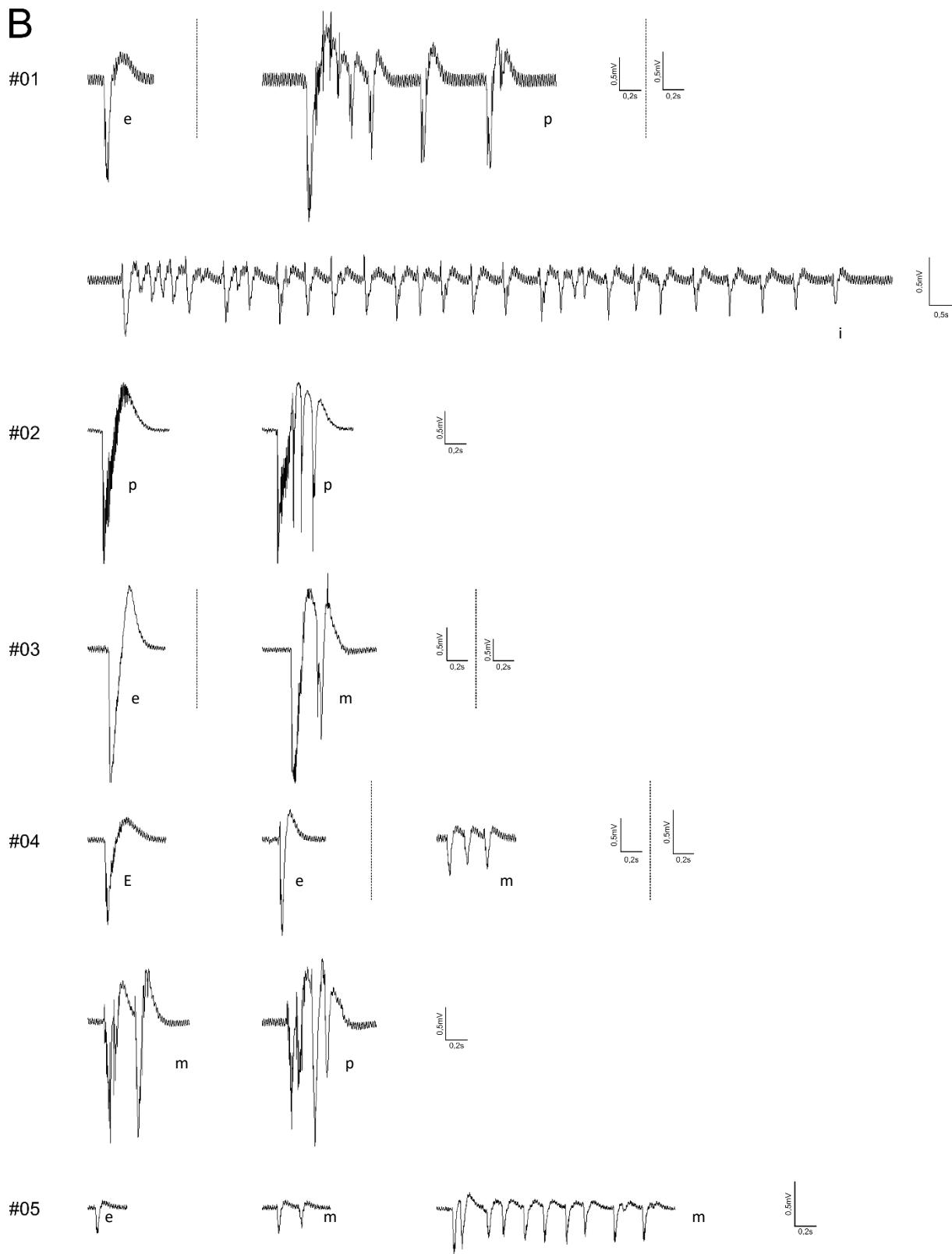


Abbildung 3-11: (B) Darstellung verschiedener Potenziale, 3. Versuchsreihe, NaCl-Gruppe
e=einzeln, m=monomorph, p=polymorph, i=iktal

3.5.1.6 Potenzialanalyse aus der 1. Versuchsreihe (0Mg)

Tabelle 13: Morphologische Einordnung der Potenziale, 0 Mg

Gruppe	einzeln monomorph	Serie/komplex monomorph polymorph		Serie/iktal
		monomorph	polymorph	
GAD (8)	n = 7	n = 0	n = 1	n = 0
Kontrolle (8) (Anzahl der Schnitte ges. in Klammern angegeben)	n = 6	n = 4	n = 4	n = 0

GAD-Gruppe (Abbildung 3-6)

In den Messungen Nr. 2, 3 und 5 finden sich Potenziale von 2 Hirnschnitten, während die verbliebenen Messungen (1 und 4) nur Potenziale von einem Hirnschnitt zeigen. Einzelne Potenziale entstehen bei insgesamt n=7 (87,5%, Nr. 1-5) Hirnschnitten. Hingegen waren komplex-polymorphe Potenziale nur bei einem Schnitt (12,5%, Messung Nr. 3) zu finden, während iktale Potenzialmuster bei keinem Schnitt auftraten.

Kontroll-Gruppe (Abbildung 3-7)

In der 7. Messung wurden Potenziale von zwei Schnitten dargestellt, während die Potenziale aus Nr. 1-6 nur von einem Schnitt stammten. Bei n=6 Schnitten (75%, Nr. 1, 2, 3, 5 und 7) waren einzelne Potenziale zu finden. Komplex- monomorphe Potenziale fanden sich bei n=4 Schnitten (50%, Nr. 1, 5 und 7), während n=4 Schnitte (50%, Nr. 2, 3, 4 und 6) komplex-polymorphe Potenziale zeigten. Indessen zeigten die Kontrollen ebenfalls keine iktale Spontanaktivität.

Bewertung

In der GAD-Gruppe entstehen überwiegend Potenziale deutlich zugunsten einzeln auftretender Potenziale, während sich dieser Unterschied in den Kontrollen aufhebt und sich ein Gleichgewicht zwischen einzelnen und komplexen Potenzialen ausbildet. Indessen treten weder in der GAD-, noch in der Kontroll-Gruppe iktale Potenzialformen auf.

3.5.1.7 Potenzialanalyse aus der 2. Versuchsreihe (0Mg + Gabazin)

Tabelle 14: Morphologische Einordnung der Potenziale, 0 Mg + Gabazin

Gruppe	einzel monomorph	Serie/komplex monomorph	polymorph	Serie/iktal
GAD (14)	n = 12	n = 6	n = 3	n = 1
Kontrolle (11)	n = 8 (Anzahl der Schnitte ges. in Klammern angegeben)	n = 7	n = 7	n = 1

GAD-Gruppe (Abbildung 3-8)

Bei den Messungen Nr. 2-7 wurden Potenziale von 2 Hirnschnitten ausgewählt, während bei Nr. 1 und Nr. 8 nur 1 Hirnschnitt zugrunde liegt. Einzelne Potenziale entstanden bei n=12 Schnitten (85,71%, Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8). Komplex-monomorphe Potenziale zeigten sich bei n=6 Hirnschnitten (42,86%, Nr. 1, 2, 5 und 6), komplex-polymorphe Potenziale waren bei n=3 Hirnschnitten (25%, Nr. 1 und 6) zu finden. Darüber hinaus zeigte n= 1 Hirnschnitt (7,14%, Nr. 5) ein iktales Potenzial.

Kontroll-Gruppe (Abbildung 3-9)

Den Messungen Nr. 1 und 3-6 liegen 2 Hirnschnitte zugrunde, in der 2. Messungen wurden die Potenziale nur von einem Hirnschnitt ausgewählt. Mit n=8 Hirnschnitten (72,72%, Nr. 1, 3, 4 und 6) konnten einzelne Potenziale ausfindig gemacht werden. Komplex-monomorphe Potenziale zeigten n=7 Schnitte (58,33%, Nr. 3, 4, 5 und 6), während komplex-polymorphe Potenziale bei n=7 (58,33%, Nr. 1, 3, 4 und 6) auftraten. Auch hier zeigte n=1 Hirnschnitt (5,03%, Nr. 2) ein iktales Potenzial.

Bewertung

Durch die Zugabe von Gabazin in die magnesiumfreie ACSF-Lösung entstehen deutlich mehr komplexe Potenziale in GAD-behandelten Hirnschnitten, wobei das Verhältnis noch zugunsten der einzeln auftretenden Potenziale liegt. Erneut besteht in den Kontrollen kein Unterschied. In beiden Gruppen entstehen durch die Gabazin-Zugabe iktales Potenzialformen.

3.5.1.8 Potenzialanalyse aus der 3. Versuchsreihe (Gabazin)

Tabelle 15: Morphologische Einordnung der Potenziale, Gabazin

Gruppe	einzeln monomorph	Serie/komplex monomorph	polymorph	Serie/iktal
GAD (9)	n = 7	n = 6	n = 8	n = 1
Kontrolle (8)	n = 6 (Anzahl der Schnitte ges. in Klammern angegeben)	n = 5	n = 5	n = 1

GAD-Gruppe (Abbildung 3-10)

Zwei Hirnschnitte werden bei den Messungen 2, 4 und 5 zugrunde gelegt, während die Messungen 1, 3 und 6 nur mit einem Hirnschnitt dargestellt werden. Einzeln auftretende Potenziale finden sich bei n=7 Schnitten (77,78%, Nr. 1,2,3,5 und 6), komplex-monomorphe entstehen in n=6 Fällen (66,67%, Nr. 1,2,3 und 5), während bei n=8 Schnitten (88,89%, Nr. 2,3,4,5 und 6) komplex-polymorphe Potenziale auftreten. Ein einziger Schnitt (11,11%, Nr. 1) beinhaltet auch iktale Potenzialformen.

Kontroll-Gruppe (Abbildung 3-11)

Die dargestellten Potenziale basieren bei den Nummern 1 und 3 auf einem Hirnschnitt, die restlichen Messungen (2, 4 und 5) werden aus zwei Hirnschnitten dargestellt. Kontrollen zeigen in n=6 der Fälle (75%, Nr. 1, 3-5) einfache Potenziale, hingegen entstehen komplex-monomorphe Potenziale (Nr. 3-5) und komplex-polymorphe (Nr. 1,2 und 4) jeweils in n=5 Fällen (62,5%). Der Hirnschnitt aus Nr. 1 zeigt ferner n=1 iktale Potenzialformen (12,5%).

Bewertung

In dieser Versuchsreihe hebt Gabazin den Unterschied in der GAD-Gruppe nun wesentlich deutlicher auf und wie zuvor besteht in der Kontrolle ein Gleichgewicht zwischen den Potenzialformen. Auch hier führt die Gabazin-Zugabe zu iktalen Potenzialformen.

3.5.1.9 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Gabazin den Unterschied zwischen den Potenzialformen der GAD-Gruppe aufzuheben scheint und ein Gleichgewicht eingestellt wird. Indessen besteht in den Kontroll-Gruppen unabhängig von Gabazin ein Gleichgewicht. Schließlich fördert Gabazin die Entstehung iktaler Potenziale.

3.5.2 Mittlere Dauer der Feldpotenziale

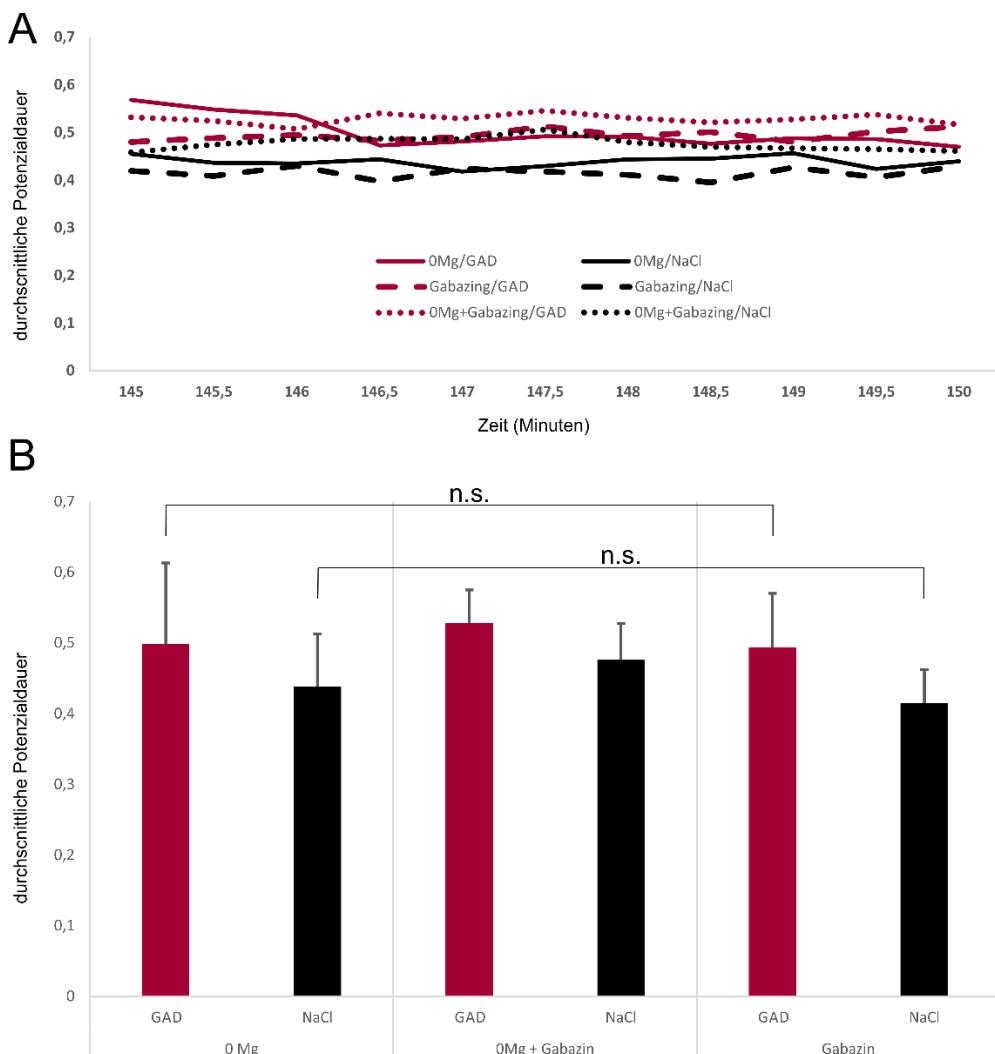


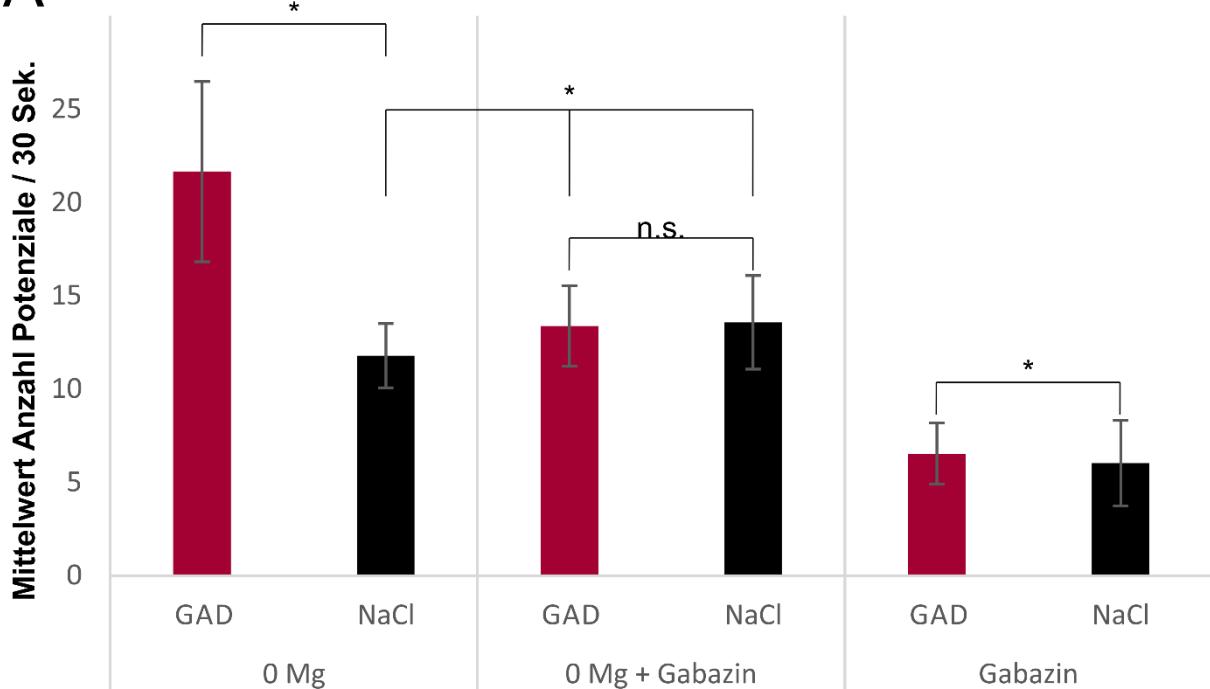
Abbildung 3-12: Mittlere Dauer von Feldpotenzialen (in Sekunden)

(A) Durchschnittliche Dauer der Potenziale im Verlauf über die letzten 5 Minuten der durchgeföhrten Messungen.
(B) Mittelung der durchschnittlichen Potenzialdauer der letzten 5 Minuten, n.s. = nicht signifikant

Unabhängig von der verwendeten ACSF-Stammlösung zeigten die mit GAD-Ak behandelten Hirnschnitte im Vergleich zu der korrespondierenden Kontroll-Gruppe eine signifikant (*Shapiro-Wilk-Test, P<0,001*) längere Potenzialdauer (A und B in Abbildung 3-12). In einer Mg²⁺-freien bzw. einer Gabazin-haltigen (Mg²⁺-haltigen) ACSF-Stammlösung besteht innerhalb der GAD- bzw. Kontroll-Gruppen kein signifikanter Unterschied (*Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, P=0,555*) der Potenzialdauer (n.s. in B, Abbildung 3-12). Die längste durchschnittliche Potenzialdauer zeigen die Hirnschnitte in einer gabazinhaltigen Mg²⁺-freien ACSF-Lösung, sowohl in der GAD-Gruppe ($0,53s \pm 0,04s$) als auch in der Kontroll-Gruppe ($0,48s \pm 0,05s$). Interessanterweise liegt hier das Niveau der Kontroll-Gruppe in der Höhe der GAD-Gruppen der anderen beiden Versuchsreihen ($0,49s \pm 0,11s$ und $0,49s \pm 0,07s$).

3.5.3 Mittlere Anzahl der Potenziale

A



B

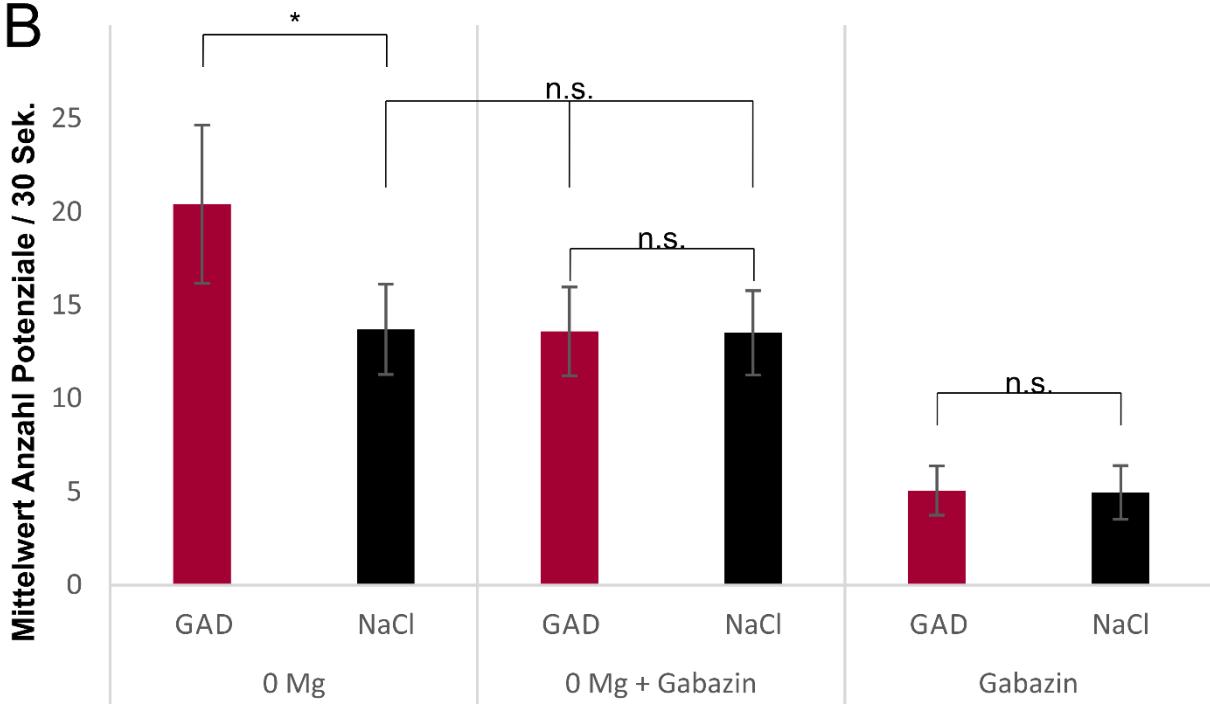


Abbildung 3-13: Mittelung der Summe der Feldpotenziale über ein Zeitintervall von 10 Minuten

Dargestellt wird der Mittelwert aus der Summe der Feldpotenziale über ein Zeitintervall von 10 Minuten. Sternchen (*): statistisch signifikanter Unterschied; n.s.: Keine statistische Signifikanz. (A) Zeitintervall: Minute 141-150. (B): Zeitintervall: Minute 111-120.

3.5.3.1 Zeitintervall $t_{\text{Minute 141-150}}$

Zunächst wurden die letzten 10 Minuten (Minute 141-150) betrachtet (A in [Abbildung 3-13](#)). Unterschiede zwischen den GAD- und Kontroll-Gruppen in gabazinhaltigen ACSF-Stammlösungen (mit oder ohne Magnesium) bestehen nicht. Ferner wird die Erregungsdämpfung durch Gabazin deutlich. Die Messdaten wurden darüber hinaus mit statistischen Testverfahren überprüft. So besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der GAD- und Kontroll-Gruppe der 1. Versuchsreihe ($P<0,001$, *Shapiro-Wilk-Test*). Betrachtet man die 2. Versuchsreihe, so besteht hier kein signifikanter Unterschied ($P=0,085$, *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test*), was mit den grafischen Abbildungen dieser Arbeit übereinstimmt. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der GAD- und Kontroll-Gruppe in der 3. Versuchsreihe gibt ($P<0,001$, *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test*). Ebenfalls liegen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich beider Gruppen aus der zweiten Versuchsreihe mit der Kontroll-Gruppe der ersten Versuchsreihe vor.

3.5.3.2 Zeitintervall $t_{\text{Minute 111-120}}$

Tabelle 16: Anwendung statistischer Tests auf das Zeitintervall 111. bis 120. Minute

Zu vergleichende Mittelwerte	P-Wert	Interpretation
GAD-Gruppe und Kontroll-Gruppe (Versuchsreihe I)	$P<0,001$	signifikant
GAD-Gruppe und Kontroll-Gruppe (Versuchsreihe II)	$P=0,524$	nicht signifikant
GAD-Gruppe und Kontroll-Gruppe (Versuchsreihe III)	$P=0,109$	nicht signifikant
Kontroll-Gruppe und GAD-Gruppe (Niveauunterschiede Kontrolle Reihe I vs. GAD-Gruppe Reihe II)	$P=0,829$	nicht signifikant
Kontroll-Gruppe und Kontroll-Gruppe (Niveauunterschiede Kontrolle Reihe I vs. Kontroll-Gruppe Reihe II)	$P=0,570$	nicht signifikant

Zur Überprüfung, ob die statistische Auswertung auch in anderen Zeitintervallen signifikante Unterschiede aufzeigt, wurden die Mittelwerte im Zeitintervall der 111. Minute bis zur 120. Minute überprüft ([Tabelle 16](#) und B in [Abbildung 3-13](#)). Es zeigte sich hier eine Plateauphase ([Abbildung 3-17](#)). Alle Testergebnisse zeigten nun keine signifikanten Unterschiede, ausgenommen natürlich der Vergleich beider Gruppen innerhalb der 1. Versuchsreihe.

3.6 ERGEBNISSE AUS DER 1. VERSUCHSREIHE – ACSF-LÖSUNG: 0 Mg^{2+}

3.6.1 Grafische Aufarbeitung

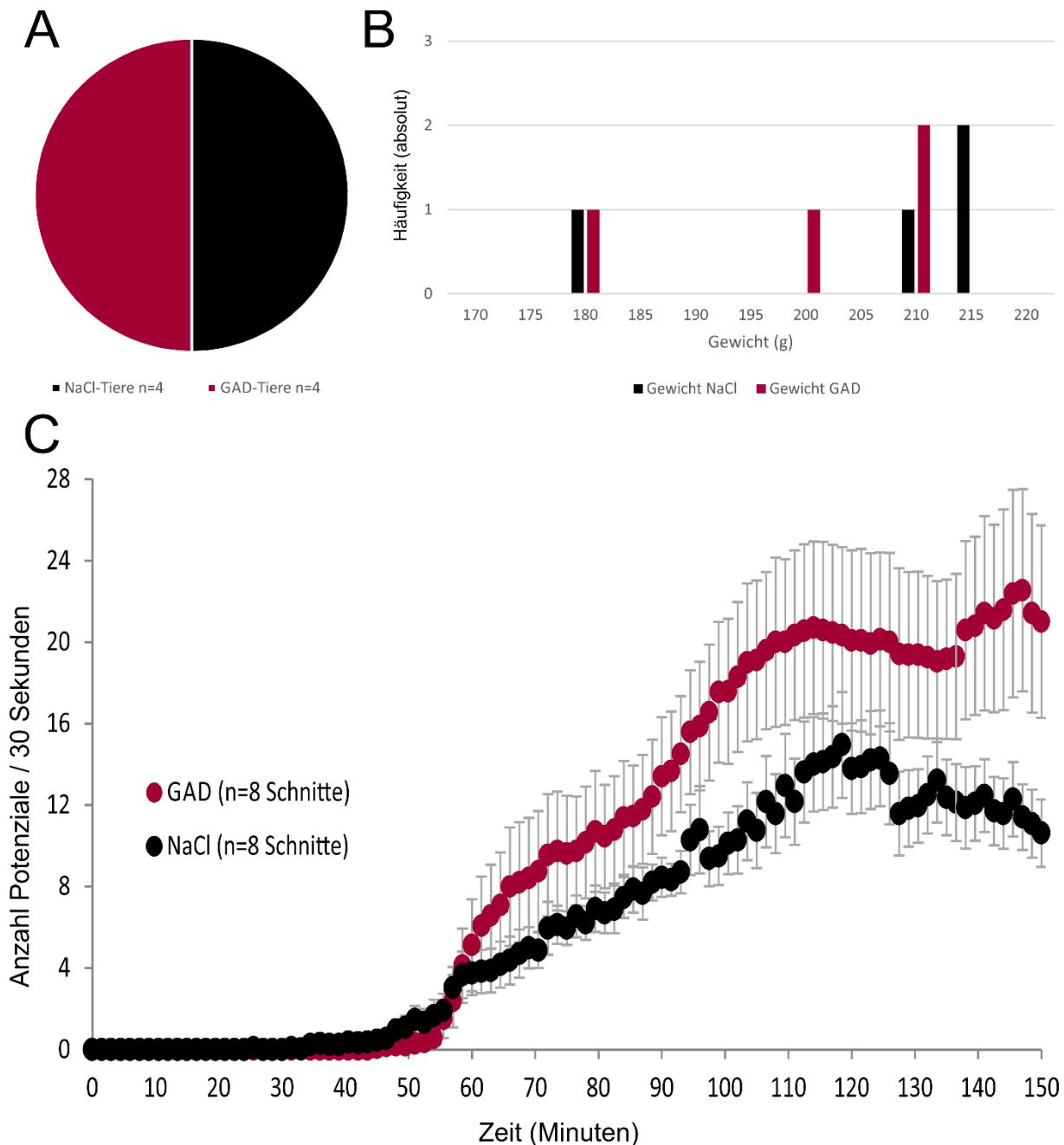


Abbildung 3-14: Messergebnisse aus der 1. Versuchsreihe (0 Magnesium)

A+B: Angaben zur Gruppen- und Gewichtsverteilung zu den Tieren der 1. Versuchsreihe. Dargestellt ist die Anzahl der in die Auswertung aufgenommenen Tiere in der GAD- und Kontroll-Gruppe (A) sowie die Häufigkeitsverteilung des Gewichtes zum Zeitpunkt der intrazerebralen Injektion der GAD-Ak bzw. der physiologischen Kochsalzlösung NaCl 0,9% (B). C: Dargestellt ist die Anzahl der ausgezählten Potenziale in einem Zeitintervall von jeweils 30 Sekunden über eine Messdauer von 150 Minuten. In der GAD-Gruppe gingen 8 Schnitte in die Auswertung ein, in der Kontroll-Gruppe ebenfalls 8 Schnitte.

3.6.2 Ergebnisdarstellung

Ziel dieser Versuchsreihe war die Wirkung von *in vivo* injizierten GAD-Antikörpern auf spontane Aktivität im Hippocampus zu untersuchen. Hierzu wurden epileptiforme Entladungsmuster in hippocampalen Hirnschnitten durch den Entzug von Magnesium evoziert. Als Kontrolle diente die *in vivo* Injektion von physiologischer Kochsalzlösung (Kontroll-Gruppe). In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt 22 Tiere operiert, wobei die ersten 7 Tiere an einem anderen Setting gemessen und daher von vornherein nicht berücksichtigt wurden. Von den 15 verbliebenen Tieren fanden sich nach Anwendung der Auswahlkriterien nur bei 8 Tieren (66,67%) verwertbare Hirnschnitte, wobei diese Tiere zu gleichen Teilen der GAD- und Kontrollgruppe zuzuordnen waren (A in [Abbildung 3-14](#)). Insgesamt wurden die Feldpotenziale von 19 Hirnschnitte in jeder Gruppe ausgezählt, von denen jedoch nur letztlich 8 Hirnschnitte (42,11%) je Gruppe den Auswahlkriterien entsprachen (C in [Abbildung 3-14](#)) und in die Auswertung eingingen. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Gewicht in der GAD-Gruppe $200g \pm 7,07g$, in der Kontroll-Gruppe waren es $205g \pm 8,42g$, ein signifikanter Unterschied bestand nicht ($P=0,343$; *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test*). In den ersten 20 Minuten der Messaufzeichnung wurde eine Mg^{2+} -haltige ACSF-Stammlösung ohne Zusätze in die Messkammer eingeleitet. In dieser Zeit entstand keine spontane Aktivität. Im Anschluss wurde durch eine Mg^{2+} -freie ACSF-Stammlösung (ohne Zusatz) das Magnesium ausgewaschen. Mit unterschiedlicher Latenz entwickelten nun sowohl die GAD- als auch die Kontroll-Gruppe spontane Aktivität. Die Aktivität der GAD-Gruppe fiel deutlich höher aus als die Aktivität der Kontroll-Gruppe (C in [Abbildung 3-14](#)), der Unterschied ist signifikant ($P<0,001$). Anti-GAD behandelte Schnitte hatten in den letzten 10 Minuten eine durchschnittliche Frequenz von $21,67 \pm 4,83$ Potenziale je 30 Sekunden, während die Kontrollen eine Frequenz von $11,79 \pm 1,72$ (je 30 Sekunden) entwickelten [Im Intervall Minute₁₁₁₋₁₂₀ liegt die Frequenz der Kontrollen bei $13,71 \pm 2,42$].

Es zeigte sich also, dass GAD-Ak die Ausbildung von spontaner epileptischer Aktivität begünstigen können, womit im Vergleich zur physiologischen Kochsalzlösung ein signifikant stärkeres epileptiformes Potenzial resultiert. Möglicherweise ist dies das Resultat aus einer gestörten GABAergen Transmission, einem Transmitter, der eine inhibierende Funktion im ZNS hat.

3.7 ERGEBNISSE AUS DER 2. VERSUCHSREIHE – ACSF-LÖSUNG: 0 Mg²⁺ PLUS GABAZIN

3.7.1 Grafische Aufarbeitung

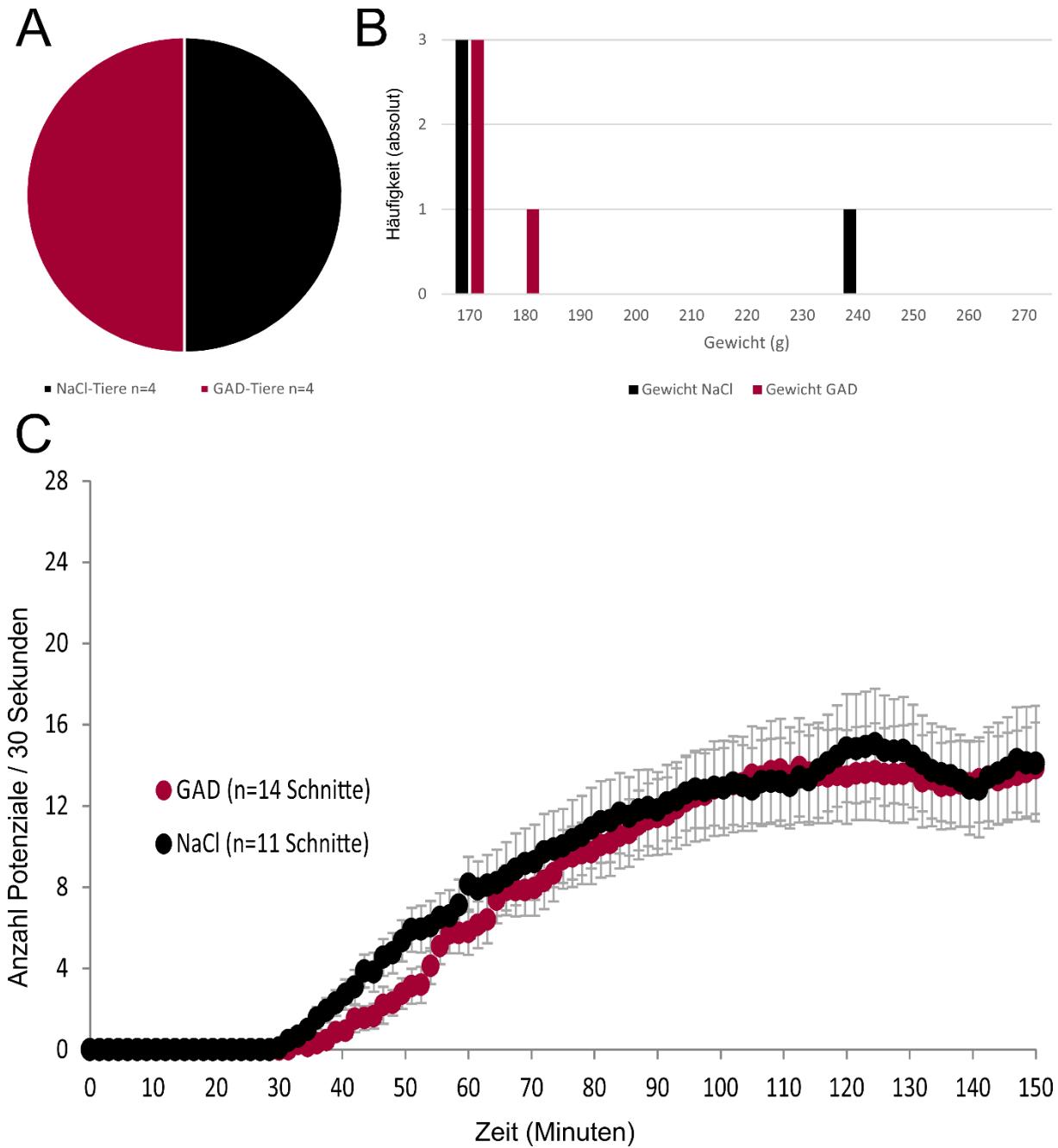


Abbildung 3-15: Messergebnisse aus der 2. Versuchsreihe (0Mg + Gabazin)

A+B: Angaben zur Gruppen- und Gewichtsverteilung zu den Tieren der 2. Versuchsreihe. Dargestellt ist die Anzahl der in die Auswertung aufgenommenen Tiere in der GAD- und Kontroll-Gruppe (A) sowie die Häufigkeitsverteilung des Gewichtes zum Zeitpunkt der intrazerebralen Injektion der GAD-Ak bzw. der physiologischen Kochsalzlösung NaCl 0,9% (B). C: Dargestellt ist die Anzahl der ausgezählten Potenziale in einem Zeitintervall von jeweils 30 Sekunden über eine Messdauer von 150 Minuten. In der GAD-Gruppe gingen 14 Schnitte in die Auswertung ein, in der Kontroll-Gruppe 11 Schnitte.

3.7.2 Ergebnisdarstellung

Im Magnesium-Mangel-Modell begünstigen die GAD-Antikörper demnach die Entwicklung spontaner epileptischer Aktivität. Um zu überprüfen, ob die GAD-Antikörper eine gestörte GABA-Transmission zur Folge haben, wurde der Versuchsaufbau in einem gemischten Epilepsie-Modell wiederholt: In einer Mg-freien Lösung sollte die GABA-A-Rezeptor-Blockade durch **Gabazin** den zuvor beschriebenen Effekt in Kontrollschnitten imitieren. Die Frequenz der Spontanaktivität dieser Hirnschnitte erhöht sich dann auf das Niveau anti-GAD behandelter Hirnschnitte im Magnesium-Mangel-Modell. 8 von 12 Versuchstiere (66,67%) wurden in die Auswertung aufgenommen, wobei 4 Tiere aus jeder Gruppe stammten. Aus den GAD-Messungen konnten 14 von 16 Schnitten (87,5%) ausgewertet werden, aus den Kontrollen gingen 11 von 16 Schnitte (68,75%) in die Auswertung mit ein (A+C in [Abbildung 3-15](#)). Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Gewicht in der GAD-Gruppe $156,25g \pm 7,47g$, in der Kontroll-Gruppe waren es $180g \pm 40g$, ein signifikanter Unterschied bestand nicht ($P=0,343$; *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test*). In Anlehnung an die vorherige Versuchsreihe wurde erneut in den ersten 20 Minuten eine Mg^{2+} -haltige ACSF-Stammlösung verwendet. Anschließend wurde eine Mg^{2+} -freie Lösung mit Gabazin-Zusatz in die Messkammer geleitet. Auch hier entwickelten dann beide Gruppen spontane Feldpotenziale.

Entgegen den Erwartungen führte die Applikation von Gabazin in eine Mg^{2+} -freie Lösung nicht zu einer Erhöhung der Frequenz in den Kontrollen. Während sich die Frequenz der Kontrollen in den letzten 10 Minuten nicht wesentlich änderte ($13,57 \pm 2,51$ je 30 Sekunden), konnte sogar eine Erregungsdämpfung GAD-behandelter Tiere nachgewiesen werden ($13,38 \pm 2,16$ je 30 Sekunden). Interessanterweise hob sich damit der Unterschied zwischen Kontrollen und GAD-behandelten Schnitten auf: Beide Gruppen entsprachen dem Aktivitätsniveau der Kontrollen aus der vorherigen Versuchsreihe ([Abbildung 3-17](#) und C in [Abbildung 3-15](#)). Gabazin konnte den Effekt der GAD-Ak nicht imitieren. Diese Ergebnisse sprechen damit gegen eine Störung der GABAergen Transmission durch die GAD-Ak. Um diese Erkenntnisse zu überprüfen, wurde in der dritten Versuchsreihe die Wirkung der GAD-Ak auf spontane elektrische Aktivität im Hippocampus untersucht, die ausschließlich durch die gabazinbedingte Hemmung der GABAergen Transmission beruht.

3.8 ERGEBNISSE AUS DER 3. VERSUCHSREIHE – ACSF-LÖSUNG: Mg^{2+} PULS GABAZIN

3.8.1 Grafische Aufarbeitung

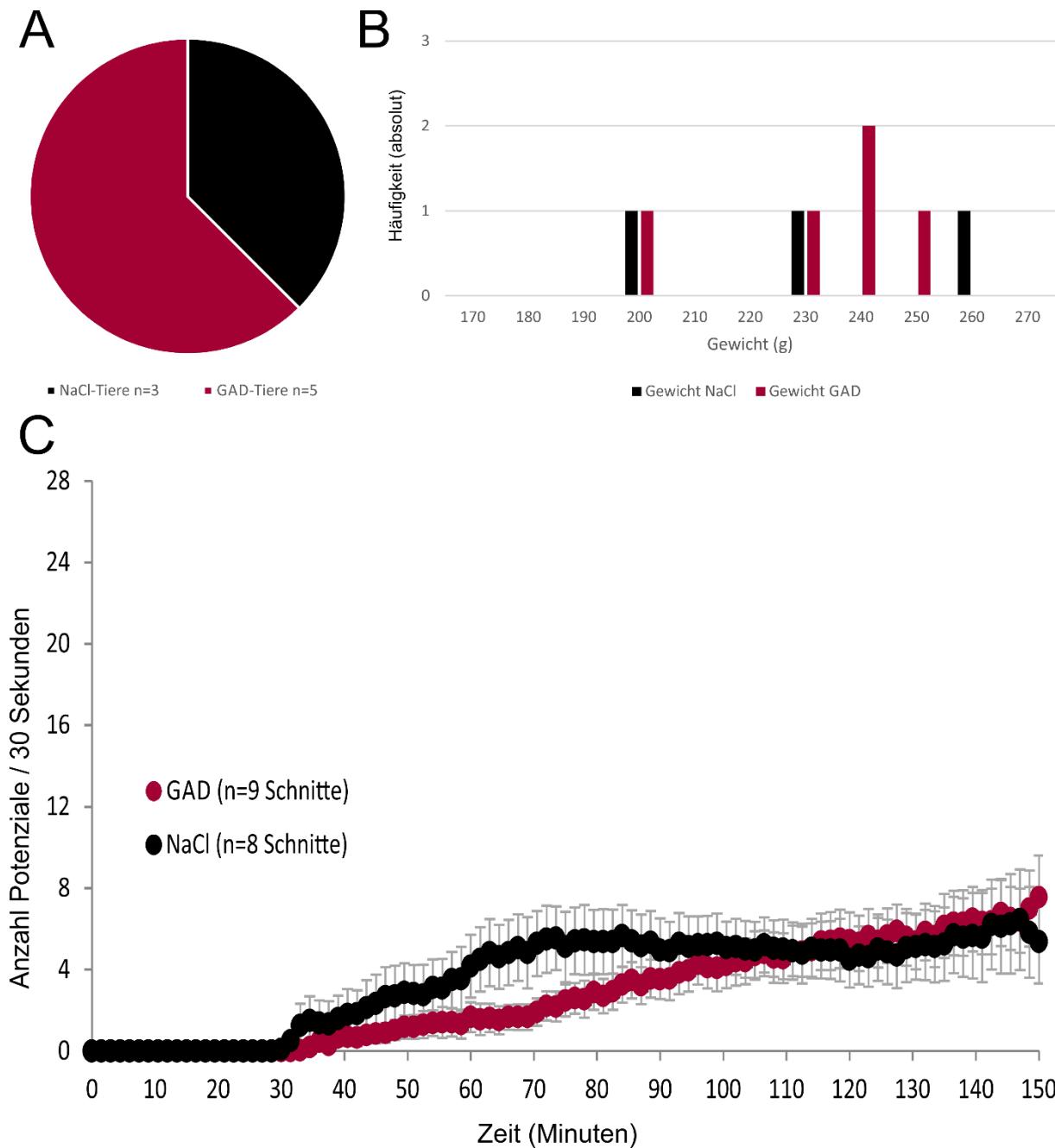


Abbildung 3-16: Messergebnisse aus der 3. Versuchsreihe (Gabazin)

A+B: Angaben zur Gruppen- und Gewichtsverteilung zu den Tieren der 3. Versuchsreihe. Dargestellt ist die Anzahl der in die Auswertung aufgenommenen Tiere in der GAD- und Kontroll-Gruppe (A) sowie die Häufigkeitsverteilung des Gewichtes zum Zeitpunkt der intrazerebralen Injektion der GAD-Ak bzw. der physiologischen Kochsalzlösung NaCl 0,9% (B). C: Dargestellt ist die Anzahl der ausgezählten Potenziale in einem Zeitintervall von jeweils 30 Sekunden über eine Messdauer von 150 Minuten. In der GAD-Gruppe gingen 9 Schnitte in die Auswertung ein, in der Kontroll-Gruppe 8 Schnitte.

3.8.2 Ergebnisdarstellung

Für diese Versuchsreihe wurden 8 Tiere operiert, wobei 5 Tieren GAD-Ak injiziert wurden, die anderen 3 Tiere erhielten zu Kontrolle NaCl 0,9% (A in [Abbildung 3-16](#)). Aus der GAD-Gruppe konnten 9 von 22 Schnitten (40,91%) ausgewertet werden. In der Kontrollgruppe waren es 8 von 14 Hirnschnitte (57,14%). Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Gewicht in der GAD-Gruppe $232g \pm 8,6g$, in der Kontroll-Gruppe waren es $230g \pm 17,32g$, ein signifikanter Unterschied bestand nicht ($P=0,911$; *Shapiro-Wilk-Test*). Erneut wurde in den ersten 20 Minuten eine Mg^{2+} -haltige ACSF-Stammlösung ohne Zusatz in die Messkammer eingeleitet. In dieser Phase zeigte ebenfalls kein Schnitt spontane Aktivität. In der folgenden Messphase wurde nun einer Mg^{2+} -haltigen ACSF-Stammlösung Gabazin (5 μM) zugesetzt. Erwartungsgemäß entwickelten alle Schnitte spontane Feldpotenziale. Wie zuvor bestand kein Unterschied zwischen der GAD- und Kontrollgruppe, das Aktivitätsniveau wurde sogar noch deutlicher gedämpft (C in [Abbildung 3-16](#)), in GAD-Ak behandelten Hirnschnitten $6,55 \pm 1,64$, in den Kontrollen $6,03 \pm 2,28$ (je 30 Sekunden, gemittelt über die letzten 10 Minuten).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass GAD-Ak die Ausbildung spontaner Aktivität in hippocampalen Hirnschnitten begünstigen, eine Störung der GABA-Synthese jedoch sehr wahrscheinlich nicht zugrunde liegt. Gabazin dämpft sogar die Erregung.

3.9 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

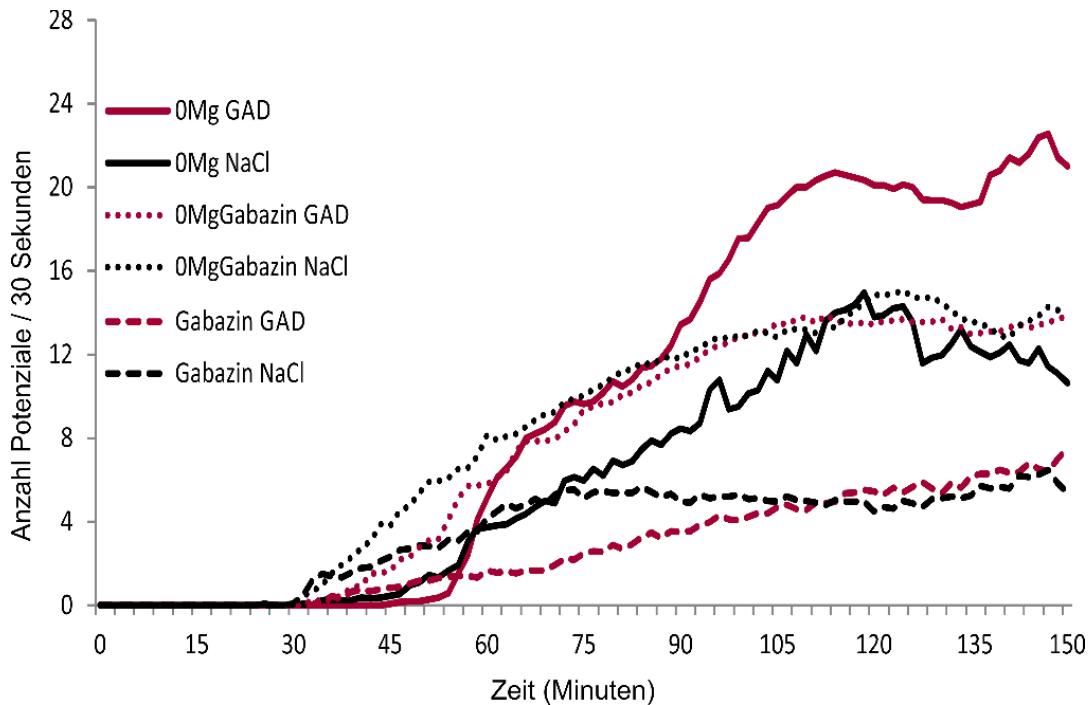


Abbildung 3-17: Grafische Gegenüberstellung aller 6 Gruppen über den gesamten Messzeitraum aus den durchgeführten Versuchsreihen. Erläuterungen siehe Text.

Mit den nun qualitativ und quantitativ ausgewerteten Daten lassen sich daher folgender Aussagen gerechtfertigter Weise ableiten (Abbildung 3-17):

- A. GAD-Ak begünstigen die Ausbildung epileptischer Aktivität im Hippocampus
 - a. Durch den Zusatz von Gabazin in die ACSF-Stammlösung (mit oder ohne Mg^{2+}) hebt sich der Unterschied zwischen GAD- und Kontroll-Gruppe signifikant auf.
 - b. Gabazin imitiert nicht den Effekt der GAD-Ak.
 - c. Zugabe von Gabazin in eine Mg^{2+} -freie ACSF-Stammlösung dämpft die Erregung anti-GAD behandelte Schnitte, während die Kontrollen keine Änderung zeigen.
 - d. Zugabe von Gabazin in Mg^{2+} -haltige Lösung dämpft die Erregung sowohl der GAD-Gruppe als auch der Kontroll-Gruppe.
- B. GAD-Ak führen signifikant zu einer im Durchschnitt längeren Potenzialdauer
- C. GAD-Ak führen im Magnesium-Mangel-Modell zu Potenzialformen zugunsten einzelner Potenziale.
 - a. Zugabe von Gabazin führt zu einem Gleichgewicht zwischen dem Auftreten einzelner und komplexer Feldpotenziale und fördert die Ausbildung iktaler Potenziale.

4 DISKUSSION

4.1 KRITISCHE BEWERTUNG DER ANGEWANDTEN METHODEN

4.1.1 Rechtfertigung der Epilepsiemodelle

4.1.1.1 Rechtfertigung des Magnesium-Mangel-Modells

Im einleitenden Kapitel dieser Dissertationsschrift wurde bereits die Entstehung von spontaner elektrischer Aktivität im Magnesiummangel-Modell beschrieben. Bei der Präparation von Hippocampusschnitten und der nachfolgenden elektrophysiologischen Messung mussten jedoch zwei grundlegende Probleme beachtet werden: Zum einen wurden die Faserverbindungen zum entorhinalen Kortex unterbrochen, zum anderen musste geklärt werden, welche Region im Hippocampus zur Ableitung extrazellulärer Potenziale geeignet war. Die Entstehung von Spontanaktivität wurde ebenfalls von *Stanton et al (1986)* in hippocampalen Hirnschnitten unter Verwendung magnesiumfreier extrazellulärer Lösungen untersucht. Kontinuierliche länger andauernde Perfusion der Hirnschnitte mit Mg^{2+} -freier extrazellulärer Lösung führte dann zu Entstehung von epileptiformer Spontanaktivität im entorhinalen Kortex und Gyrus dentatus. Die Arbeitsgruppe bewies damit die Entwicklung spontaner Aktivität im Gyrus dentatus, hierbei blieben jedoch die Faserverbindungen zum entorhinalen Kortex erhalten. Bei Durchtrennung dieser Faserverbindung mit einem Messer sistierte die spontane Aktivität im Gyrus dentatus. Der entorhinale Kortex scheint daher Ausgangspunkt der Erregung im Sinne eines Pacemakers (engl. Für Schrittmacher) zu sein (*Stanton et al, 1986*). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse zeigten dann *Mody et al (1987)* in ihren Experimenten, dass in hippocampalen Hirnschnitten durch Auswaschen von Magnesium epileptiforme spontane Entladungen in der CA3- und CA1-Region entstehen, während der Gyrus dentatus keine Reaktion zeigte. Faserverbindungen zum entorhinalen Kortex bestanden dabei nicht. Die CA3-Region schien in dieser Situation der Ausgangspunkt der Erregung zu sein. Damit lässt sich allgemeingültig die CA1-Region als im Lichtmikroskop leicht zu identifizierende Schicht für elektrophysiologische Messungen nutzen und ein Erhalt afferenter und efferenter Faserverbindungen zum entorhinalen Kortex während der Präparation hippocampaler Hirnschnitte nicht notwendig ist. Ursache für die Ausbildung der spontanen Aktivität ist ein erhöhter Ca^{2+} -Influx in die Zellen durch zunehmende NMDA-Rezeptoraktivierung, wodurch die Transmitterfreisetzung (Glutamat) verstärkt wird und weitere Rezeptoren in einem kreisförmigen Verstärkungsprozess aktiviert werden können. Ca.

15-20 Minuten nach Einleitung des Auswaschvorgangs hat die Mg-Konzentration subphysiologische Werte erreicht (abhängig von der aktuell eingestellten Durchflussrate der extrazellulären Flüssigkeit), nach weiteren 15-45 Minuten traten die ersten evozierten Potenziale auf (*Mody et al, 1987*). Dieser Versuchsaufbau diente als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendeten Messprotokolle.

4.1.1.2 Rechtfertigung des Gabazin-Modells

Behrens et al zeigten 2007 den desinhibierenden Effekt von Gabazin in magnesiumhaltiger Lösung, bestätigt durch die Daten der vorliegenden Arbeit. Das Gabazin-Modell wird damit als allgemeingültig anerkannt.

4.1.2 Stereotaktische hippocampale Injektion

Die stereotaktischen Koordinaten zur Berechnung der Position des Hippocampus können aus anatomischen Atlanten des Rattenhirns, beispielsweise von *Paxinos und Watson (1986, 2007)*, entnommen werden. Diese beziehen sich meist auf das Bregma als leicht zu identifizierende Struktur der Kalotte. Mit zunehmenden Alter des Tieres wächst das Gehirn, womit sich die relative Lage des Hippocampus, bezogen auf das Bregma, ändert. Sinnvollerweise müssen für verschiedene Gewichts- und Altersklassen der Tiere unterschiedliche Korrekturkoordinaten für die Berechnung herangezogen werden. In dieser Arbeit wurden die in der Einleitung genannten Korrekturkoordinaten verwendet, sodass sich hieraus - in Abhängigkeit vom Alter des Tieres - methodische Schwächen ergeben können, welche bei zukünftigen Fragestellungen berücksichtigt werden sollten.

4.1.3 Verwendete GAD-Ak

Die in dieser Arbeit verwendeten Liquores mit darin enthaltenden GAD-Ak wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Bien (Bonn) zur Verfügung gestellt und von PD Dr. med. Kirschstein (Rostock) zur Verwendung für diese Arbeit herausgegeben. Eine Analyse dieser Proben ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt. Die Verwendung erfolgte unter dem Vertrauen einer korrekten Entnahme, Probenbeschriftung und Titerbestimmung. Fehler, die dabei entstanden sind, können demnach nicht ausgeschlossen werden. Zudem wurden Liquorproben von zwei verschiedenen Patienten verwendet. Möglicherweise kann dies zu Unterschieden in den Messergebnissen führen.

4.1.4 Durchflussrate der extrazellulären ACSF-Stammlösung

Ein konstanter Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer war für die Durchführung der Versuche essentiell. Bei zu niedriger Durchflussrate bestand die Gefahr zu niedriger Flüssigkeitspegel in der Messkammer, wodurch die Hirnschnitte austrockneten. Durch zu hohe Flussraten wurde die Messkammer regelrecht geflutet, die eingelegten Hirnschnitte wurden von ihrem Untergrund angehoben und schwammen auf bzw. in der ACSF-Stammlösung. Aufgrund der häufigen Nutzung des Messplatzes kam es zu Verunreinigungen, Lösungsbestandteile setzen sich in der Messkammer und den Schlauchsystemen ab, eine Erhöhung des Widerstandes resultierte, weshalb im Verlauf steigende Flussraten notwendig waren, um in der Messkammer optimale Flüssigkeitspegel zu halten. Leider ist es damit nicht möglich, Aussagen über die Latenz bis zum Auftreten der ersten spontanen Potenziale zu machen. Eine Vergleichbarkeit wäre nur bei konstanten Flussraten in allen Messungen möglich. Es bestünde die Möglichkeit, vor jeder Messung die Infusionsschläuche, über die die ACSF-Lösung in die Messkammer geleitet wird, zu wechseln. Es ist allerdings fraglich, ob der zusätzliche Erkenntnisgewinn den Aufwand rechtfertigt.

4.2 ÜBERPRÜFUNG ZUGRUNDE LIEGENDER THEORETISCHER MODELLE AUF IHRE GÜLTIGKEIT

In einem vereinfachten Schema beruhen die verwendeten Epilepsiemodelle im Wesentlichen auf zwei Rezeptortypen, dem exzitatorischen NMDA-Rezeptor und dem inhibitorischen GABA-A-Rezeptor, welche in ihrer Rezeptorantwort durch Modulation der Versuchsbedingungen unterschiedlich beeinflusst werden können. Der NMDA-Rezeptor wird hierbei im Versuchsmodell maßgeblich durch die extrazelluläre Mg(2+)-Konzentration reguliert, während der GABA-Rezeptor durch Rezeptorblockade (Gabazin) oder dem GABA-Angebot (über das GAD-Enzym) reguliert wird. Auf Grundlage dieser Regulationsmöglichkeiten ergeben sich die (theoretisch) zu erwartenden Antwortmöglichkeiten der Rezeptoren, in allen Überlegungen wird davon ausgegangen, dass GAD-Ak zu einer gestörten GABA-Transmission führen, wie bisherige Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen rechtfertigen. Für jede Versuchsreihe liegt damit eine theoretische Überlegung zu Grunde, die durch experimentelle Versuche in dieser Arbeit verifiziert oder widerlegt wird.

	GAD-Gruppe		NaCl-Gruppe	
	NMDA-Rezeptor	GABA-Rezeptor	NMDA-Rezeptor	GABA-Rezeptor
A	ACSF-Stammlösung: Mg(+), Gabazin (-) (Standard ACSF-Stammlösung)			
	Situation NMDA-R-Blockade durch Mg 	Situation keine GABA-R-Blockade  Hemmung GAD-Enzym Glutamat → GABA	Situation NMDA-R-Blockade durch Mg 	Situation keine GABA-R-Blockade  keine Hemmung GAD-Enzym Glutamat → GABA
	↓ Resultat Aktivität (-)	↓ Resultat Aktivität (+/-)	↓ Resultat Aktivität (-)	↓ Resultat Aktivität (-)
B	ACSF-Stammlösung: Mg(-), Gabazin (-) (Magnesium-Mangel-Modell)			
	Situation keine NMDA-R-Blockade 	Situation keine GABA-R-Blockade  Hemmung GAD-Enzym Glutamat → GABA	Situation keine NMDA-R-Blockade 	Situation keine GABA-R-Blockade  keine Hemmung GAD-Enzym Glutamat → GABA
	↓ Resultat Aktivität (+)	↓ Resultat Aktivität (+/-)	↓ Resultat Aktivität (+)	↓ Resultat Aktivität (-)
C	ACSF-Stammlösung: Mg(-), Gabazin (+) (Kombination Magnesiummangel-Modell und Gabazinmodell)			
	Situation keine NMDA-R-Blockade 	Situation GABA-R-Blockade  Hemmung GAD-Enzym Glutamat → GABA	Situation keine NMDA-R-Blockade 	Situation GABA-R-Blockade  keine Hemmung GAD-Enzym Glutamat → GABA
	↓ Resultat Aktivität (+)	↓ Resultat Aktivität (+)	↓ Resultat Aktivität (+)	↓ Resultat Aktivität (+/-)

Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung möglicher Rezeptorantwort in theoretisch entwickelten Modellen

A: Sogenannte Baseline (ACSF: Mg^{2+} -haltig, kein Gabazin): Insgesamt resultiert eine erregungsinhibierende Wirkung. Es bilden sich keine spontanen Potenziale. B: Versuchsreihe 1 (ACSF: 0 Mg^{2+} , kein Gabazin): Aufhebung der Magnesiumblockade des NMDA-Rezeptors, wodurch die Ausbildung spontaner Aktivität möglich wird. C: Versuchsreihe 2 (ACSF: 0 Mg^{2+} , Gabazin): Zusätzlich Inhibierung des GABA-Rezeptors, Ausbildung spontaner Aktivität (theoretisch) weiter gefördert. Grün: erregungsfördernd. Rot: erregungsinhibierend.

4.2.1 Die sogenannte Baseline

Verwendet man eine extrazelluläre magnesiumhaltige ACSF-Stammlösung ohne Gabazin als Zusatz, ist der NMDA-Rezeptor physiologisch durch Magnesium blockiert, weshalb die spontane Glutamatfreisetzung nicht ausreicht, den Rezeptor zu aktivieren (A in Abbildung 4-1) und exzitatorische Rezeptorpotenziale nicht gebildet werden können. Damit überwiegen insgesamt inhibitorische Rezeptorantworten, die Entwicklung spontaner Aktivität ist nicht möglich und es können keine Feldpotenziale registriert werden. Es resultiert eine sogenannte Nulllinie oder auch Baseline, die jede ausgewertete Messung zu Beginn zeigt. Ob sich eine (theoretisch) gestörte GABA-Transmission anti-GAD behandelter Schnitte auf die GABA-A-Rezeptoraktivität auswirkt, kann dieses Modell nicht klären.

4.2.2 Epilepsiemodell der 1. Versuchsreihe

Entfernt man nun extrazelluläres Magnesium, so ändern sich die Bedingungen. In dieser Situation wird der spannungsabhängige Magnesiumblock des NMDA-Rezeptors aufgehoben, wodurch die Ausbildung spontaner Aktivität möglich wird (B in Abbildung 4-1). Die Entfernung des extrazellulären Magnesiums ist ein kontinuierlicher Prozess, durch den eine zunehmende Anzahl von NMDA-Rezeptoren aktiviert wird. Dies resultiert letztlich in einer Zunahme der Frequenz registrierter Feldpotenziale mit der Zeit, passend zu den Messdaten der vorliegenden Arbeit. Dieser Effekt ist zunächst unabhängig von der jeweiligen betrachteten Gruppe: Sowohl anti-GAD- als auch NaCl-behandelte Tiere zeigen zunehmende Spontanaktivität. Sind alle NDMA-Rezeptoren aktiv, ist keine weitere Zunahme der Erregung mehr möglich und es stellt sich theoretisch ein Plateau ein. Es zeigt sich damit, dass Magnesiummangel eine exzitatorische Wirkung hat. Anti-GAD behandelte Hirnschnitte zeigen jedoch eine deutlich höhere Spontanaktivität im Vergleich zur physiologischen Kochsalzlösung.

Möglicherweise beruht dieser Unterschied auf einer gestörten GABAergen Transmission, wie bereits andere Arbeitsgruppen (*Dinkel et al, Mitoma et al*) gezeigt haben. Nimmt man an, dass GAD-Ak zu einer Hemmung der GABA-Synthese und/oder -Freisetzung führen, resultiert eine verminderte synaptische GABA-Konzentration und damit eine verminderte Aktivierung des GABA-A-Rezeptors mit in der Folge verminderter Ausbildung inhibitorischer postsynaptischer Rezeptorpotenziale. Hierdurch wird die Entwicklung spontaner Aktivität zusätzlich gefördert. Dieser Effekt findet in den Kontroll-Gruppen nicht statt. Somit sprechen diese Daten für eine Förderung spontaner epileptiformer Aktivität durch GAD-Ak, möglicherweise bedingt durch eine Hemmung der GABAergen Transmission.

4.2.3 Epilepsiemodell der 2. Versuchsreihe

Um zu prüfen, ob der vermutete Effekt der GAD-Ak tatsächlich auf einer Störung der GABA-Transmission beruht, blockiert man den GABA-A-Rezeptor, indem Gabazin einer magnesiumfreien ACSF-Lösung zugesetzt wird. Hierdurch wird die GABAerge Transmission gestört, ähnlich der vermuteten Wirkung der GAD-Ak (*C* in Abbildung 4-1). Die GABA-A-Rezeptor-Blockade sollte dann den zuvor beschriebenen Effekt in den Kontrollen imitieren und deren durchschnittliche Frequenz auf das Niveau anti-GAD behandelter Hirnschnitte erhöhen. Mit Anti-GAD behandelte Schnitte könnten ein unverändertes Aktivitätsniveau oder gar eine noch deutlichere Steigerung der Aktivität zeigen. Auch in diesem Modell wird durch Auswaschung von Magnesium die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erleichtert. Die zusätzliche GABA-A-Rezeptorblockade soll den Effekt der GAD-Ak in beiden Gruppen imitieren. Interessanterweise zeigen die Messdaten jedoch ein unerwartetes Ergebnis: (1) Während die Kontrollen keine Änderungen zeigen, wird (2) die Erregung anti-GAD behandelter Schnitte sogar gedämpft und es besteht (3) kein Unterschied mehr zwischen der GAD- und der Kontroll-Gruppe. Die fehlende Imitierung spricht gegen eine gestörte GABAerge Transmission, weshalb andere pathophysiologische Effekte den GAD-Ak zugrunde liegen könnten. Die Aufhebung des Unterschieds ist hingegen plausibel erklärbar: Durch die GABA-A-Rezeptorblockade werden sowohl in der GAD-Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe die inhibitorischen Rezeptorpotenziale gleichermaßen am Ort der Entstehung, also am Rezeptorkanal selbst, aufgehoben. Damit werden nur noch NMDA-vermittelte exzitatorische Rezeptorantworten gebildet, die in beiden Gruppen entstehen und gleichermaßen die Entstehung spontaner Aktivität bewirken.

4.2.4 Epilepsiemodell der 3. Versuchsreihe

In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Modulation der Rezeptorantworten durch das Auswaschen von Magnesium, während in der zweiten Versuchsreihe die zwei Epilepsiemodelle vermischt wurden, die exzitatorische Wirkung magnesiumfreier Lösung und die desinhibierende Wirkung von Gabazin. Theoretische Überlegungen hatten die geschilderten Ergebnisse nicht vollständig vorhersagen können. Es war daher sinnvoll, die Ergebnisse in einer dritten Versuchsreihe zu überprüfen, in der die Rezeptorantworten nur durch Modulation der GABA-Transmission über GABA-A-Rezeptorblockade erfolgte. So wurde in eine magnesiumhaltige Lösung Gabazin zugegeben. Es zeigte sich eine noch deutlichere Erregungsdämpfung ohne Unterschied zwischen Kontrollen und der GAD-Gruppe. Diese Ergebnisse sprechen erneut gegen eine gestörte GABA-Transmission. Die Messdaten der 2. Versuchsreihe werden bestätigt. Die Aufhebung des Unterschieds wurde in Kap. 4.2.3 beschrieben. Möglicherweise beruht die noch starke Dämpfung auf dem fehlenden Input der exzitatorischen NMDA-Rezeptorantworten, da dieser, wie bei der Baseline, durch Magnesium blockiert war. Die Ausbildung spontaner Aktivität in beiden Gruppen beweist zumindest die desinhibierende Wirkung von Gabazin.

4.2.5 Potenzialdauer und Potenzialmorphologie

4.2.5.1 Analyse der Potenzialdauer

Die Berechnung der durchschnittlichen Dauer der Potenziale zeigte bei anti-GAD behandelten Tieren signifikant längere Potenziale im Vergleich zur korrespondierenden Kontroll-Gruppe. Dieser Effekt ist zunächst unabhängig von der in dieser Arbeit verwendeten ACSF-Stammlösung. Die Zugabe von Gabazin in magnesiumhaltige Lösung führt zu keiner Änderung der Dauer, während die Zugabe von Gabazin in magnesiumfreie Lösung eine Erhöhung bewirkt. Interessanterweise liegt die Durchschnittsdauer der Kontrollgruppen in Höhe anti-GAD behandelter Schnitte in magnesiumfreier Lösung, ein statistisch signifikanter Unterschied bestand ebenfalls nicht. Damit sprechen die Ergebnisse für die Hypothese einer gestörten GABAergen Transmission (Kap. 4.2), da Gabazin den Effekt der GAD-Ak in den Kontrollen imitieren konnte. Die Daten wurden durch Ausmessen der Dauer eines Potenzials ermittelt, eine kurze Darstellung erfolgte in der Einleitung. Aufgrund methodischer Schwächen sind diese Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig. Während der Beginn eines Potenzials, gekennzeichnet durch die einleitende De- oder Hyperpolarisation, gut erkennbar

war, gestaltete sich die Ermittlung des Zeitpunkts der vollständigen Repolarisation schwierig. Zur Vereinfachung wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem die Amplitude wieder das Niveau des Grundrauschens erreicht hatte und damit keine Erregung mehr vorlag ([Abbildung 2-8](#)). Aufgrund der peristaltischen Pumpe kam es jedoch zu Schwankungen im Grundrauschen. Diese äußerten sich durch Abweichungen um < 0,01mV aus der Ruhelage (ca. bei 0mV) nach oben oder unten ohne wesentliche Änderungen der Amplitude. Kurzfristige (<0,1 Sekunden bis 1 Sekunde) Amplitudenzunahmen oder -abnahmen waren ebenfalls möglich. Daher war es möglich, dass der Zeitpunkt der vollständigen Repolarisation falsch bestimmt wurde, die Potenzialdauer wich möglicherweise um +/- 0,05 Sekunden bis +/- 0,1 Sekunden vom wahren Wert ab.

4.2.5.2 Analyse der Potenzialmorphologie

Gabazin führt zu einem Gleichgewicht verschiedenartiger Potenzialmorphen zwischen der GAD- und Kontrollgruppe, analog zu bisherigen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Iktale Potenzialmuster (über viele Sekunden anhaltend) traten hingegen nur bei gabazinhaltigen ACSF-Stammlösungen auf. Dies kann möglicherweise auf fehlenden inhibitorischen Rezeptorpotenzialen beruhen, wodurch länger anhaltende Potenziale nicht vorzeitig unterbrochen werden. Bei Magnesiummangel treten weder in der GAD-Gruppe noch in der Kontroll-Gruppe iktale Potenzialmuster auf. Hier scheint die inhibitorische Rezeptoraantwort intakt. Dies spricht gegen eine Störung der GABAerogen Transmission durch GAD-Ak.

4.2.6 Zusammenfassung

In vivo injizierte GAD-Antikörper bewirken *in vitro* eine Förderung epileptischer Aktivität im Hippocampus der Ratte. Die bekannte exzitatorische Wirkung magnesiumfreier Lösung und die desinhibierende Wirkung von Gabazin werden bestätigt. Überraschend zeigte sich jedoch, das Gabazin insgesamt die Erregung zu dämpfen scheint und den Frequenzunterschied zwischen GAD- und Kontrollgruppe aufhebt. Während letzteres durch theoretische Überlegung ableitbar ist, war die Erregungsdämpfung unerwartet. Dies spricht gegen eine Störung der GABAerogen Transmission. Hiermit vereinbar sind die Daten aus der Auswertung der Potenzialmorphologie. Patch-Clamp-Messungen und intrazelluläre Messungen, welche von J. Hackert am Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock, durchgeführt wurden, zeigten tatsächlich eine intakte GABAerge Transmission in anti-GAD

behandelten Hirnschnitten (Hackert *et al*, 2016). Dem entgegengesetzt spricht die Analyse der Potenzialdauer für eine Störung der GABAergen Transmission, diese Messdaten sind aber aufgrund methodischer Schwächen nur bedingt verwertbar.

Es kann damit festgehalten werden, dass GAD-Ak die Entstehung spontaner Aktivität fördern können, eine Modulation der GABAergen Transmission jedoch unwahrscheinlich ist.

4.3 WAS IST DIE PATHOPHYSIOLOGISCHE ROLLE DER GAD-AK?

4.3.1 Internalisierung von Antikörpern und Interaktion mit dem Zielantigen

Die GAD ist ein intrazelluläres Enzym; eine Assoziation mit dem Extrazellularraum wurde bisher nicht klar beschrieben. Autoantikörper müssen daher in diesem Fall in die Zielzelle penetrieren, um direkten Einfluss auf das Zielantigen ausüben zu können. Nur dann wäre eine direkte pathophysiologische Relevanz diskutierbar. Die Fähigkeit von Immunglobulinen in eine humane Zelle zu penetrieren und mit einem intrazellulären Antigen zu interagieren wurde erstmals 1978 von Alarcón-Segovia *et al* beschrieben. Damit wurde ein Dogma widerlegt, nach dem Antikörper nur mit extrazellulär lokalisierten Antigenen interagieren können und ihr Auftreten im Serum oder Liquor eine rein diagnostische oder prognostische Relevanz hat (Ruiz-Argüelles *et al*, 2001; Alarcon-Segovia *et al*, 1996). In den folgenden Jahren beschrieben weitere Publikationen die Penetration von Antikörpern in humane Zellen, gefolgt von möglichen Interaktionen mit dem Zielantigen oder einer spezifischen Zellantwort. Der Mechanismus der Penetration blieb jedoch weitestgehend unklar (Ruiz-Argüelles *et al*, 2001 und Geis *et al*, 2010). Ferner gelang es in den zurückliegenden Jahren beispielsweise die Rolle gegen (ligandengesteuerte) Ionenkanäle oder gegen Zellmembranproteine (Dalmau *et al*, 2007) gerichtete Antikörper besser zu beschreiben. Verschiedene Krankheitsbilder wurden damit pathophysiologisch verständlicher. Auch die Relevanz der Antikörper gegen *intrazelluläre* Antigene wurde untersucht. Unklar blieb bei diesen Betrachtungen, welche Rolle derartige Antikörper beispielsweise bei inhibitorischen synaptischen Übertragungsprozessen wie die der GABAergen Transmission einnehmen (Geis *et al*, 2010). Die GAD als intrazelluläres Enzym beinhaltet durch ihre Funktion als GABA-synthetisierendes Enzym dabei eine bedeutende Rolle. Es sollte daher geklärt werden, inwieweit Antikörper Einfluss auf inhibitorische synaptische Übertragungsprozesse durch Internalisierung und Interaktion mit

dem Zielantigen haben. In diesem Fall könnte ein Einfluss der GAD-Ak auf die Synthese oder die synaptische Transmission von GABA vorliegen.

Amphiphysin ist, wie die GAD, ein intrazellulär lokalisiertes Protein mit besonderer Bedeutung in der Regulation und Freisetzung der synaptischen Vesikel. Durch die Blockade der Funktion von Amphiphysin (*Evergren et al, 2004*) oder anhand von Mäusen mit Amphiphysin-1-Defekt [knock-out] (*Di Paolo et al, 2002*) wurde eine Störung der inhibitorischen synaptischen Transmission bereits beschrieben (*Geis et al, 2010*). *Geis et al* untersuchten 2010 derartige Zusammenhänge mit Antikörpern gegen Amphiphysin, welche neben den GAD-Ak beim SPS auftreten. Es handelt sich um Immunglobuline vom Typ IgG. Durch intrathekale Injektion der Amphiphysin-Antikörper entwickelten Ratten SPS-ähnliche Symptome, während die Kontrollen unauffällig blieben. Eine pathophysiologische Relevanz dieser Antikörper war damit zumindest gegeben, elektrophysiologische Untersuchungen wie der Hoffmann-Reflex belegten tatsächlich eine Reduktion der GABAergen inhibitorischen Transmission. Durch native Schnitte des Rückenmarks und Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass die Antikörper an spezifische Strukturen der neuronalen Zelloberfläche binden. Ein Problem bleibt jedoch bestehen: Amphiphysin befindet sich im Intrazellulärraum vorwiegend in den terminalen präsynaptischen Endigungen. Durch doppelte Immunfluoreszenz verschiedener Rückenmarksschnitte unter Verwendung von Antikörpern gegen Amphiphysin und präsynaptischen Antigenen wie VGAT (vesicular GABA transporter) konnte ***in vivo und in vitro*** eine intrazelluläre Anreichung in den terminalen präsynaptischen Endigungen gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen ***in vitro*** zeigten an hippocampalen Schnitten eine reduzierte Freisetzung des Transmitters GABA (und auch Glutamat) mit signifikant erniedrigten inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSC). *Geis et al* bewiesen damit nicht nur die Internalisierung von Antikörpern in eine neuronale Zelle, sondern auch die Interaktion mit dem Zielantigen und direkt hieraus resultierendem Effekt. Damit können extrazellulär lokalisierte Antikörper einen direkten Effekt auf intrazelluläre Antigene ausüben. Ob dies für GAD-Ak zutrifft, kann jedoch mit diesen Experimenten nicht geklärt werden.

4.3.2 Können GAD-Ak in ein Neuron aufgenommen werden?

Immunfärbungen von *Mitoma et al (2000)* zeigten eine Immunreaktion GAD-Ak haltiger Liquores von Ataxie-Patienten an terminalen Nervenendigungen zerebellärer Neurone, in denen die GAD physiologisch lokalisiert ist. *Vianello et al (2006)* inkubierten kultivierte hippocampale Neurone (*in vitro*) mit verschiedenen GAD-Ak haltigen Seren, u.a. von Patienten mit Epilepsie, SPS, Ataxie und Diabetes. Anschließend durchgeführte Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine sehr spezifische Immunreaktion: Das Muster der Immunmarkierung unterschied sich deutlich zwischen den verschiedenen Seren, sodass möglicherweise unterschiedliche Bindungsstellen auf der Zelloberfläche für die Antikörperbindung erforderlich sind (*Vianello et al, 2006*). Letztlich können extrazellulär lokalisierte Antikörper vom Typ IgG in ein Neuron aufgenommen werden, dieser Effekt ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* möglich, wie *Geis et al (2010)* zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurden die GAD-Ak *in vivo* stereotaktisch injiziert, ein pathophysiologischer Effekt konnte in der magnesiumfreien Lösung gezeigt werden. Auf Grundlage der gerade beschriebenen Publikationen könnten diese Antikörper möglicherweise ebenfalls ihr intrazelluläres Zielantigen, die Glutamatdecarboxylase, erreichen. Dem gegenübergestellt werden müssen allerdings die sehr spezifischen, voneinander unterschiedlichen Immunreaktionen verschiedener GAD-Ak haltiger Seren. Es ist fraglich, ob bei derart divergierenden Ergebnissen GAD-Ak, wenn überhaupt, über den gleichen Mechanismus aufgenommen werden. Nachfolgende Studien sollten daher untersuchen, ob GAD-Ak intrazellulär nachweisbar sind. Dann wäre eine direkte Interaktion mit dem GAD-Enzym möglich.

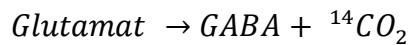
4.3.3 Sind die bisherigen Erkenntnisse auf die GAD-Enzephalitis übertragbar?

Bisherige Publikationen über GAD-Ak beziehen sich meistens auf Krankheitsbilder wie dem SPS, der Ataxie oder dem Diabetes mellitus (*Dinkel et al 1998, Mitoma et al 2000*), während im Zusammenhang mit der Epilepsie (*Peltola et al, 2000*), speziell der Temporallappenepilepsie, nur wenige Publikationen existieren. Bereits 1998 postulierten *Giometto et al* eine mögliche autoimmune Genese derartiger Epilepsien aufgrund des Auftretens der GAD-Ak im Liquor oder Serum erkrankter Patienten. Basierend auf Untersuchungen mit Proben von an SPS oder Ataxie erkrankten Personen besteht die derzeit favorisierte pathophysiologische Funktion der GAD-Ak in der Störung der GABA-Synthese oder

der GABA-Freisetzung an den terminalen Nervenendigungen (*Vianello et al 2008*) mit heraus resultierender Hyperexzitabilität. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die epileptiforme Wirkung der GAD-Ak, während die Daten gegen eine Dysfunktion der GABAergen Transmission sprechen. Dem gegenübergestellt wurden die Erkenntnisse über die Wirkung der GAD-Ak mit Seren von SPS und Ataxie erkrankten Personen überwiegend ***in vitro*** durchgeführt. Folglich muss geklärt werden, ob die hierbei gewonnenen Erkenntnisse (a) auf GAD-Ak in Seren oder Liquores von Epilepsiepatienten übertragbar sind und (b) welche Relevanz derartige Erkenntnisse ***in vivo*** haben.

4.3.3.1 GAD-Ak von SPS-Patienten hemmen die Synthese von GABA

Dinkel et al (1998) untersuchten an sogenannten „Crude Rat Cerebellar Extracts, CRCE“ den Einfluss GAD-Ak haltiger Seren und Liquores von **SPS-Patienten** auf die GABA-Synthese. Hierzu wurde das Enzym GAD aus Rattenhirnen gelöst und mit den Seren inkubiert. Durch Zugabe von Glutamat wurde dann die Enzymaktivität durch Registrierung von $^{14}\text{CO}_2$ ermittelt:



Es resultierte im Vergleich zu den Kontrollen (GAD-Ak pos. Diabetes, gesunde Patienten) eine verminderte Enzymaktivität. Um zu überprüfen, ob Antikörper für diesen Effekt verantwortlich waren, isolierte man aus den Seren und Liquores die Antikörperfraktion und wiederholte die Experimente. Erneut kam es zu einer Aktivitätsreduktion, interessanterweise jedoch nicht in allen Proben. Hieraus schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass Antikörper im Wesentlichen für die Inhibition der GAD verantwortlich seien, im Serum jedoch auch andere Faktoren auftreten, die ebenfalls eine inhibitorische Funktion besitzen. Diese Ergebnisse müssen kritisch betrachtet werden. Zum einen wurde die GAD extrahiert – das Enzym war damit den Antikörpern direkt zugänglich, eine Aufnahme in die Zielzelle musste nicht erfolgen. Unter den Bedingungen ***in vitro*** konnte damit ein unmittelbarer pathophysiologischer Effekt der GAD-Ak auf die GAD nachgewiesen werden. ***In vivo*** ist die GAD intrazellulär lokalisiert und mit nicht direkt zugänglich für Antikörper. Diese Ergebnisse können daher nicht auf die Bedingungen ***in vivo*** übertragen werden. Zum einen wurden zufällig andere Serumfaktoren mit inhibitorischer Wirkung auf die GAD entdeckt, ohne diese näher zu beschreiben. Dies sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Zum anderen zeigten diese

Experimente, dass nicht alle GAD-Ak haltigen Seren oder Liquores eine Hemmung der GAD zur Folge hatten. Dies ist zunächst vereinbar mit den sehr spezifischen Immunreaktionen und den resultierenden unterschiedlichen Krankheitsbildern und deutet auf eine Epitopspezifität der GAD-Ak bezüglich der GAD hin. Rückschlüsse auf eine vergleichbare Wirkung der GAD-Ak *in vivo* sind damit nicht möglich, die Gültigkeit der Ergebnisse im Falle der Epilepsie ist nicht gesichert.

4.3.3.2 GAD-Ak von Ataxie-Patienten reduzieren die präsynaptische Freisetzung von GABA
Eine weitere vermutete Wirkung der GAD-Ak ist die verminderte GABA-Freisetzung aus der Präsynapse. *Mitoma et al (2000)* haben herausgefunden, dass GAD-Ak im Liquor von **Ataxie-Patientin** die über den GABA-A-Rezeptor vermittelte Transmission von Korbzellen auf Purkinjezellen im Cerebellum unterdrücken können, ohne die Glutamatantwort zu beeinflussen. Immunfärbungen zeigten Immunreaktionen der getesteten GAD-Ak im Bereich der terminalen Nervenendigungen. Damit wurde bestätigt, dass sich die GAD-Ak der Ataxiepatienten überwiegend in den Präsynapsen anreichern. Patch-Clamp-Messungen an Kleinhirnschnitten der Ratte zeigten bei Inkubation mit GAD-Ak eine Amplitudenreduktion der IPSCs, bedingt durch eine verminderte Freisetzung von GABA aus der Präsynapse mit in der Folge verminderter GABA-A-Rezeptor vermittelter Inhibition an der Postsynapse. Dies beruht entweder auf einer verminderten Synthese von GABA (*Dinkel et al*) oder auf einer Störung der Mobilisierung synaptischer, GABA-speichernder Vesikel (*Geis et al*). *Mitoma et al* vermuteten, dass die Antikörper ihr Antigen in der Zelle erkennen und sich dort bevorzugt ansammeln. Belegt wird dies durch die sehr spezifischen Immunreaktionen in den terminalen Nervenendigungen. Möglicherweise deutet dies auch auf die Fähigkeit von Antikörpern hin, in ihre Zielzelle aufgenommen werden zu können. In ihren Versuchen haben *Mitoma et al* jedoch ausschließlich *in vitro* experimentiert. Ob diese Erkenntnisse *in vivo* eine Relevanz haben, kann daher nicht geklärt werden. Damit lassen sich diese Erkenntnisse ebenfalls nicht auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übertragen.

4.3.3.3 GAD-Ak erleichtern die Entwicklung epileptiformer Aktivität im Hippocampus

Bei der therapiereistenten (Temporallappen-) Epilepsie werden ebenfalls Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase nachgewiesen, weshalb *Giometto et al (1998)* und *Peltola et al (2000)* eine autoimmune Genese postulierten. Tatsächlich zeigten Immunfärbungen mit GAD-

Ak haltigen Seren von Epilepsiepatienten sehr spezifische Immunreaktionen (Kap. 4.3.2). *Vianello et al (2008)* untersuchten die pathophysiologische Wirkung dieser Antikörper dann erstmals mittels Patch-Clamp-Messungen an hippocampalen Zellen des Rattenhirns. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit verschiedenen Seren perfundiert und die IPSPs vor und nach der Perfusion miteinander verglichen. GAD-Ak positive Serumproben stammten von Patienten mit Temporallappenepilepsie. Zur Kontrolle wurden u.a. GAD-Ak positive Seren von Diabetespatienten und GAD-Ak negative Seren gesunder Patienten verwendet. Verwendete man die Seren der Epilepsiepatienten, resultierte eine erhöhte spontane Aktivität aufgrund verminderter IPSPs, während die anderen Seren keine Änderung zeigten. *Vianello et al* konnten die Förderung spontaner epileptiformer Aktivität im Hippocampus beweisen, vereinbar mit den Daten der vorliegenden Arbeit. Dennoch besteht eine Diskrepanz. So deuteten die Daten von *Vianello et al* ebenfalls auf eine Inhibierung der GABA-Synthese oder GABA-Freisetzung, nicht vereinbar mit den aktuell vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit.

4.3.3.4 GAD-Ak zeigen *in vivo* eine relevante pathophysiologische Wirkung

In den bisher zitierten Studien wurden alle Experimente *in vitro* durchgeführt, d.h. Hirnschnitte oder kultivierte neuronale Zellen wurden mit GAD-Ak haltigen Seren oder Liquores perfundiert oder inkubiert. Der beschriebenen Problematik bewusst führten *Manto et al (2007)* erstmals Experimente zur Untersuchung der Effekte von GAD-Ak am lebenden Tier durch. Verwendet wurden gereinigte IgG-Fraktion GAD-Ak haltige Seren von SPS- und Ataxie-Patienten. Zur Kontrolle wurden GAD-Ak haltige Seren von Diabetes-Patientin sowie Ringer-Lösungen verwendet. Die Injektion erfolgte beim narkotisierten Tier stereotaktisch in das Cerebellum oder paraspinal lumbal. Im Falle der GAD-Ak neurologisch erkrankter Patienten (SPS, Ataxie) resultierte eine erhöhte Spontanaktivität im M. gastrocnemius, die Kontrollen zeigten diesen Effekt nicht. In weiterführenden Experimenten, ebenfalls am lebenden Tier, wurde der Effekt der GAD-Ak auf den Stoffwechsel von NO und Glutamat im Kleinhirn untersucht. Unter normalen Bedingungen resultieren nach der NMDA-Applikation ein Anstieg der NO-Produktion und ein Abfall der extrazellulären Glutamatkonzentration. In allen Versuchsgruppen trat dieser Effekt auf, im Falle der GAD-Ak neurologischer Patienten jedoch mit einem signifikant geringerem Anstieg der NO-Produktion und einem geringeren Abfall der Glutamatkonzentration. Diese GAD-Ak führen demnach zu einer geringeren NO-Produktion, einhergehend mit einer höheren Glutamatkonzentration. Mit diesen Experimenten haben

Manto et al (2007) erstmalig nicht nur elektrophysiologisch, sondern auch biochemisch relevante Effekte der GAD-Ak **in vivo** nachgewiesen. Es konnte ebenfalls die Förderung spontaner elektrischer Aktivität nachgewiesen werden. Dieser Effekt tritt damit sowohl **in vitro** als auch **in vivo** auf. Damit können möglicherweise diese Ergebnisse auch im Falle der Epilepsie eine relevante Bedeutung haben.

4.3.4 Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Sowohl **in vivo** (*Manto et al 2007*) als auch **in vitro** (*Vianello et al (2008)*) haben GAD-Ak verschiedener Krankheitsbilder (SPS, Ataxie, Epilepsie) relevante pathophysiologische Wirkungen, bestätigt durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. So zeigten verschiedene Studien, wie auch diese Arbeit, dass GAD-Ak beispielsweise die Entstehung spontaner Aktivität fördern. Dies erscheint zunächst plausibel, da Epilepsie durch eine erhöhte neuronale Aktivität gekennzeichnet ist. Unklar bleibt jedoch, weshalb die Ergebnisse im Gegensatz zu bisherigen Publikationen gegen eine Störung der GABAergen Transmission sprechen. Zusammen mit den Ergebnissen von *Manto et al* wirft dies u.a. folgende Fragen auf:

1. Sind GAD-Ak die primär agierenden Antikörper?
2. Wieso führen GAD-Ak neurologischer Erkrankungen zu gleichen pathophysiologischen Effekten, klinisch jedoch zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern?
3. Haben GAD-Ak *in vivo* und *in vitro* unterschiedliche Wirkungen?
4. Ist der Wirkungsmechanismus prä- oder postsynaptisch?
5. Gibt es alternative Möglichkeiten zur Erklärung der pathophysiologischen Wirkung?

In allen durchgeführten Studien wurden Seren, Liquores oder gereinigte Antikörperfraktionen verwendet, in denen GAD-Ak und/oder andere Antikörper nachgewiesen wurden. Es finden sich keine Studien, in denen selektiv isolierte GAD-Antikörper verwendet wurden. Es ist daher fraglich, ob GAD-Ak überhaupt für die Entwicklung der Krankheitsbilder relevant sind. *Dinkel et al* beispielsweise vermuteten, es existieren möglicherweise noch andere Serumfaktoren, die für die beschriebenen Effekte verantwortlich sein könnten (Kap. 4.3.3.1). Dies könnte möglicherweise die Diskrepanz erklären, weshalb GAD-Ak experimentell vergleichbare pathophysiologische Wirkungen zeigen, jedoch ein breites Spektrum verschiedener Erkrankungen wie dem Stiff-Person-Syndrom, der Ataxie, dem Diabetes mellitus oder der Temporallappenepilepsie resultiert. Gestützt wird dies ebenfalls durch die

unterschiedlichen Immunreaktionen und die Epitopspezifität bezüglich der GAD. Weiterführende Studien sollten prüfen, ob Experimente mit isolierten GAD-Ak ähnliche Effekte bewirken.

Unstrittig ist die Förderung spontaner Aktivität durch GAD-Ak bei neurologischen Erkrankungen. Unklar ist jedoch, warum die weiterführenden Ergebnisse dieser Arbeit im Gegensatz zu anderen publizierten Daten stehen. Dies beruht möglicherweise auf der Methodik, die den Studien zugrunde liegt. *Dinkel et al* und *Mitoma et al* postulierten anhand der *in vitro* durchgeführten Experimente eine Inhibition der GABA-Synthese oder der GABA-Freisetzung. Es handelt sich dabei um **präsynaptische Prozesse**. Die Daten von *Manto et al* wurden *in vivo* erhoben, möglicherweise resultierend aus **postsynaptischen Prozessen**, basierend auf Änderungen in der NO- und Glutamatkonzentration. *Vianello et al (2008)* forderten dementsprechend weiterführende Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob prä- oder postsynaptische Effekte der GAD-Ak-Wirkung zugrunde liegen. Die Rolle der GAD-Ak bleibt damit weiterhin ungeklärt.

4.3.5 Alternative Erklärungsansätze für die Pathophysiologie der GAD-Ak

4.3.5.1 Präsynaptisch verminderte Inhibition der Glutamatfreisetzung durch GAD-Ak

Neben der postsynaptischen GABA-A-vermittelten Inhibition kann synaptisch freigesetztes GABA ferner die präsynaptische Glutamatfreisetzung über den GABA-B-Rezeptor inhibieren (*Mitoma et al, 2003*), wodurch sich der inhibitorische Effekt weiter verstärkt. Auf Grundlage der Experimente von 2000 führten *Mitoma et al (2003)* weitere Experimente durch, um diesen Effekt genauer zu untersuchen. Hierzu wurden erneut GAD-Ak haltige Seren von Ataxie-Patienten verwendet, mit Kleinhirnschnitten der Ratte inkubiert und IPSCs und EPSCs mittels Patch-Clamp registriert. Im Ergebnis zeigte sich die bekannte verminderte synaptische Freisetzung von GABA aus der Präsynapse. *Mitoma et al* schlussfolgerten mittels weiterer Experimente einen dualen Wirkungsmechanismus der GAD-Ak, vermittelt durch eine Störung in der präsynaptischen Suppression der exzitatorischen Transmission (GABA-B-Rezeptor) und eine Störung in der inhibitorischen Transmission (GABA-A-Rezeptor) auf die Postsynapse. Insgesamt resultiert eine Übererregbarkeit von Purkinjezellen in zerebellären Hirnschnitten der Ratte. Auch diese Experimente wurden *in vitro* an Kleinhirnschnitten der Ratte durchgeführt. Ähnliche Versuche an hippocampalen Schnitten sollten diese Ergebnisse

überprüfen, damit eine gesicherte Relevanz im Rahmen der Temporallappenepilepsie vorliegt und derartige Ergebnisse möglicherweise *in vivo* eine Relevanz haben. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch die verminderte Suppression der exzitatorischen Transmission, resultierend in einer verstärkten Freisetzung von Glutamat, vereinbar mit den Ergebnissen von *Manto et al.*

4.3.5.2 GAD-Ak imitieren die Struktur von GABA

Eine interessante Fähigkeit von Antikörpern besteht in der Kreuzreaktion mit Antigenen, die dem primären Antigen ähnlich sind. Man nennt dies Kreuzreaktion.

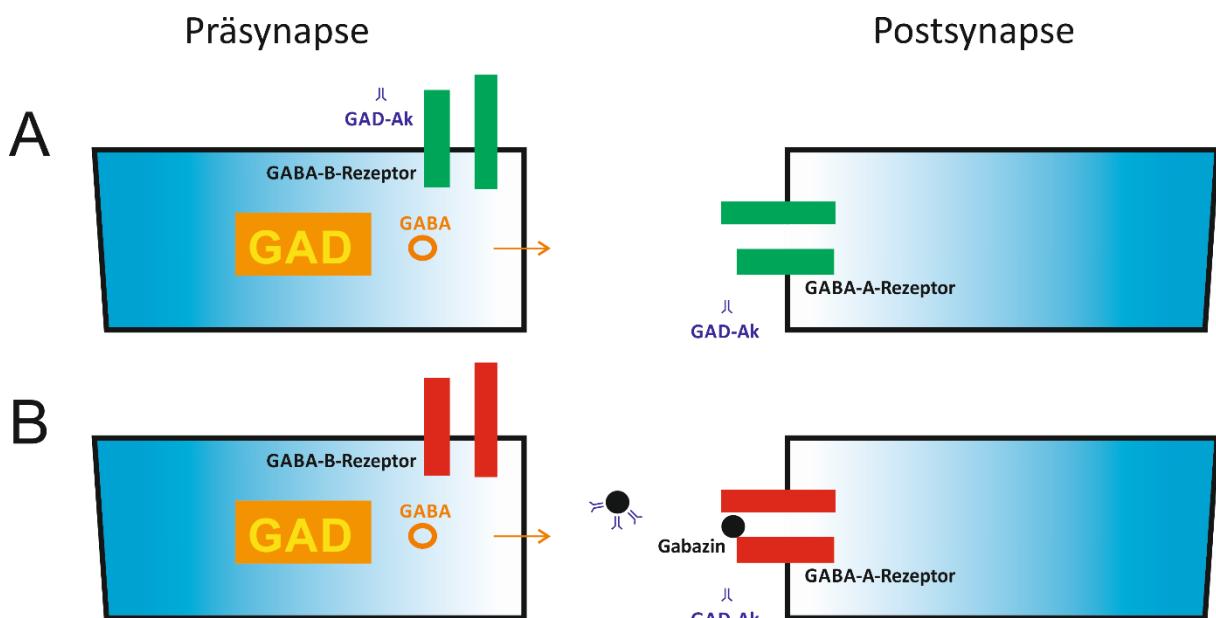


Abbildung 4-2: Mögliche Wirkungen der GAD-Antikörper

A: Inhibition des GABA-Rezeptors durch GAD-Ak. B: Neutralisierung der GAD-Ak durch Gabazin. Grün: Erregungsfördernd, Rot: Erregungshemmend.

In Anlehnung an den Vorschlag von *Dinkel et al (1998)* könnten GAD-Ak die Struktur von GABA imitieren und an den GABA-Rezeptor im Sinne einer Kreuzreaktion binden, eine Aufnahme in die Zielzelle wäre nicht notwendig. Hieraus resultiert möglicherweise eine Blockade der GABAergen Transmission im Sinne des dualen Wirkungsmechanismus (*Mitoma et al, 2003*), sowohl prä- als auch postsynaptisch (A in Abbildung 4-2). Es überwiegt exzitatorische Aktivität und in der magnesiumfreien Lösung resultiert eine Förderung der Spontanaktivität. Durch die Blockade von GABA-B-Rezeptoren wird vermehrt Glutamat freigesetzt. In der Tat konnten *Manto et al (2007)* erhöhte Glutamatkonzentration unter dem Einfluss von GAD-Ak im

Extrazellularraum messen. Dem gegenübergestellt führt jedoch eine verstärkte neuronale Aktivität, beispielsweise vermittelt durch die GAD-Ak, zu einer verstärkten Bildung des Holoenzymes GAD und damit zu einer erhöhten GABA-Synthese (*Erlander et al, 1991*). Zum einen würde sich dies negativ auf die Glutamatkonzentration auswirken, zum anderen würde das vermehrt gebildete GABA die Wirkung der GAD-Ak aufheben. Außerdem sollte Gabazin den Effekt der GAD-Ak imitieren. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse aus den Versuchen, in denen Gabazin eine Erregungsdämpfung zur Folge hatte. Möglicherweise führt die Anwesenheit von Gabazin zu einer Neutralisierung der GAD-Ak, wodurch deren Wirkung am GABA-Rezeptor aufgehoben wird (B in [Abbildung 4-2](#)). Eine Komplexbildung zwischen GAD-Ak und Gabazin wäre denkbar. Die Inhibition des Rezeptors erfolgt in diesem Fall nur noch durch Gabazin selbst. Es kann nun kein Unterschied mehr zwischen den Kontrollen und der GAD-Gruppe festgestellt werden. Für diesen Mechanismus sprechen die Messdaten der 2. und 3. Versuchsreihe, die Ursache des Frequenzunterschieds wurde in Kap. 4.2.4 erläutert.

4.3.5.3 Postsynaptische Inhibierung der NO-Synthese durch GAD-Ak

Die Synthese von NO führt zu einer Hemmung der synaptischen Freisetzung von Glutamat (*Sequeira et al, 2001*). Demnach fördert ein vermindertes NO-Angebot im ZNS die Glutamatfreisetzung. *Manto et al (2007)* zeigten unter Einwirkung von GAD-Ak eine verminderte NO-Produktion und erhöhte Glutamatkonzentration, vereinbar mit den Ergebnissen von *Mitoma et al (2003)*. Möglicherweise ist eine Hemmung der NO-Synthase durch die GAD-Ak die Ursache (*Manto et al, 2003*). Im ZNS steht vermehrt der exzitatorische Transmitter Glutamat zur Verfügung, wodurch die Entwicklung spontaner Aktivität begünstigt wird.

4.3.5.4 Unterschiedliche Titer der Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden Liquorproben mit unterschiedlichen GAD-Titern verwendet. In der 1. Versuchsreihe war dies die Liquornummer 1 (886), während in den beiden anderen die Liquornummer 2 (2526) verwendet wurde. Möglicherweise resultieren deshalb unterschiedliche Ergebnisse. Letztlich, wenn auch unwahrscheinlich, besteht die Möglichkeit, dass die GAD-Ak bereits vor der Feldpotenzialmessung aus dem Hippocampus in umliegende Hirnregionen diffundiert sind. In diesem Fall besteht kein Unterschied mehr zwischen den anti-GAD behandelten Tieren und den Kontrollen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die limbische Enzephalitis ist eine Erkrankung, die durch moderne Diagnostik immer häufiger diagnostiziert wird. Es werden zunehmend Fälle mit GAD-Ak assoziierter Temporallappenepilepsie bekannt, es existieren jedoch bisher kaum publizierte Daten über die pathophysiologische Relevanz der hierbei auftretenden GAD-Ak. Favorisiert wird derzeit eine Störung der GABAergen Transmission, gekennzeichnet entweder durch eine Störung der GABA-Synthese oder eine Störung der GABA-Freisetzung aus der Präsynapse. Dies resultiert überwiegend aus den Studien von *Dinkel et al (1998)* und *Mitoma et al (2000)* mit Serum- oder Liquorproben von SPS- und Ataxie-Patienten. *Vianello et al (2008)* untersuchten erstmals GAD-Ak haltige Seren von Epilepsiepatienten, die Daten scheinen die bisherige Hypothese über die Wirkung der GAD-Ak zu bestätigen. Die Experimente in diesen Studien wurden alle *in vitro* durchgeführt. Aufgrund des breiten Spektrums der resultierenden GAD-Ak assoziierten Krankheitsbildern, vereinbar mit unterschiedlichen Immunreaktionen, ist die Bedeutung *in vivo* ungeklärt. Folglich war es das Ziel dieser Arbeit zu klären, welche pathophysiologischen Effekt *in vivo* auftreten. Die Förderung der Spontanaktivität werden durch die vorliegenden Daten bestätigt, während die GABAerge Transmission ungestört zu sein scheint. Dies ist ein Widerspruch zu bisher publizierten Daten. Somit bleibt die pathophysiologische Bedeutung der GAD-Ak weiterhin ungeklärt. Dies führt zu der Frage, ob GAD-Ak überhaupt eine essentielle Bedeutung bei der Entwicklung der Temporallappenepilepsie oder anderer neurologischer Krankheitsbilder haben. Gestützt wird dies durch experimentell ähnliche Effekte der GAD-Ak mit jedoch sehr unterschiedlich resultierenden Krankheitsbildern wie das SPS, die Ataxie oder die Temporallappenepilepsie. Ebenso fraglich ist, weshalb GAD-Ak bei Diabetespatienten keine der beschriebenen Effekte zeigen. Es sind demnach weitere Studien notwendig, in denen die pathophysiologische Relevanz der GAD-Ak geklärt werden muss. Sinnvollerweise sollte dies mit isolierten GAD-Ak aus Seren oder Liquores erfolgen. Damit wird sich zeigen, ob GAD-Ak überhaupt eine relevante Rolle haben.

6 THESEN

1. Spontane elektrische epileptiforme Aktivität in hippocampalen Hirnschnitten lässt sich durch die Entfernung von extrazellulärem Magnesium oder durch die GABA-A-Rezeptor-Blockade mittels Gabazin evozieren.
2. Die CA1-Region des Hippocampus eignet sich für die extrazelluläre Ableitung dieser spontanen elektrischen Aktivität.
3. Die bisher postulierten Hypothesen verschiedener Arbeitsgruppen über die Wirkung der GAD-Ak *in vitro* beruht auf einer Hemmung der GABAerogen Transmission, gekennzeichnet durch eine Reduktion der GABA-Synthese durch die GAD oder einer verminderten Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt.
4. Die stereotaktische Injektion von GAD-Ak beim narkotisierten Tier ist geeignet, die Effekte auf die spontane epileptische Aktivität im Hippocampus *in vivo* zu untersuchen.
5. GAD-Ak zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* relevante pathophysiologische Effekte:
 - a. Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase fördern in dieser Studie die Ausbildung epileptischer Aktivität im Hippocampus und bewirken eine signifikant längere Dauer der Potenziale.
 - b. Gabazin konnte in dieser Studie den Effekt der GAD-Ak nicht imitieren – die GABAerge Transmission erscheint intakt. Dies spricht gegen die bislang unter 3. postulierte Hypothese.
 - c. GAD-Ak fördern die präsynaptische Glutamatfreisetzung durch verminderte (präsynaptische) Suppression des GABA-B-Rezeptors.
 - d. Gabazin neutralisiert die disinhibitorische Wirkung der GAD-Ak.
 - e. GAD-Ak bewirken eine Erhöhung der Glutamatkonzentration, beispielsweise durch Hemmung der NO-Synthase.

7 ANHANG

7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: durch Glutamatdecarboxylase katalysierte Reaktion	5
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Hippocampusformation	7
Abbildung 1-3: Trisynaptischer Erregungsweg im Hippocampus (vereinfachtes Schema);	9
Abbildung 1-4: Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptorkanals	10
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Tieroperation, Ansicht von obenauf	22
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung eines Rattenschädels, Ansicht von oben, handgemalt	23
Abbildung 2-3: Durch eine Injektionsnadel verursachte Läsion im Hippocampus.	24
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung mit Blick auf das Foramen magnum (Fm) von kaudal	26
Abbildung 2-5: Gehirn in der Schnittkammer eines Vibratoms, Ansicht von oben	27
Abbildung 2-6: Schematischer Aufbau eines elektrophysiologischen Messplatzes	29
Abbildung 2-7: Platzierung der Elektroden im Hippocampus, CA1-Region	31
Abbildung 2-8: Ermittlung der Potenzialdauer als Δt	33
Abbildung 3-1: Spreading Depression	37
Abbildung 3-2: Ausgewählte Beispieldispuren aus den durchgeföhrten Datenaufzeichnungen	38
Abbildung 3-3: Beispiel einer sogenannten Baseline, dargestellt sind 30 Sekunden	39
Abbildung 3-4: Beispiele für Registrierungen von Artefakten	40
Abbildung 3-5: Darstellung der Grundform registrierter Potenziale	41
Abbildung 3-6: (A) Darstellung verschiedener Potenziale, 1. Versuchsreihe, GAD-Gruppe	42
Abbildung 3-7: (B) Darstellung verschiedener Potenziale, 1. Versuchsreihe, NaCl-Gruppe	43
Abbildung 3-8: (A) Darstellung verschiedener Potenziale, 2. Versuchsreihe, GAD-Gruppe	44
Abbildung 3-9: (B) Darstellung verschiedener Potenziale, 2. Versuchsreihe, NaCl-Gruppe	45
Abbildung 3-10: (A) Darstellung verschiedener Potenziale, 3. Versuchsreihe, GAD-Gruppe	46
Abbildung 3-11: (B) Darstellung verschiedener Potenziale, 3. Versuchsreihe, NaCl-Gruppe	47
Abbildung 3-12: Mittlere Dauer von Feldpotenzialen	51
Abbildung 3-13: Mittelung der Summe der Feldpotenziale über ein Zeitintervall von 10 Minuten	52
Abbildung 3-14: Messergebnisse aus der 1. Versuchsreihe (0 Magnesium)	54
Abbildung 3-15: Messergebnisse aus der 2. Versuchsreihe (0Mg + Gabazin)	56
Abbildung 3-16: Messergebnisse aus der 3. Versuchsreihe (Gabazin)	58
Abbildung 3-17: Grafische Gegenüberstellung aller 6 Gruppen über den gesamten Messzeitraum	60
Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung möglicher Rezeptorantwort in theoretisch entwickelten Modellen	65
Abbildung 4-2: Mögliche Wirkungen der GAD-Antikörper	77

7.2 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Ätiologie der klassischen Form der limbischen Enzephalitis (Auswahl)</i>	2
<i>Tabelle 2: Chemikalien für die Lösungszubereitung</i>	16
<i>Tabelle 3: Verwendete Gase für Tierpräparation und Messungen</i>	16
<i>Tabelle 4: Pharmaka für Tierpräparation und Messungen</i>	16
<i>Tabelle 5: Substanzen zur intrazerebralen Injektion aus humanem Material (Liquor GAD-Antikörper)</i>	17
<i>Tabelle 6: Substanzen zur intrazerebralen Injektion aus kommerzielle Herstellung</i>	17
<i>Tabelle 7: Mehr- und Einwegmaterial</i>	17
<i>Tabelle 8: Geräte und Software</i>	18
<i>Tabelle 9: Zusammensetzung einer ACSF-Stammlösung</i>	19
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung einer Sucrose-Stammlösung</i>	20
<i>Tabelle 11: Übersicht über die Messphasen der drei Versuchsreihen</i>	27
<i>Tabelle 12: Gruppenzuordnung</i>	34
<i>Tabelle 13: Morphologische Einordnung der Potenziale, 0 Mg</i>	48
<i>Tabelle 14: Morphologische Einordnung der Potenziale, 0 Mg + Gabazin</i>	49
<i>Tabelle 15: Morphologische Einordnung der Potenziale, Gabazin</i>	50
<i>Tabelle 16: Anwendung statistischer Tests auf das Zeitintervall 111. bis 120. Minute</i>	53

7.3 LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aktories, Klaus; Forth, Wolfgang; Allgaier, Clemens (2009): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker ; mit 305 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch]. 10., überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- 2) Alamowitch, S.; Graus, F.; Uchuya, M.; Reñé, R.; Bescansa, E.; Delattre, J. Y. (1997): Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. In: *Brain : a journal of neurology* 120 (Pt 6), S. 923–928.
- 3) Alarcon-Segovia, D.; Ruiz-Argüelles, A.; Llorente, L. (1996): Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. In: *Immunology today* 17 (4), S. 163–164.
- 4) Amaral, D. G.; Witter, M. P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. In: *Neuroscience* 31 (3), S. 571–591.
- 5) Andersen, P.; Bliss, T. V.; Skrede, K. K. (1971): Lamellar organization of hippocampal pathways. In: *Experimental brain research* 13 (2), S. 222–238.
- 6) Antoine, J. C.; Honnorat, J.; Anterion, C. T.; Aguera, M.; Absi, L.; Fournel, P.; Michel, D. (1995): Limbic encephalitis and immunological perturbations in two patients with thymoma. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 58 (6), S. 706–710.
- 7) Ault, B.; Evans, R. H.; Francis, A. A.; Oakes, D. J.; Watkins, J. C. (1980): Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparations. In: *The Journal of physiology* 307, S. 413–428.
- 8) Baekkeskov, S.; Aanstoot, H. J.; Christgau, S.; Reetz, A.; Solimena, M.; Cascalho, M. et al. (1990): Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. In: *Nature* 347 (6289), S. 151–156. DOI: 10.1038/347151a0.
- 9) Béhé, P.; Stern, P.; Wyllie, D. J.; Nassar, M.; Schoepfer, R.; Colquhoun, D. (1995): Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. In: *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 262 (1364), S. 205–213. DOI: 10.1098/rspb.1995.0197.
- 10) Behrens, C. J.; van den Boom, L P; Heinemann, U. (2007): Effects of the GABA(A) receptor antagonists bicuculline and gabazine on stimulus-induced sharp wave-ripple

- complexes in adult rat hippocampus in vitro. In: *The European journal of neuroscience* 25 (7), S. 2170–2181. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05462.x.
- 11) Bennett, J. A.; Dingledine, R. (1995): Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. In: *Neuron* 14 (2), S. 373–384.
- 12) BLACKSTAD, T. W. (1956): Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. In: *The Journal of comparative neurology* 105 (3), S. 417–537.
- 13) Brierley JB, Corsellis JAN, Hierons R, et al. (1960): Subacute encephalitis of later adult life mainly affecting the limbic areas. *Brain* 1960 (83), S. 357–368.
- 14) Corsellis, J. A.; Goldberg, G. J.; Norton, A. R. (1968): "Limbic encephalitis" and its association with carcinoma. In: *Brain : a journal of neurology* 91 (3), S. 481–496.
- 15) Crunelli, V.; Mayer, M. L. (1984): Mg²⁺ dependence of membrane resistance increases evoked by NMDA in hippocampal neurones. In: *Brain research* 311 (2), S. 392–396.
- 16) Cull-Candy, Stuart G.; Leszkiewicz, Daniel N. (2004): Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004 (255), S. re16. DOI: 10.1126/stke.2552004re16.
- 17) Dalby, Nils Ole; Mody, Istvan (2003): Activation of NMDA receptors in rat dentate gyrus granule cells by spontaneous and evoked transmitter release. In: *Journal of neurophysiology* 90 (2), S. 786–797. DOI: 10.1152/jn.00118.2003.
- 18) Dalmau, J.; Furneaux, H. M.; Cordon-Cardo, C.; Posner, J. B. (1992): The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. In: *The American journal of pathology* 141 (4), S. 881–886.
- 19) Dalmau, Josep; Graus, Francesc; Villarejo, Alberto; Posner, Jerome B.; Blumenthal, Deborah; Thiessen, Brian et al. (2004): Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. In: *Brain : a journal of neurology* 127 (Pt 8), S. 1831–1844. DOI: 10.1093/brain/awh203.
- 20) Dalmau, Josep; Tüzün, Erdem; Wu, Hai-yan; Masjuan, Jaime; Rossi, Jeffrey E.; Voloschin, Alfredo et al. (2007): Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. In: *Annals of neurology* 61 (1), S. 25–36. DOI: 10.1002/ana.21050.

- 21) Di Paolo, Gilbert; Sankaranarayanan, Sethuraman; Wenk, Markus R.; Daniell, Laurie; Perucco, Ezio; Caldarone, Barbara J. et al. (2002): Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. In: *Neuron* 33 (5), S. 789–804.
- 22) Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S. F. (1999): The glutamate receptor ion channels. In: *Pharmacological reviews* 51 (1), S. 7–61.
- 23) Dinkel, K.; Meinck, H. M.; Jury, K. M.; Karges, W.; Richter, W. (1998): Inhibition of gamma-aminobutyric acid synthesis by glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome. In: *Annals of neurology* 44 (2), S. 194–201. DOI: 10.1002/ana.410440209.
- 24) Erlander, M. G.; Tillakaratne, N. J.; Feldblum, S.; Patel, N.; Tobin, A. J. (1991): Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. In: *Neuron* 7 (1), S. 91–100.
- 25) Evergren, Emma; Marcucci, Melissa; Tomilin, Nikolay; Löw, Peter; Slepnev, Vladimir; Andersson, Fredrik et al. (2004): Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5 (7), S. 514–528. DOI: 10.1111/j.1398-9219.2004.00198.x.
- 26) Finelli, Pasquale F. (2011): Autoimmune Limbic Encephalitis With GAD Antibodies. In: *The Neurohospitalist* 1 (4), S. 178–181. DOI: 10.1177/1941875211413135.
- 27) Furukawa, Hiroyasu; Singh, Satinder K.; Mancusso, Romina; Gouaux, Eric (2005): Subunit arrangement and function in NMDA receptors. In: *Nature* 438 (7065), S. 185–192. DOI: 10.1038/nature04089.
- 28) Geis, Christian; Weishaupt, Andreas; Hallermann, Stefan; Grünewald, Benedikt; Wessig, Carsten; Wultsch, Thomas et al. (2010): Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. In: *Brain : a journal of neurology* 133 (11), S. 3166–3180. DOI: 10.1093/brain/awq253.
- 29) Giometto, B.; Nicolao, P.; Macucci, M.; Tavolato, B.; Foxon, R.; Bottazzo, G. F. (1998): Temporal-lobe epilepsy associated with glutamic-acid-decarboxylase autoantibodies. In: *Lancet (London, England)* 352 (9126), S. 457.
- 30) Granerod, Julia; Ambrose, Helen E.; Davies, Nicholas W.; Clewley, Jonathan P.; Walsh, Amanda L.; Morgan, Dilys et al. (2010): Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study.

- In: *The Lancet. Infectious diseases* 10 (12), S. 835–844. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70222-X.
- 31) Graus, F.; Keime-Guibert, F.; Reñe, R.; Benyahia, B.; Ribalta, T.; Ascaso, C. et al. (2001): Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. In: *Brain : a journal of neurology* 124 (Pt 6), S. 1138–1148.
- 32) Greenamyre, J. T.; Olson, J. M.; Penney, J. B.; Young, A. B. (1985): Autoradiographic characterization of N-methyl-D-aspartate-, quisqualate- and kainate-sensitive glutamate binding sites. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 233 (1), S. 254–263.
- 33) Gultekin, S. H.; Rosenfeld, M. R.; Voltz, R.; Eichen, J.; Posner, J. B.; Dalmau, J. (2000): Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. In: *Brain : a journal of neurology* 123 (Pt 7), S. 1481–1494.
- 34) Harding, A. E.; Thompson, P. D.; Kocen, R. S.; Batchelor, J. R.; Davey, N.; Marsden, C. D. (1989): Plasma exchange and immunosuppression in the stiff man syndrome. In: *Lancet (London, England)* 2 (8668), S. 915.
- 35) Hackert, Jana K.; Muller, Lorenz; Rohde, Marco; Bien, Christian G.; Kohling, Rudiger; Kirschstein, Timo (2016): Anti-GAD65 Containing Cerebrospinal Fluid Does not Alter GABAergic Transmission. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 10, S. 130. DOI: 10.3389/fncel.2016.00130.
- 36) Honnorat, J.; Saiz, A.; Giometto, B.; Vincent, A.; Brieva, L.; Andres, C. de et al. (2001): Cerebellar ataxia with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies: study of 14 patients. In: *Archives of neurology* 58 (2), S. 225–230.
- 37) Kaufman, D. L.; Houser, C. R.; Tobin, A. J. (1991): Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. In: *Journal of neurochemistry* 56 (2), S. 720–723.
- 38) Lernmark, A. (1996): Glutamic acid decarboxylase--gene to antigen to disease. In: *Journal of internal medicine* 240 (5), S. 259–277.
- 39) Lopes da Silva, F H; Witter, M. P.; Boeijinga, P. H.; Lohman, A. H. (1990): Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. In: *Physiological reviews* 70 (2), S. 453–511.

- 40) Malter, Michael P.; Helmstaedter, Christoph; Urbach, Horst; Vincent, Angela; Bien, Christian G. (2010): Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. In: *Annals of neurology* 67 (4), S. 470–478. DOI: 10.1002/ana.21917.
- 41) Manto, Mario-Ubaldo; Lauter, Marie-Aline; Aguera, Michèle; Rogemond, Véronique; Pandolfo, Massimo; Honnorat, Jérôme (2007): Effects of anti-glutamic acid decarboxylase antibodies associated with neurological diseases. In: *Annals of neurology* 61 (6), S. 544–551. DOI: 10.1002/ana.21123.
- 42) Martin, D. L.; Rimvall, K. (1993): Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. In: *Journal of neurochemistry* 60 (2), S. 395–407.
- 43) Matà, Sabrina; Muscas, Gian Carlo; Naldi, Ilaria; Rosati, Eleonora; Paladini, Sergio; Cruciani, Barbara et al. (2008): Non-paraneoplastic limbic encephalitis associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. In: *Journal of neuroimmunology* 199 (1-2), S. 155–159. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.015.
- 44) Mathew, R. M.; Vandenberghe, R.; Garcia-Merino, A.; Yamamoto, T.; Landolfi, J. C.; Rosenfeld, M. R. et al. (2007): Orchiectomy for suspected microscopic tumor in patients with anti-Ma2-associated encephalitis. In: *Neurology* 68 (12), S. 900–905. DOI: 10.1212/01.wnl.0000252379.81933.80.
- 45) Matthews, D. A.; Cotman, C.; Lynch, G. (1976): An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. In: *Brain research* 115 (1), S. 1–21.
- 46) Mayer, M. L.; Westbrook, G. L.; Guthrie, P. B. (1984): Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. In: *Nature* 309 (5965), S. 261–263.
- 47) Meinck, H. M.; Faber, L.; Morgenthaler, N.; Seissler, J.; Maile, S.; Butler, M. et al. (2001): Antibodies against glutamic acid decarboxylase: prevalence in neurological diseases. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 71 (1), S. 100–103.
- 48) Miller, L. P.; Walters, J. R. (1979): Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra synaptosomes. In: *Journal of neurochemistry* 33 (2), S. 533–539.
- 49) Mitoma, H.; Song, S. Y.; Ishida, K.; Yamakuni, T.; Kobayashi, T.; Mizusawa, H. (2000): Presynaptic impairment of cerebellar inhibitory synapses by an autoantibody to glutamate decarboxylase. In: *Journal of the neurological sciences* 175 (1), S. 40–44.

- 50) Mitoma, Hiroshi; Ishida, Kazuyuki; Shizuka-Ikeda, Masami; Mizusawa, Hidehiro (2003): Dual impairment of GABAA- and GABAB-receptor-mediated synaptic responses by autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. In: *Journal of the neurological sciences* 208 (1-2), S. 51–56.
- 51) Mody, I.; Lambert, J. D.; Heinemann, U. (1987): Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. In: *Journal of neurophysiology* 57 (3), S. 869–888.
- 52) Nowak, L.; Bregestovski, P.; Ascher, P.; Herbet, A.; Prochiantz, A. (1984): Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. In: *Nature* 307 (5950), S. 462–465.
- 53) Paxinos, George; Watson, Charles (2007): The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam, Boston: Academic Press/Elsevier. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10378802>.
- 54) Peltola, J.; Kulmala, P.; Isojärvi, J.; Saiz, A.; Latvala, K.; Palmio, J. et al. (2000): Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with therapy-resistant epilepsy. In: *Neurology* 55 (1), S. 46–50.
- 55) Premkumar, L. S.; Auerbach, A. (1997): Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. In: *The Journal of general physiology* 110 (5), S. 485–502.
- 56) Qu, K.; Martin, D. L.; Lawrence, C. E. (1998): Motifs and structural fold of the cofactor binding site of human glutamate decarboxylase. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 7 (5), S. 1092–1105. DOI: 10.1002/pro.5560070503.
- 57) Ruiz-Argüelles, A.; Alarcón-Segovia, D. (2001): Penetration of autoantibodies into living cells, 2000. In: *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 3 (2), S. 121–126.
- 58) Saiz, Albert; Blanco, Yolanda; Sabater, Lidia; González, Félix; Bataller, Luis; Casamitjana, Roser et al. (2008): Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. In: *Brain : a journal of neurology* 131 (Pt 10), S. 2553–2563. DOI: 10.1093/brain/awn183.
- 59) Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (2011): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-01651-6>.

- 60) Sequeira, S. M.; Malva, J. O.; Carvalho, A. P.; Carvalho, C. M. (2001): Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activation inhibits neurotransmitter release through nitric oxide formation in rat hippocampal nerve terminals. In: *Brain research. Molecular brain research* 89 (1-2), S. 111–118.
- 61) Sloviter, R. S.; Dichter, M. A.; Rachinsky, T. L.; Dean, E.; Goodman, J. H.; Sollas, A. L.; Martin, D. L. (1996): Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. In: *The Journal of comparative neurology* 373 (4), S. 593–618. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960930)373:4<593::AID-CNE8>3.0.CO;2-X.
- 62) Soghomonian, J. J.; Martin, D. L. (1998): Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? In: *Trends in pharmacological sciences* 19 (12), S. 500–505.
- 63) Solimena, M.; Folli, F.; Denis-Donini, S.; Comi, G. C.; Pozza, G.; Camilli, P. de; Vicari, A. M. (1988): Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. In: *The New England journal of medicine* 318 (16), S. 1012–1020. DOI: 10.1056/NEJM198804213181602.
- 64) Stanton, P. K.; Jones, R. S.; Mody, I.; Heinemann, U. (1986): Epileptiform activity induced by lowering extracellular [Mg²⁺] in combined hippocampal-entorhinal cortex slices: modulation by receptors for norepinephrine and N-methyl-D-aspartate. In: *Epilepsy research* 1 (1), S. 53–62.
- 65) Sun, Y. J.; Rose, J.; Wang, B. C.; Hsiao, C. D. (1998): The structure of glutamine-binding protein complexed with glutamine at 1.94 Å resolution: comparisons with other amino acid binding proteins. In: *Journal of molecular biology* 278 (1), S. 219–229. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1675.
- 66) Tüzün, Erdem; Dalmau, Josep (2007): Limbic encephalitis and variants: classification, diagnosis and treatment. In: *The neurologist* 13 (5), S. 261–271. DOI: 10.1097/NRL.0b013e31813e34a5.
- 67) Ueno, S.; Bracamontes, J.; Zorumski, C.; Weiss, D. S.; Steinbach, J. H. (1997): Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA_A receptor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (2), S. 625–634.
- 68) Vianello, Marika; Bisson, Giacomo; Dal Maschio, Marco; Vassanelli, Stefano; Girardi, Stefano; Mucignat, Carla et al. (2008): Increased spontaneous activity of a network of

- hippocampal neurons in culture caused by suppression of inhibitory potentials mediated by anti-gad antibodies. In: *Autoimmunity* 41 (1), S. 66–73. DOI: 10.1080/08916930701619565.
- 69) Vianello, Marika; Giometto, Bruno; Vassanelli, Stefano; Canato, Marta; Betterle, Corrado; Mucignat, Carla (2006): Peculiar labeling of cultured hippocampal neurons by different sera harboring anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GAD-Ab). In: *Experimental neurology* 202 (2), S. 514–518. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.06.012.
- 70) Vincent, Angela (2008): Stiff, twitchy or wobbly: are GAD antibodies pathogenic? In: *Brain : a journal of neurology* 131 (Pt 10), S. 2536–2537. DOI: 10.1093/brain/awn221.
- 71) Voltz, R.; Gultekin, S. H.; Rosenfeld, M. R.; Gerstner, E.; Eichen, J.; Posner, J. B.; Dalmau, J. (1999): A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. In: *The New England journal of medicine* 340 (23), S. 1788–1795. DOI: 10.1056/NEJM199906103402303.
- 72) Wo, Z. G.; Oswald, R. E. (1994): Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (15), S. 7154–7158.
- 73) Wong, Lik-Wei; Tae, Han-Shen; Cromer, Brett A. (2015): Assembly, trafficking and function of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABAA receptors are regulated by N-terminal regions, in a subunit-specific manner. In: *Journal of neurochemistry* 134 (5), S. 819–832. DOI: 10.1111/jnc.13175.

Danksagungen

Speziellem Dank gilt **Herrn PD Dr. med. Timo Kirschstein** für meine fachkompetente Einarbeitung in elektrophysiologische Messmethoden und die operative Vorbereitung benötigter Versuchstiere, ohne die diese Arbeit nicht realisiert werden können. Ich danke für kontinuierliche Unterstützung und Hilfestellung bei Fragen und Problemen, die während der experimentellen Phase dieser Arbeit auftraten.

Ich danke Herrn **Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling** für die Nutzung der Laboratorien im Oscar Langendorff Institut für Physiologie.

Ich danke auch den wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Herrn Dr. rer. nat. Steffen Müller, Herrn Dipl.-Biol. Marco Rohde, Herrn Dipl.-Biol. Johannes Mayer, Frau Dipl.-Chem. Kathrin Porath und Frau Dipl.-Biol. Tina Sellmann für die technische Unterstützung.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides Statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe, ausgenommen in der Danksagung genannter Personen, verfasst zu haben. Andere als die von mir genannten Hilfsmittel und Quellen habe ich nicht genutzt. Die vorliegende Dissertation wurde bisher weder von mir noch von einer anderen Person zur Prüfung einer Hochschule vorgelegt. Ich erkläre, bisher kein anderes Promotionsverfahren erfolglos beendet zu haben oder ein anderes Promotionsverfahren eröffnet zu haben.

Rostock, den

Bernd Frerker

Arzt an der Universitätsmedizin Rostock